

Aus dem Institut für Ernährungsmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Christian Sina

---

**„Die Bedeutung zirkadianer Rhythmen für  
das Darmepithel bei chronisch  
entzündlichen Darmerkrankungen“**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. René Pagel  
aus Dresden  
Lübeck 2019

1. Berichterstatter/

Berichterstatterin:

Prof. Dr. Ch. Sina

2. Berichterstatter/

Berichterstatterin:

Prof. Dr. R. Manz

Tag der mündlichen Prüfung:

18. August 2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20. August 2020

*Für Steffi, Ruby & Henry*

# **I Inhaltsverzeichnis**

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	Das Darmepithel .....	6
1.1.1	Aufbau und Funktion.....	7
1.1.2	Zelluläre Erneuerung.....	10
1.1.3	Das Darmepithel und chronisch entzündliche Darmerkrankungen ....	11
1.1.4	Das Darmepithel und zirkadiane Rhythmen .....	14
1.2	Die molekulare Uhr .....	15
1.2.1	Die transkriptionelle-translationelle Rückkopplungsschleife .....	16
1.2.2	Der zentrale Schrittmacher .....	18
1.2.3	Zirkadian gesteuerte Genexpression .....	20
1.2.4	Zirkadiane Rhythmusstörungen und Erkrankungen .....	21
1.3	Fragestellung .....	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1	Materialien .....	25
2.1.1	Antikörper .....	25
2.1.2	Lösungen und Puffer .....	25
2.2	Tiere und Tierhaltung .....	26
2.2.1	DSS induzierte Kolitis .....	27
2.2.2	Mausendoskopie .....	28
2.2.3	Desynchronisation von Mäusen.....	29
2.2.4	Injektionen .....	30
2.2.5	BrdU Inkorporationstest .....	30
2.2.6	Gewinnung von Biopsien .....	30
2.3	Elektronenmikroskopie .....	31
2.4	Histologie und Immunfluoreszenz.....	32
2.5	Protein-Analytik.....	34
2.5.1	Proteinisolation und Proteinbestimmung .....	34
2.5.2	Western Blotting .....	34
2.5.3	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	35
2.6	Nukleinsäuren-Analytik .....	36
2.6.1	Isolation genomischer DNA.....	36
2.6.2	PCR .....	36

2.6.3	mRNA-Isolierung .....	37
2.6.4	cDNA-Synthese.....	38
2.6.5	qPCR (Quantitative Echtzeit-PCR) .....	38
2.7	Zellbiologische Methoden .....	39
2.7.1	Zellkultivierung.....	39
2.7.2	<i>Per1/Per2</i> Gen-Abschaltung (RNAi) .....	40
2.7.3	Bestimmung der Enzymaktivität .....	41
2.8	Statistik und Software .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.1	<i>Per1/2</i> Mäuse zeigen eine veränderte Architektur der intestinalen Mukosa hinsichtlich der Barrierefunktion unter gesunden Bedingungen .....	43
3.2	Intestinale Epithelzellen von <i>Per1/2</i> Mäuse weisen ein verändertes Proliferations-Verhalten auf .....	47
3.3	Vermehrter nekroptotischer Zelltod von intestinalen Epithelzellen in <i>Per1/2</i> Mäusen.....	48
3.4	Verringerte Apoptoseinduktion in der murinen Epithelzelllinie IEC-1 nach Zelltodstimulus mit TNF- $\alpha$ .....	51
3.5	<i>Per1/2</i> Mäuse zeigen einen verstärkten pro-inflammatorischen Phänotyp bei Induktion einer experimentellen Darmentzündung .....	53
3.6	Vermehrter nekroptotischer Zelltod von intestinalen Epithelzellen in extern desynchronisierten WT Mäusen .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1	Eignung der <i>Per1/2</i> Doppel-Knockoutmaus als Modell für einen gestörten zirkadianen Rhythmus.....	62
4.2	<i>Per1/2</i> Mäuse zeigen eine veränderte Architektur der intestinalen Mukosa hinsichtlich der Barrierefunktion .....	65
4.2	Intestinale Epithelzellen von <i>Per1/2</i> Mäuse weisen ein reduziertes Proliferations-Verhalten auf .....	67
4.3	Vermehrter nekroptotischer Zelltod von intestinalen Epithelzellen in <i>Per1/2</i> Mäusen.....	70
4.4	Postulierter mechanistischer Zusammenhang zwischen mukosaler Nekroptose und Zellzyklusinhibition sowie verstärkter Anti-Apoptose .....	73
4.5	Eignung der DSS Kolitis als Modell für eine experimentelle, intestinale Entzündung .....	75
4.6	<i>Per1/2</i> Mäuse zeigen einen verstärkten pro-inflammatorischen Phänotyp bei Induktion einer experimentellen Kolitis.....	78
4.7	Auch extern desynchronisierte WT Mäuse zeigen epitheliale Nekroptose	80
4.8	Diskussion des Zusammenhanges zwischen Störungen des zirkadianen Rhythmus und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	82

4.9	Weitere Einflussfaktoren zur Determination der Kolitis Suszeptibilität neben intestinalen Epithelzellen.....	85
4.10	Ausblick.....	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>110</b>
<b>III</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>112</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
APC	Adenomatous-polyposis-coli Protein
ATG16L1	<i>Autophagy-related protein 16-1</i>
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Rinderalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCG	Uhrengenkontrolliertes Gen ( <i>clock controlled gene</i> )
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ChrB	Chromogranin B
clAP1/2	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2</i>
CK1 $\epsilon$	Casein Kinase 1 epsilon
CLC	<i>Cardiotrophin-like Cytokine</i>
CU	Colitis ulcerosa
CYLD	<i>cylindromatosis</i>
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
DD	konstante Dunkelheit ( <i>dark dark</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSS	Dextransulfat Natriumsalz ( <i>dextran sodium sulphate</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
FADD	<i>FAS-associated protein with a death domain</i>
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FELASA	<i>Federation of Laboratory Animal Science Associations</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 ( <i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i> )
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde/ <i>Society of Laboratory Animals</i>
HD-5	Humanes Defensin 5
HE	Hämatoxylin/Eosin
HPF	Hauptgesichtsfeld ( <i>high-power field</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Id3	<i>Inhibitor of DNA binding 3</i>
IEC-1	Intestinale Epithelzelllinie 1 ( <i>intestinal epithelial cell line 1</i> )
IEZ	intestinale Epithelzelle
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$ /6	Interleukin 1 $\beta$ /6
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
KC	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)</i>
Klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LD	Hell-Dunkel-Zyklus ( <i>light dark</i> )
Lgr5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i>
LL	konstantes Licht ( <i>light light</i> )
Ly21	Lysozym 1
MC	Morbus Crohn
MEICS	<i>murine endoscopic index of colitis severity</i>
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like</i>
Muc2	Mucin 2
MW	Mittelwert
2	Necrostatin 1
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

Per1/2	Per1 <sup>Brd1</sup> /Per2 <sup>Brd1</sup> Doppel-Knockout-Maus
PK2	Prokineticin 2
PP1	Protein Phosphatase 1
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR ( <i>Real-time quantitative PCR</i> )
RHT	retinohypothalamischen Trakt
RIP1/3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SCN	Suprachiasmatischer Kern ( <i>suprachiasmatic nucleus</i> )
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
siRNA	Kleine eingreifende RNA ( <i>small interfering RNA</i> )
SRF	<i>Serum-Response-Factor</i>
SUMO2/3	SUMO-Protein 2/3 ( <i>small ubiquitin-related modifier</i> )
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TA <sub>g</sub>	<i>SV40 large T antigen</i>
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
Tcf4	Transkriptionsfaktor 4
TF	Transkriptionsfaktor
TGF $\alpha$	Transformierender Wachstumsfaktor alpha ( <i>transforming growth factor alpha</i> )
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>toll-like receptor</i> )
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRADD	<i>TNF receptor associated death domain</i>
TRAF2/5	<i>TNF receptor –associated factor 2/5</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume/volume</i> )
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight/volume</i> )
Wee1	<i>Wee1-like protein kinase</i>
WT	Wildtyp ( <i>wild type</i> )
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
ZR	zirkadianer Rhythmus
ZT	Zeitgeber Zeit ( <i>zeitgeber time</i> )

#### Uhrengene und [Uhrengen-Proteine] der Säugetiere

<i>Bmal1</i> (Arntl)	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like</i>
[BMAL1 (ARNTL)]	[ <i>Brain and muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear Translocator (ARNT)-like protein 1 (ARNTL)</i> ]
<i>Clock</i>	<i>Clock Circadian Regulator</i>
[CLOCK]	[ <i>Circadian locomotor output cycles protein kaput</i> ]
<i>Cry1/2</i>	<i>Cryptochrome Circadian Clock 1/2</i>
[CRY]	[ <i>Cryptochrome 1/2</i> ]
<i>Per1/2/3</i>	<i>Period Circadian Clock 1/2/3</i>
[PER1/2/3]	[ <i>Period circadian protein homolog 1/2/3</i> ]
<i>Rev-erb<math>\alpha</math></i> (NR1D1)	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 1</i>
[REV-ERB $\alpha$ ]	[ <i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i> ]
<i>Rora</i>	<i>Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha</i>
[RORA]	[ <i>Nuclear receptor ROR-alpha</i> ]



# **1 Einleitung**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) beschreiben zwei Hauptmanifestationsformen intestinaler Entzündungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Beiden zugrunde liegen verschiedene immunologische Vorgänge, welche zu chronisch-rezidivierenden Krankheitsschüben führen. Gemeinsam sind beiden Formen aber eine Hyperaktivierung pro-inflammatorischer Signalwege des Gastrointestinaltraktes (GIT) und eine gestörte Barrierefunktion des Darmepithels (Khor, Gardet et al. 2011, Rogler and Vavricka 2015). Trotz intensiver Forschung sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen bis heute nicht ursächlich heilbar. Existierende Therapien beschränken sich überwiegend auf den Erhalt der Remissionsphase betroffener Patienten, sind langwierig und kostenintensiv und stellen somit einen erheblichen volkswirtschaftlichen Faktor im Gesundheitswesen dar (Baumgart 2009). Die Erforschung der molekularen Grundlagen der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kann somit zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankungen beitragen und dadurch auch potentielle neue Therapiekonzepte aufzeigen.

## **1.1 Das Darmepithel**

Alle Abschnitte des menschlichen Darmes besitzen den gleichen prinzipiellen Wandaufbau, von innen (Darmlumen) nach außen aus gesehen bestehend aus der Schleimhaut/Mukosa (Tunica mucosa), der Submukosa (Tela submucosa), einer Bindegewebsschicht mit vielen kleineren bis mittelgroßen Blut- und Lymphgefäßen, der Muskelhaut/Muskularis (Tunica muscularis), einer zweischichtigen glatten Muskulatur mit innerer Ringmuskelschicht und äußerer Längsmuskelschicht, sowie der Serosa (Tunica serosa, intraperitoneal) bzw. Adventitia (Tunica adventitia, extraperitoneal), einer flachen Epithelschicht mit Serosabindegewebe. Entscheidend für die Zuordnung der einzelnen Abschnitte und die jeweilige Funktion ist dabei die Schleimhaut. Die Darmschleimhaut (Tunica mucosa) des Dün- und Dickdarmes setzt sich zusammen aus einem einschichtigen, hochprismatischen Zylinderepithel (Lamina epithelialis), einer darunter liegenden lockeren Bindegewebsschicht (Lamina propria) mit Blut- und Lymphgefäßen sowie

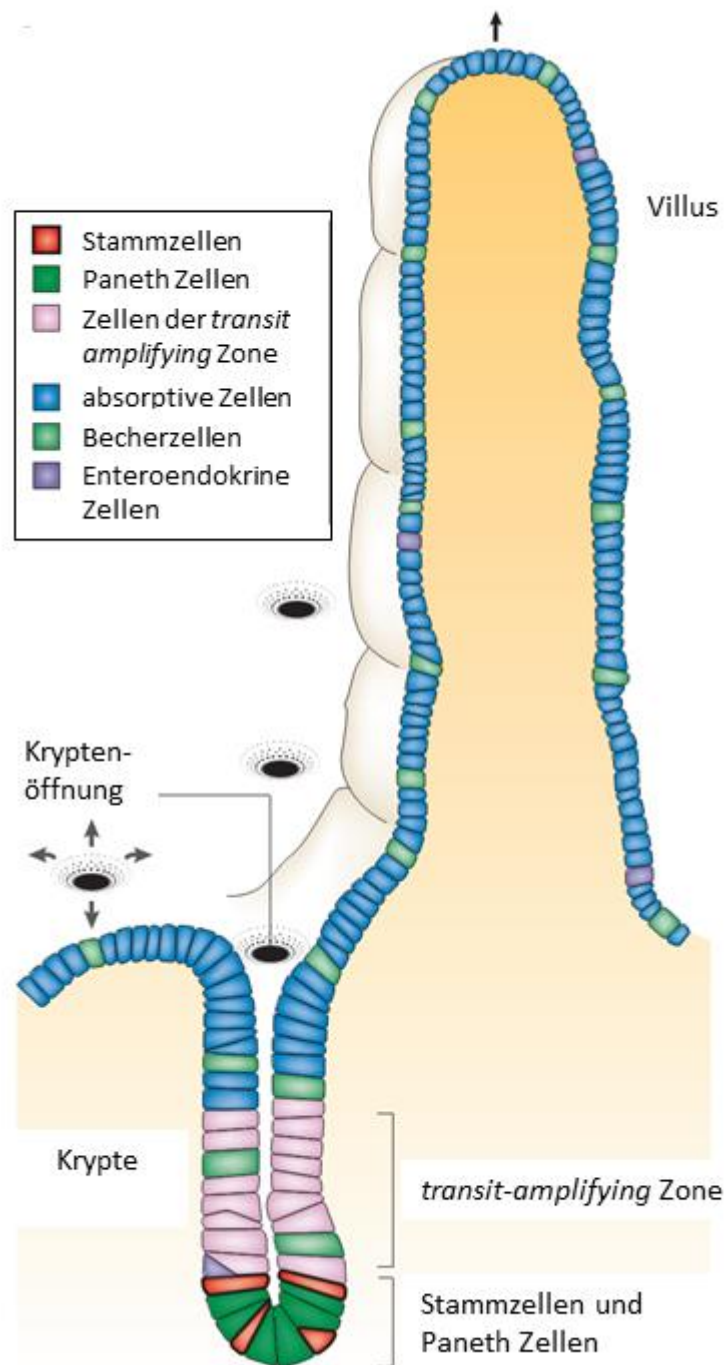
Immunzellen und einer dünnen Schicht aus glatten Muskelzellen (Lamina muscularis mucosae), welche der Mukosa eine eigen Motilität ermöglichen (Welsch 2014).

Zur Größe der Schleimhautoberfläche des menschlichen Körpers gibt es unterschiedliche Angaben, die von 30-40 m<sup>2</sup> (Helander and Fandriks 2014) über 120 m<sup>2</sup> (Kararli 1995), 200 m<sup>2</sup> (Schaal 2016) und 260-300 m<sup>2</sup> (Niess and Reinecker 2006) bis hin zu 400 m<sup>2</sup> (Macdonald and Monteleone 2005) reichen und weitgehend auf Extrapolationen beruhen. Eine große Varianz entsteht hierbei offensichtlich durch Faktoren wie Individuum, Ethnie, Geschlecht und Alter, aber auch Ernährung, mikrobielle Besiedelung und Tageszeit (Fanucci, Cerro et al. 1988, Markiewicz 1992, Groos, Hunefeld et al. 1996, Bhatnagar, Sharma et al. 2004).

### **1.1.1 Aufbau und Funktion**

Das Darmepithel trennt als Grenzschicht das Körperinnere von der Umwelt und erfüllt somit eine Schutz- und Barrierefunktion, erlaubt dabei aber den kontrollierten Stofftransport in beide Richtungen (Peterson and Artis 2014). Das einschichtige, hochprismatische Darmepithel setzt sich zusammen aus absorptiven Zellen mit ausgeprägtem, apikalem Mikrovillisaum, spezialisierten sekretorischen Zellen (Becherzellen, Paneth Zellen, enteroendokrine Zellen) sowie intestinalen Stammzellen. Diese Zellen sind in Strukturen von tubulären Einsenkungen, den Krypten (Dünn- und Dickdarm) sowie den nur im Dünndarm vorkommenden finger- oder blattförmigen Fortsätzen, den Villi, organisiert (**Abbildung 1.1**).

Dabei liegen die intestinalen Stammzellen am Kryptenboden und verbleiben dort auch. Die aus ihrer Zellteilung hervorgehenden, noch undifferenzierten Vorläuferzellen vermehren sich zusätzlich durch wiederholte Teilungen in der sogenannten *transit-amplifying* Zone. Im oberen Teil der Krypte sowie den Villi liegen die ausdifferenzierten, absorptiven oder sekretorischen Epithelzellen, welche schließlich bei Erreichen der flachen Krypten- oder Villusoberseite in das Darmlumen ausgestoßen werden. In der Gesamtheit entsteht so ein Fluss von Epithelzellen entlang der Krypten-Villus-Achse, ausgehend vom Kryptenboden bis hin zur Krypten-/Villusspitze, der für eine konstante Erneuerung des Darmepithels sorgt. Die Ausnahme dabei bilden die Paneth Zellen, die als einzige ausdifferenzierte Epithelzellpopulation im Kryptenboden verbleiben (Crosnier, Stamatakis et al. 2006).



**Abbildung 1.1: Arten und Vorkommen von intestinalen Epithelzellen im Darmepithel.**

Der schwarze Pfeil gibt die Migrationsrichtung der intestinalen Epithelzellen entlang der Kryptenachse an [modifiziert nach (Crosnier, Stamataki et al. 2006)].

Die physikalische und biochemische Barrierefunktion des Darmes ist ein hochkomplexes Zusammenspiel der miteinander vernetzten intestinalen Epithelzellen (IEZ) mit ihrer luminalen und körpereigenen Umgebung. So wird

einerseits die Resorption von Nahrungsbestandteilen und Wasser ermöglicht, andererseits werden kommensale und pathogene Mikroorganismen der intestinalen Mikrobiota an einer Translokation durch das Darmepithel gehindert und somit der Kontakt derselben zum mukosalen Immunsystem begrenzt und reguliert (Peterson and Artis 2014). Dabei ist die ständige Interaktion von IEZ mit der lokalen Mikrobiota über sogenannte *Pattern-Recognition* Rezeptoren (PRR), die charakteristische Struktur motive von Mikroorganismen erkennen, essentiell für die Gewebshomeostase und Barrierefunktion. So führt die Bindung von Mikroorganismen oder ihrer Bestandteile an auf IEZ exprimierte Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) zu einer intrazellulären Signalkaskade, die unter anderem in einer verbesserten Zell-Zell-Integrität mittels verstärkter Schlussleisten (*Tight Junctions*) resultiert (Cario, Gerken et al. 2004), und TLR-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber experimenteller intestinaler Entzündung (Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004).

Doch auch sekretorische Epithelzellen tragen entscheidend zur Barrierefunktion bei. So sezernieren Paneth Zellen antimikrobielle Peptide (AMP) wie Lysozym und Defensine, welche direkt Mikroorganismen töten oder indirekt bakterielle Toxine neutralisieren können (Kudryashova, Quintyn et al. 2014, Zhang and Liu 2016). Die Bedeutung dieser AMP wird deutlich aus den Beobachtungen an Mäusen, dass eine gestörte Paneth Zell Funktion zu einer erhöhten Infektanfälligkeit entsprechender Tiere gegenüber Infektionen und experimenteller Darmentzündung führt (Cao, Wang et al. 2014), während andererseits die transgene Expression von humanem Defensin 5 (HD-5) Mäuse resistenter gegenüber einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* macht (Salzman, Ghosh et al. 2003). Auch Becherzellen leisten einen wichtigen Beitrag zur Schleimhautprotektion. Sie produzieren und sezernieren Schleim (Mucus), welcher als Schicht das gesamte intestinale Epithel überzieht und sich aus Glykoproteinen, den Mucinen (z.B. Mucin 2), sowie weiteren Molekülen wie den Trefoil-Faktoren zusammensetzt (Kim and Ho 2010). Fehler in der Produktion, Speicherung oder Sezernierung von Mucus führen in Mausmodellen zu erhöhter Anfälligkeit für Infektionen und experimenteller intestinaler Entzündungen bis hin zur Entwicklung spontaner, intestinaler Entzündungsgeschehen (Van der Sluis, De Koning et al. 2006, An, Wei et al. 2007, McAuley, Linden et al. 2007,

Heazlewood, Cook et al. 2008, Johansson, Phillipson et al. 2008). Als Modellvorstellung werden Mikroorganismen in der Mukusschicht gefangen, was ihre Translokation an das und durch das Darmepithel verhindert, um anschließend mittels der Peristaltik abtransportiert zu werden (Kim and Ho 2010).

Diese und weitere Mechanismen wie die konstitutive Produktion (und Transzytose in das Darmlumen) von sekretorischem Immunglobulin A durch B-Zellen in der Lamina propria (Pabst 2012) oder die regulative Rolle von IEC bei der Koordination des Spektrums angemessener intestinaler Immunantworten von Toleranz bis hin zur Pathogenantwort (Peterson and Artis 2014) machen deutlich, wie wichtig eine intakte Schleimhaut für die Darmgesundheit ist.

### **1.1.2 Zelluläre Erneuerung**

Das Darmepithel ist hochregenerativ und besitzt die Fähigkeit, sich innerhalb von vier bis fünf Tagen komplett zu erneuern (van der Flier and Clevers 2009). Das setzt voraus, dass sowohl Zellteilung als auch Zelltod von IEZ vorkommen und dass diese Prozesse aufeinander abgestimmt und reguliert sind, um die Integrität der Darmbarriere zu erhalten. Für neue IEZ gibt es zwei Quellen: einerseits entstehen sie aus der Teilung undifferenzierter, intestinaler Stammzellen, zusätzlich proliferieren die entstandenen, teilweise differenzierten IEZ mehrfach im Bereich der sogenannten *transit-amplifying* Zone. Ein Schlüsselfaktor sowohl für den Erhalt der Stammzellen selber als auch für die Aufrechterhaltung des proliferativen Zustands von intestinalen Stammzellen ist der Wnt-Signalweg (Logan and Nusse 2004, Crosnier, Stamatakis et al. 2006). In Zellen ohne Wnt Signal liegt ein zytosolischer Proteinkomplex aus Axin, *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) und der Kinase GSK3 $\beta$  vor, welcher den proteasomalen Abbau von  $\beta$ -Catenin vermittelt. Bindet dagegen ein Wnt-Signalprotein an seinen entsprechenden Rezeptor (*Frizzled/low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein, Frizzled/LRP*), wird der inhibitorische Proteinkomplex gehemmt, und in der Folge akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Zytosol und im Zellkern. Nukleäres  $\beta$ -Catenin kann dann mit Transkriptionsfaktoren wie *T cell-specific transcription factor* (TCF) interagieren, um die Genexpression zu regulieren (Logan and Nusse 2004). Fehlt einer Maus mit dem Transkriptionsfaktor 4 (Tcf4) ein entscheidendes Effektormolekül des intestinalen

Wnt-Signalwegs, können die intestinalen Stammzellen ihren proliferativen Status nicht erhalten. Fehlende Zellteilung führt dann zu einer reduzierten Krypten-/Villus-Architektur und schließlich zum Tod kurz nach der Geburt (Korinek, Barker et al. 1998). Wird demgegenüber der negative Regulator des Wnt-Signalwegs, APC, deletiert, führt das zu übermäßigen Proliferationsereignissen und einer resultierenden Vergrößerung der intestinalen Krypten (Andreu, Colnot et al. 2005). Entsprechend wird die übermäßige Aktivierung des Wnt-Signalweges mit der Entartung zur Tumorzelle kausal in Verbindung gebracht (Korinek, Barker et al. 1997, Morin, Sparks et al. 1997). Zusammenfassend ist der Wnt-Signalweg ein entscheidender Faktor bei der Kontrolle der intestinalen Zellproliferation.

Die aus den kontinuierlichen Zellteilungen in der unteren Krypte entstehenden Zellen fordern Raum, und der resultierende physikalische Druck treibt vermutlich die Migration der Epithelzellen entlang der Krypten-Villus-Achse an. Ausdifferenzierte IEZ wandern, mit Ausnahme der Paneth Zellen, an die Krypten-/Villus-Spitze, wo sie schließlich aus dem Epithelverband in das Darmlumen ausgestoßen werden und mittels Apoptose sterben. Dieses sogenannte *Shedding* wird überwiegend als passiver Prozess verstanden, der aus dem begrenzten Platzangebot und dem Druck der nachrückenden Epithelzellen resultiert. Insofern ist der mit dem Shedding einhergehende apoptotische Zelltod eine Konsequenz und keine Ursache des Herauslösens der IEZ aus dem Zellverband (Gunther, Neumann et al. 2013). Doch auch andere Zelltodprozesse lassen sich unter physiologischen Bedingungen im Darmepithel beobachten. So können IEZ in den Krypten des menschlichen Dickdarms Zeichen nekrotischen Zelltods aufweisen (Barkla and Gibson 1999).

### **1.1.3 Das Darmepithel und chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) repräsentieren die beiden häufigsten Krankheitsbilder von CED. Beide Formen sind langanhaltend und verlaufen schubweise, stellen sich dabei jedoch phänotypisch distinkt dar und sind in der Diagnosestellung komplex. Neben den klinischen Symptomen werden zur Diagnose und Bestimmung der Erkrankungsaktivität von CED auch endoskopische, histologische und radiologische Befunde erhoben. Spezifische Befallsmuster,

Komplikationen oder bestimmte Therapien indizieren den Einsatz weiterer diagnostischer Verfahren und/oder die konsiliarische Mitbetreuung von Ärzten anderer Fachdisziplinen (Baumgart 2009). Morphologisch stellt sich der MC als diskontinuierliche, fokale-fleckförmige, transmurale Entzündung der Mukosa dar, und die CU als diffuse panmukosale Entzündung mit einem kontinuierlich abnehmenden Gradienten von distal nach proximal (Hoffmann, Preiss et al. 2008, Dignass, Preiss et al. 2011).

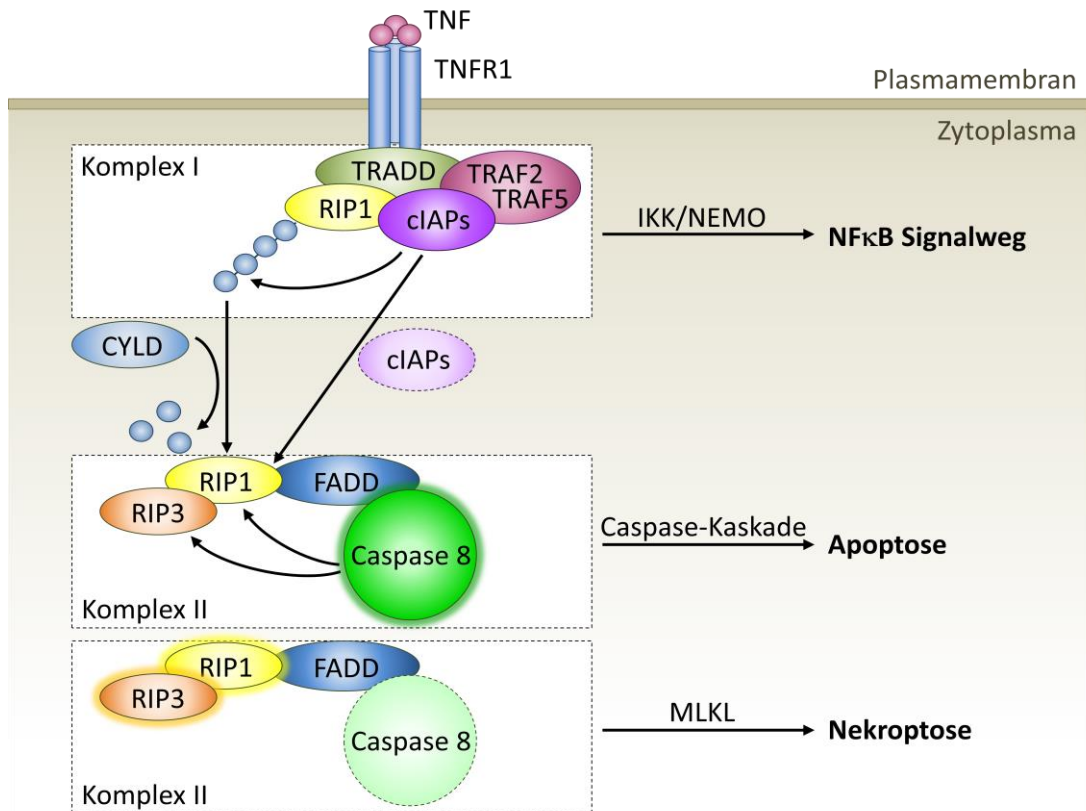
Da bis heute keine kurative Behandlung von CED existiert, beschränken sich die Therapien (medikamentös und/oder chirurgisch) bisher auf die Verringerung der Entzündungsaktivität mit dem Ziel, die klinischen Symptome zu verbessern. Langfristig soll die steroidfreie Remissionsphase der Erkrankung aufrechterhalten werden und Erkrankungs- sowie Therapiekomplikationen vorgebeugt werden. Die Medikation ist dabei grundsätzlich abhängig vom Ausmaß der Entzündung hinsichtlich Ausbreitung und Schweregrad. Auch eventuelle frühere Therapien und das Ansprechen des Patienten auf verabreichte Medikamente müssen beachtet werden (Baumgart 2009). Chirurgische Maßnahmen sind einerseits Notoperationen, welche bei lebensbedrohlichen Komplikationen wie Perforation, toxischem Megakolon oder refraktären Darmblutungen indiziert sind (Berg, Bahadursingh et al. 2002), als auch Methode der Wahl bei Dysplasien, Malignomen oder bei Unverträglichkeiten einer medikamentösen Therapie (Larson and Pemberton 2004, Itzkowitz, Present et al. 2005). Medikamentöse Therapien umfassen insbesondere Kortikosteroide (Budesonid, Prednisolon, Cortison), Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Cyclosporin, Tacrolimus, Methotrexat) und Immunmodulatoren (anti-TNF- $\alpha$ ) (Baumgart 2009, Burger and Travis 2011).

Der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) stellt einen zentralen, pleiotropen Entzündungsmediator bei Immunantworten allgemein und CED im Speziellen dar und vermittelt eine große Bandbreite an biologischen Wirkungen (Proliferation, Differenzierung, Zelltod). Je nach Kontext (lösliches oder Membran-gebundenes TNF- $\alpha$ , Interaktion mit den TNF-Rezeptoren 1 oder 2, Zeitdauer der TNF- $\alpha$  Exposition) werden andere zelluläre Signalwege aktiviert, deren Komponenten zudem noch überlappen können oder miteinander vernetzt sind (Gaur and Aggarwal 2003, Wajant, Pfizenmaier et al. 2003) (**Abbildung 1.2**). Bindet TNF- $\alpha$  an

den TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1), unterläuft dieser eine konformationelle Änderung und der sogenannte TNFR Komplex 1 (bestehend aus den Proteinen TRADD (*TNF receptor associated death domain*), RIP1 (*receptor-interacting protein 1*), cIAPs (*cellular inhibitor of apoptosis proteins*) sowie TRAF2 (*TNF receptor –associated factor 2*) und TRAF5) bildet sich. Die durch cIAP vermittelte Polyubiquitinylierung von RIP1 induziert daraufhin die Aktivierung des NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) Signalweges. Die fünf Transkriptionsfaktoren der NF $\kappa$ B Familie kontrollieren die Genexpression vieler Gene und sind somit an der Regulation von Immunantworten (adaptiv und angeboren) der zellulären Homöostase (Proliferation, Differenzierung, Überleben, Zelltod) beteiligt (Hayden, West et al. 2006). Wird RIP1 dagegen durch CYLD (*cylindromatosis*) deubiquitinyliert, oder werden die cIAP Proteine inhibiert, resultiert das in zwei unterschiedlichen Zelltodprogrammen. Dabei wird der TNFR internalisiert, und der sogenannte TNFR Komplex 2 bildet sich, bestehend aus den Proteinen TRADD, FADD (*FAS-associated protein with a death domain*), RIP1 und RIP3 sowie Caspase 8. Caspase 8 inaktiviert durch Spaltung RIP1 und RIP3 und leitet das Caspase-Kaskade-abhängige Zelltodprogramm der Apoptose ein. Ist die Funktion von Caspase 8 gestört, unterbleibt die Inaktivierung von RIP1 und RIP3, und selbige Kinasen vermitteln daraufhin durch Bildung des mikrofamentären Nekrosomen-Komplexes sowie die Rekrutierung von MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*) das Zelltodprogramm der Nekroptose (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010).

TNF-defiziente Mäuse zeigen weniger stark ausgeprägte Symptome einer experimentellen Darmentzündung als WT Tiere (Jones-Hall, Kozik et al. 2015). Im Menschen beruht die therapeutische Wirkung von monoklonalen anti-TNF- $\alpha$  Antikörper (Adalimumab, Infliximab) auf der Neutralisation des pro-inflammatorischen Tumor TNF- $\alpha$  und hat sich in der letzten Dekade als ein Eckpfeiler in der Behandlung von CED Patienten etabliert (Lee and Fedorak 2010).





**Abbildung 1.2: Signaltransduktion des TNFR1.**

Die Bindung von TNF $\alpha$  an den TNFR1 führt zur Bildung des TNFR Komplex 1, bei dem die Polyubiquitinylierung von RIP1 (vermittelt durch die cIAP Proteine) die Aktivierung des NF $\kappa$ B Signalweges induziert. Die Hemmung der cIAP Proteine oder die Deubiquitinylierung von RIP1 durch CYLD führt zur Bildung des TNFR Komplex 2, bei dem Caspase 8 durch Spaltung RIP1 und RIP3 inaktiviert und das Caspase-Kaskade-abhängige Zelltodprogramm der Apoptose einleitet. Ist die Funktion von Caspase 8 gestört, vermitteln die aktiven RIP1 und RIP3 stattdessen das Zelltodprogramm der Nekroptose [modifiziert nach (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010)].

#### 1.1.4 Das Darmepithel und zirkadiane Rhythmen

Zirkadiane Rhythmen (ZR) dienen dazu, den Organismus durch Optimierung physiologischer Prozesse an tageszeitlich wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Obwohl es weitere zyklische Rhythmen gibt (infradiane Rhythmen mit mehr als 24 h Schwingungsdauer, z.B. Winterschlaf des Siebenschläfers (Wilz and Heldmaier 2000), sowie ultradiane Rhythmen mit weniger als 24 h Schwingungsdauer, z.B. Wechsel von Aktivitäts- und Ruhephasen der Feldmaus (van der Veen, Minh et al. 2006), zählen ZR zu den am besten untersuchten. Der offensichtlichste ZR ist sicherlich der Schlaf-Wach-Rhythmus, aber auch viele endokrine und zentralnervöse Funktionen zeigen einen regulierten Tagesrhythmus

(Saper, Scammell et al. 2005, Refinetti 2010, Firsov, Tokonami et al. 2012, Morris, Yang et al. 2012, Tsang, Barclay et al. 2014).

ZR definieren sich durch wiederkehrende 24-Stunden Zyklen, die einerseits endogen reguliert sind, also unabhängig von Umgebungsfaktoren auftreten und erhalten bleiben, und die andererseits durch äußere Stimuli (Zeitgeber) mit der Umwelt synchronisiert werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Kompensation des Temperatureinflusses auf biochemische Prozesse von Bedeutung, so dass ZR auch bei wechselnden Temperaturbedingungen stabil bleiben (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005).

Im Darmepithel lassen sich verschiedene Rhythmen beobachten. So lieferten bereits frühe Arbeiten in Mäusen und Humanbiopsien Hinweise darauf, dass Zellteilung und -migration von IEC entlang der Kryptenachse zirkadian oszillieren (Scheving, Burns et al. 1978, Buchi, Moore et al. 1991, Marra, Anti et al. 1994, Qiu, Roberts et al. 1994). Auch die Tight-Junction Proteine Occludin und Claudin-1 für die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte zwischen IEC scheinen in der Maus zirkadian reguliert zu sein (Kyoko, Kono et al. 2014). Ein zirkadianer Rhythmus lässt sich auch bei der Produktion der anti-mikrobiellen Peptide Cryptdin 1 und Cryptdin 4 in der Maus beobachten (Froy, Chapnik et al. 2005). In der Gesamtheit betrachtet wird deutlich, dass vielfältige Funktionen des Darmepithels unter zirkadianer Kontrolle stehen (Pacha and Sumova 2013).

## **1.2 Die molekulare Uhr**

Der stärkste Zeitgeber für ZR ist der Faktor Licht, welcher infolge der Erdrotation um die eigene Achse als auch durch die Ausrichtung der Erdachse relativ zur Sonne den 24-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bedingt. Fast alle untersuchten Organismen, von Bakterien über Pilze, Algen, Pflanzen, Fliegen und Vögeln bis hin zu Säugetieren und dem Menschen zeigen zirkadiane biologische Rhythmen in unterschiedlichsten Parametern von Physiologie und Verhalten in Abhängigkeit des Hell-Dunkel-Zyklus. Die endogenen zellulären Mechanismen, welche die Antizipation der täglich wechselnden Umweltbedingungen ermöglichen, stellen somit einen Überlebensvorteil dar und kommen in unterschiedlichster Ausprägung und Komplexität vor (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005).

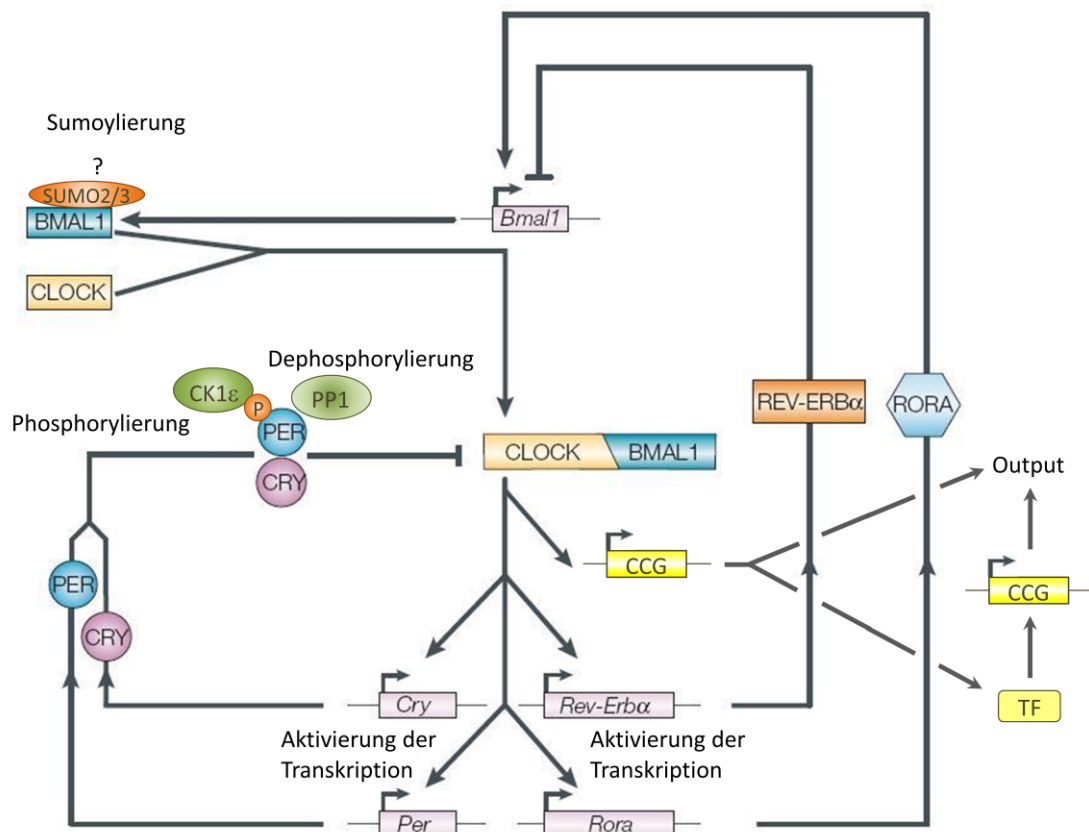
Bei einzelligen Cyanobakterien (z.B. *Synechococcus elongatus*) entsteht der zirkadiane Rhythmus durch die Interaktion von Kai Uhrengenen (*KaiA*, *KaiB*, *KaiC*), was in global rhythmischer Genexpression resultiert. Dabei bilden die KaiA/B und C Proteine einen hochmolekularen Komplex, das sogenannte *Kai Periodosome*, dessen oszillierendes Zusammenlagern und Auseinanderfallen den ZR bestimmt und zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Photosynthese und Stickstofffixierung kontrolliert (Kondo and Ishiura 2000, Johnson 2004, Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005).

Bei mehrzelligen Fliegen (z.B. *Drosophila melanogaster*) werden verschiedene gewebespezifische, periphere Oszillatoren autonom durch zyklische Zeitgeber synchronisiert. Die molekulare Uhr besteht dabei aus zwei gekoppelten transkriptionellen Feedbackschleifen: Heterodimere aus CLK (Clock) und den konstitutiv exprimierten CYC (Cycle) Proteinen aktivieren die Transkription der Uhrengene *per* (*period*), *tim* (*timeless*), *vri* (*vrille*) und *Pdp1 $\epsilon$*  (*PAR domain protein 1*). Während das Protein VRI schnell akkumuliert und die CLK Transkription inhibiert, wird selbige durch das langsam akkumulierende PDP1 $\epsilon$  gefördert. Gleichzeitig akkumulieren die PER und TIM Proteine langsam als Heterodimere und rückkoppeln dann über die Inhibition ihrer eigenen CLK/CYC abhängigen Transkription, so dass letztlich eine rhythmische Uhrengen Expression entsteht. Auf diese Weise werden sowohl Bewegungsaktivität (Aktivitätshöhepunkte am Morgen und Abend) als auch die Antwort auf Duftreize einem ZR unterworfen (Krishnan, Dryer et al. 1999, Grima, Chelot et al. 2004, Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005).

### **1.2.1 Die transkriptionelle-translationelle Rückkopplungsschleife**

Bei Säugetieren besteht die molekulare Uhr ähnlich wie bei Fliegen aus positiven und negativen Elementen, die über eine transkriptionelle-translationelle Rückkopplungsschleife miteinander gekoppelt sind (**Abbildung 1.3**). Heterodimere aus BMAL1 (*Brain and muscle ARNT-like protein 1*) und den konstitutiv exprimierten CLOCK (*Circadian locomotor output cycles protein kaput*) Proteinen aktivieren als Transkriptionsfaktoren durch Bindung an E-Box Promotorelemente die Uhrengene *Per* und *Cry* (*Cryptochrome*) sowie *Rora* (*Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor A*) und *Rev-Erb $\alpha$*  (*Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 1*). In einer ersten Rückkopplungsschleife akkumulieren die PER und CRY Proteine

langsam als Heterodimere und inhibieren dann ihre eigene CLOCK/BMAL1 abhängigen Transkription. Gleichzeitig gibt es eine zweite Rückkopplungsschleife zur Verstärkung der Oszillation, in der das Protein REV-ERB $\alpha$  schnell akkumuliert und die *Bmal1* Transkription inhibiert, während selbige durch das langsam akkumulierende RORA gefördert wird (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005). Um den entstehenden ZR robust und präzise aufrecht zu erhalten, existieren weitere Ebenen der Komplexität in der molekularen Uhr. So können drei verschiedene PER Proteine (PER1, PER2, PER3) mit zwei verschiedenen CRY Proteinen (CRY1, CRY2) interagieren (Panda, Hogenesch et al. 2002). Weiterhin können die PER und CRY Proteine durch Proteinkinasen wie CK1 $\epsilon$  (Casein Kinase 1) phosphoryliert und so in ihrer Aktivität reguliert werden, was unter anderem auch die Translokation in den Zellkern beeinflusst. Als Umkehrreaktion können diese Proteine durch Phosphatasen wie PP1 (Protein Phosphatase 1) mittels Dephosphorylierung auch gegensätzlich reguliert werden. Zudem ermöglicht die Phosphorylierung auch die Rekrutierung von Ubiquitinligasen, was die Proteinstabilität durch Ubiquitinylierung und proteasomalem Abbau reguliert (Gallego and Virshup 2007). Ein weiterer posttranslationaler Kontrollmechanismus ist die Sumoylierung von BMAL1. Diese findet rhythmisch statt, erfordert sowohl die Heterodimerisation von CLOCK als auch gleichzeitige Ubiquitinylierung und reguliert die Halbwertszeit von BMAL1. Die beteiligten SUMO Ligase(n) und Protease(n) *in vivo* sind jedoch noch nicht bekannt (Cardone, Hirayama et al. 2005, Lee, Lee et al. 2008). In der Gesamtheit entsteht eine sich selbst regulierende und erhaltende rhythmische Genexpression von Uhrengenen, wobei die zirkadianen Phasen der positiven Elemente (CLOCK, BMAL1) und der negativen Elemente (PER, CRY) gegensätzlich oszillieren (Hardin 2004).



**Abbildung 1.3: Die molekulare Uhr in Säugetieren.**

Die molekulare Uhr besteht aus einem Netzwerk miteinander verknüpfter Rückkopplungsschleifen aus Aktivatoren (CLOCK, BMAL1) und Inhibitoren (PER, CRY). Zusätzliche Ebenen der Kontrolle (u.a. REV-ERB $\alpha$  und RORA Feedbackschleifen; Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Sumoylierung von Uhrengenproteinen) stellen Genauigkeit und Robustheit des zirkadianen Outputs (Uhrengenkontrollierte Gene, CCG; Transkriptionsfaktoren, TF) sicher [modifiziert nach (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005)].

### 1.2.2 Der zentrale Schrittmacher

Diese molekulare Uhr, auch Oszillator genannt, ist konserviert in verschiedensten Typen von Körperzellen und wird durch ein hierarchisches System koordiniert. Dabei werden jeweils die zellulären Oszillatoren innerhalb eines Gewebes/Organs synchronisiert und funktionieren dann als periphere Uhr. Zudem gilt der Suprachiasmatische Kern (*suprachiasmatic nucleus*, SCN) im Hypothalamus des Gehirns als der zentrale Schrittmacher, dessen zirkadianer Rhythmus durch das Licht mit der Umwelt synchronisiert wird und der die peripheren, Gewebe- oder Organspezifischen Uhren damit in Einklang bringt (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005). Die zentrale Stellung des SCN wird deutlich aus *in vivo* Untersuchungen an Hamstern die zeigen, dass die Explantation des SCN die Tiere zirkadian

desynchronisiert (arrhythmisch macht). Wird anschließend wieder SCN Gewebe eines Spendertieres transplantiert, wird der ZR des Tieres wieder hergestellt (Ralph, Foster et al. 1990). Auch arrhythmische *Cry1/Cry2* Doppel-Knockout Mäuse zeigen nach Transplantation von SCN Gewebe aus Wildtyp Mäusen wieder rhythmische Aktivitätsprofile (Sujino, Masumoto et al. 2003). Der SCN besteht dabei aus individuellen Neuronen mit zellautonomen molekularen und physiologischen Oszillationen, die aber miteinander gekoppelt sind und in ihrer Gesamtheit die Funktion des zentralen Schrittmachers übernehmen (Quintero, Kuhlman et al. 2003). Die Kommunikation zwischen diesen Neuronen erfolgt durch synaptische und parakrine Mechanismen ( $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP [cyclisches Adenosinmonophosphat (O'Neill and Reddy 2012)], VIP [Vasoaktives intestinales Peptid (Harmar 2003)] oder Zell-Zell-Kanäle [Gap Junctions (Bollinger and Schibler 2014)]). Durch Photorezeptoren des Auges wird die Information Licht aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) in den SCN weitergeleitet. Die Notwendigkeit dieses Prozesses wird deutlich aus Untersuchungen an Hamstern, bei denen spezifisch der RHT chirurgisch durchtrennt wurde und die daraufhin einen frei laufenden zirkadianen Rhythmus zeigen, also einen von der endogenen Uhr bestimmten Rhythmus, der nicht mehr durch den Zeitgeber Licht mit der Umwelt synchronisiert wird (Johnson, Moore et al. 1988). In Säugetieren gibt es neben dem SCN bislang keine Belege für weitere (periphere) Gewebe, die direkt vom Zeitgeber Licht beeinflusst werden, was die Stellung des SCN als zentrale Verbindung zwischen der Umwelt und der molekularen Uhr verdeutlicht (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005). Damit erfüllt der SCN zwei Aufgaben: die Steuerung von Aktivitäts- und Ruhephasen in Abhängigkeit des Hell-Dunkel-Zyklus und die Koordination der peripheren Uhren. Die Steuerung der peripheren Uhren kann dabei neuronal oder hormonell erfolgen, ist im Detail jedoch noch weitgehend unbekannt. Hinweise auf eine humorale Beteiligung gibt es durch Untersuchungen an Hamstern, bei denen semipermeabel eingekapselte SCN Transplantate in vorher SCN explantierte Tiere eingesetzt wurden. Obwohl sich keine neuronalen Verbindungen zwischen Transplantat und Wirt ausbilden konnten, wurden in diesen Tieren rhythmische Aktivitätsprofile wiederhergestellt (Silver, LeSauter et al. 1996). Studien an Mäusen zeigten, dass die aus dem SCN stammenden Signalpeptide PK2 (Prokineticin 2),

TGF $\alpha$  (Transformierender Wachstumsfaktor alpha) und CLC (*Cardiotrophin-like Cytokine*) an der zirkadianen Regulation physiologischer Körperfunktionen wie Bewegungsaktivität, Körpertemperatur und Energiemetabolismus beteiligt sind (Li, Hu et al. 2012). Auch Glukokortikoidhormone (Cortisol beim Menschen und Corticosteron bei Nagern) und der SRF (Serum-Response-Faktor) Signalweg scheinen an der Regulation peripherer Uhren durch den SCN mitzuwirken (Le Minh, Damiola et al. 2001, Gerber, Esnault et al. 2013). Eine Besonderheit dieses hierarchischen Netzwerkes ist die Möglichkeit anderer Zeitgeber als dem Licht. So gibt es zunehmende Evidenzen für einen Einfluss des Zeitpunktes der Nahrungsaufnahme auf periphere Uhren von Leber, Pankreas, Niere, Herz, Lunge und Skelettmuskulatur. Temporär veränderte Fütterungsregimen in Nagern induzieren eine Phasenverschiebung der zirkadianen Genexpression in diesen peripheren Organen, wodurch diese vom ZR des SCN entkoppelt werden (Damiola, Le Minh et al. 2000, Stokkan, Yamazaki et al. 2001). In Verbindung mit einer zusätzlichen Kalorienrestriktion jedoch ist eine Rückkopplung auf die Genexpression des SCN zu beobachten, so dass die Nahrungsaufnahme über Beeinflussung metabolischer Prozesse als potentieller Zeitgeber den ZR eines Organismus mit beeinflusst (Challet, Caldelas et al. 2003, Mendoza, Graff et al. 2005).

### **1.2.3 Zirkadian gesteuerte Genexpression**

Die Übertragung des ZR auf die globale Genexpression (zirkadianer biologischer Output) kann dann direkt oder indirekt erfolgen, und derart beeinflusste Gene werden Uhrengen-kontrollierte Gene (*clock controled genes*, CCG) genannt. Über E-Box Sequenzen in Promotoren entsprechender Gene können CLOCK und BMAL1 direkt als Transkriptionsfaktoren wirken, so dass die Transkription dieser Gene phasengleich zyklisch zu den PER Proteinen erfolgt. Zusätzlich können Uhrengenproteine die Transkription weiterer Transkriptionsfaktoren regulieren, was deren Zielgene ebenfalls dem zirkadianen Rhythmus unterwirft, jedoch mit anderen Phasen (Cermakian and Boivin 2003, Hardin 2004). Der Output der molekularen Uhr ist, was schon die Organisation in zentraler Schrittmacher und periphere Uhren vermuten lässt, gewebespezifisch verschieden. Von tausenden untersuchter Gene wurden viele hundert gefunden, deren Transkripte rhythmisch

oszillieren (Grundschober, Delaunay et al. 2001, Kornmann, Preitner et al. 2001, Akhtar, Reddy et al. 2002, Duffield, Best et al. 2002, Kita, Shiozawa et al. 2002, Panda, Antoch et al. 2002, Storch, Lipan et al. 2002, Ueda, Chen et al. 2002, Oishi, Miyazaki et al. 2003). Dabei zeigt der Vergleich zwischen den Geweben, dass lediglich 5-10 % des zellulären Transkriptoms ubiquitär rhythmisch organisiert sind (z.B. sowohl im SCN und der Leber, oder in Leber und Herz), darunter natürlich die Uhrengene selber. Das verdeutlicht, dass in einzelnen Geweben jeweils spezifisch die Gene einem ZR unterworfen sind, welche für die entsprechende physiologische Funktion von Bedeutung sind (Cermakian and Boivin 2003). Für den Darm konnte gezeigt werden, dass verschiedenste Prozesse der Homöostase und Barrierefunktion einer zirkadianen Kontrolle unterliegen. So werden die für die Pathogen- Erkennung wichtigen Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptor*, TLR) des angeborenen Immunsystems auf IEZ rhythmisch exprimiert und ermöglichen dem Epithel auf diese Weise, physiologische Interaktionen mit der Mikrobiota mit dem Zellzyklus zu koordinieren (Mukherji, Kobiita et al. 2013). Auch die Expression von Defensinen, anti-mikrobielle Peptide der Maus, zeigt einen ZR (Froy, Chapnik et al. 2005). Weitere zirkadian regulierte Funktionen im GIT sind Proliferation und Migration von IEZ (Scheving, Burns et al. 1978, Buchi, Moore et al. 1991, Marra, Anti et al. 1994, Qiu, Roberts et al. 1994), Verdauung und Nährstoffresorption (Stevenson, Ferrigni et al. 1975, Stevenson, Sitren et al. 1980, Saito, Terada et al. 2008) sowie Darmmotilität (Narducci, Bassotti et al. 1987, Hoogerwerf 2010, Hoogerwerf, Shahinian et al. 2010).

#### **1.2.4 Zirkadiane Rhythmusstörungen und Erkrankungen**

Zusammenfassend bestehen zirkadiane Uhren aus verschiedenen Oszillatoren, die jedoch unterschiedlich koordiniert werden. In einzelligen Cyanobakterien ist mindestens ein Oszillator mit dem Zeitgeber Licht synchronisiert und kann somit als zentraler Schrittmacher für untergeordnete zelluläre Oszillatoren dienen. In multizellulären Fliegen gibt es keinen offensichtlichen zentralen Schrittmacher. Stattdessen lassen sich die gewebespezifischen Oszillatoren autonom vom Zeitgeber Licht synchronisieren. In höheren Organismen wie Säugetieren und dem Menschen gibt es einen zentralen, durch den Zeitgeber Licht synchronisierten



Schrittmacher, welcher seinerseits die peripheren zirkadianen Uhren koordiniert. In der Gesamtheit ermöglichen zirkadiane Uhren den Organismen, einen unabhängigen inneren zirkadianen Rhythmus aufrechtzuerhalten und mittels Zeitgebern, vor allem dem Licht in Form des Hell-Dunkel-Zyklus, mit der Umwelt zu synchronisieren.

Störungen der zirkadianen Rhythmik können zu erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Externe Rhythmusstörungen können z.B. bei Schichtarbeit, beim Jetlag und auch bei artifiziellen Lichtbedingungen beobachtet werden. Zugrunde liegt diesen Symptomen die Desynchronisierung zwischen der endogenen Uhr und der externen Zeit – bei Schichtarbeitern durch erzwungene Aktivität in der Schlafphase, beim Jetlag durch Reisen über Zeitzonen hinweg sowie bei Innen- und Außenbeleuchtungen zur Nachtzeit. Zirkadiane Disruption ist dabei unter anderem assoziiert mit einer erhöhten Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzinfarkt (Knutsson, Hallquist et al. 1999) und arteriellem Blutdruck (Scheer, Hilton et al. 2009), metabolischen Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes (Nedeltcheva and Scheer 2014) und Übergewicht (McFadden, Jones et al. 2014, Parsons, Moffitt et al. 2015) sowie Krebs (Davis, Mirick et al. 2001, Schernhammer, Laden et al. 2001). Auch gastrointestinale Störungen treten auf. So wurde in einer Studie von 1990 festgestellt, dass artifizielle Arbeitsumgebungen wie sitzenden Innentätigkeiten aber auch lange und irreguläre Arbeitszeiten wie Schichtarbeit Risikofaktoren für CED darstellen (Sonnenberg 1990). Weiterhin wurde Schichtarbeit assoziiert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Magengeschwüre (Segawa, Nakazawa et al. 1987) und der Entwicklung eines Reizdarmsyndroms (Nojkov, Rubenstein et al. 2010). Neben externen Rhythmusstörungen sind auch endogene Ursachen für eine zirkadiane Disruption möglich. So ist ein Polymorphismus im Uhrgen *Per3* (rs2797685) assoziiert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für und einem aggressiveren Verlauf von CED (Mazzocchi, Palmieri et al. 2012).

Tierexperimentelle Studien belegen diese assoziativen Zusammenhänge kausal. So entwickeln Mäuse mit einer Mutation im Uhrgen *Clock* Fettleibigkeit und ein metabolisches Syndrom (Turek, Joshu et al. 2005). Weiterhin beschleunigt sich in der Maus das Wachstum maligner Tumore um den Faktor 2-3 nach zirkadianer

Disruption infolge einer kompletten Gewebeschädigung des SCN (Filipski, King et al. 2002). Ebenfalls im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sowohl akuter und chronischer Schlafentzug durch erzwungene Bewegung im Laufrad (Modell für Schichtarbeit) als auch der Phasenwechsel des Hell-Dunkel-Zyklus (Modell für Jetlag) die Entzündungsaktivität einer experimentellen Colitis erhöht (Preuss, Tang et al. 2008, Tang, Preuss et al. 2009).

Die Verbesserung des Verständnisses, wie zirkadiane Rhythmen Physiologie und Verhalten beeinflussen und wie Störungen der zirkadianen Zeitgebung Krankheiten hervorrufen oder begünstigen, ist somit ein attraktives Ziel für die Forschung und könnte letztlich in besseren, chronomedizinisch angepassten Therapien münden.

### 1.3 Fragestellung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind laut aktuellem Wissensstand gekennzeichnet durch eine überschießende Immunreaktion auf der Basis einer genetischen Prädisposition und werden ausgelöst durch Umweltfaktoren. Schlafstörungen in vielfältigen Ausprägungen treten als überaus häufige Beschwerde bei CED Patienten auf, und werden als Ausdruck eines gestörten zirkadianen Rhythmus gedeutet. Zirkadiane Rhythmen ihrerseits werden durch die molekulare Uhr endogen erzeugt und durch Zeitgebersignale, insbesondere dem exogenen Faktor Licht, mit der Umwelt synchronisiert. Kausale mechanistische Zusammenhänge zwischen gestörten zirkadianen Rhythmen und der Pathogenese von CED sind jedoch nur unzureichend untersucht.

In dieser Arbeit soll im Mausmodell die Auswirkung eines genetisch determinierten, gestörten zirkadianen Rhythmus auf das Darmepithel und die Suszeptibilität für experimentelle intestinale Darmentzündung untersucht werden. Die zirkadiane Disruption resultiert dabei aus der Störung der molekularen Uhr infolge des konditionalen Knockouts der beiden Uhrengene *Per1* und *Per2*.

**Hypothese:** Zirkadiane Disruption beeinträchtigt die Homöostase des Darmepithels dahingehend, dass die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod von intestinalen Epithelzellen gestört ist. Dadurch kommt es zu Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Darmepithels und einer Verschlechterung der Barrierefunktion bereits unter gesunden/unbehandelten Bedingungen. Unter den Bedingungen einer experimentellen Darmentzündung führt die zirkadiane Disruption zu einer erhöhten Entzündungsaktivität.

#### **Fragen:**

1. Welchen Einfluss hat eine zirkadiane Disruption auf die Populationen absorptiver und spezialisierter IEZ, insbesondere auf Barriere-protective Paneth und Becherzellen?
2. Welchen Einfluss hat eine zirkadiane Disruption auf die intestinalen Prozesse der Zellproliferation und des Zelltods?
3. Bedingt eine zirkadiane Disruption eine schwerere Verlaufsform von experimenteller intestinaler Entzündung?
4. Lässt sich anhand der Ergebnisse ein molekularer Mechanismus postulieren?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Antikörper

Histologie/Immunfluoreszenz	
Kaninchen anti-Maus Lysozym C	1:100, GeneTex GTX62819
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	1:400, Invitrogen A-11012
Ratte anti-Maus Ki-67	1:100, BioLegend 652401

Elektronenmikroskopie	
Kaninchen anti-Maus RIP3	1:200, Enzo Life Sciences
Ziege anti-Kaninchen IgG, Gold-konjugiert (12 nm)	1:50, Jackson ImmunoResearch 112-205-167

Western Blotting	
Kaninchen anti-Maus RIP3	1:1000, Enzo Life Sciences ADI-905-242
Kaninchen anti-Lysozyme C	1:1000, GeneTex GTX62819
Kaninchen anti-Maus Cleaved Caspase-3	1:1000, Cell Signaling #9661
Kaninchen anti-Maus GSK-3 $\beta$	1:1000, Cell Signaling #9315
Kaninchen anti-Phospho-GSK-3 $\beta$	1:1000, Cell Signaling #9336
Kaninchen anti-Maus $\beta$ -Aktin	1:1000, Cell Signaling #4967
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	1:4000, Cell Signaling #7074

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Rezeptur
<b>Fixierlösung nach Monti-Graziadei</b>	0,06 M Na-Cacodylatpuffer 2% Glutaraldehyd (Serva) 0,6% Paraformaldehyd (Merck) 0,03% CaCl <sub>2</sub> (Sigma)
<b>Methylenblau-Azur II</b>	1 g Azur II (Merck) ad 100 ml destilliertes Wasser 1g Methylenblau (Merck) ad 100 ml 1% Natriumtetraborat (Merck)-Lösung 1:1 mischen, 60% Saccharose (Roth) zugeben und filtrieren

<b>Mowiol Einbettmedium</b>	12 g Mowiol (Polysciences) ad 30 ml destilliertes Wasser 60 ml 0,2 M TRIS-HCl-Puffer (2,42, g TRIS-HCl (Merck) ad 100 ml destilliertes Wasser, pH 8,5) zugeben langsam auf 90 °C erhitzen, 45 min Temperatur halten, dann langsam auf 50 °C abkühlen lassen und 30 g fluoreszenzfreies Glycerin (Merck) einrühren, pH 8,5 (Lagerung dunkel bei 4 °C)
<b>Na-Cacodylatpuffer (0,2 M Stammlösung)</b>	42,806 g Cacodylsäure-Natriumsalz (Roth) 1 g CaCl <sub>2</sub> (Sigma) 100 g Saccharose (Roth) ad 1 l destilliertes Wasser (pH 7,2)
<b>NP40-Puffer</b>	50 mM TRIS-HCl (Merck) 150 mM NaCl (Applichem) 1 mM EDTA (Sigma) ansetzen als 2-fach (100/300/2 mM) konzentrierte Stammlösung (pH 7,4), dann 1% Tergitol NP-40 (Sigma) 0,25% Natriumdesoxycholat (Sigma) 1:100 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) 1:50 Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma) 1:50 Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (Sigma) zugeben, in destilliertem Wasser
<b>PBS (5x Stammlösung)</b>	90 g NaCl (Applichem) 3,058 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck) 14,24 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Sigma) ad 2 l destilliertes Wasser (pH 7,4)
<b>SDS-Puffer (4x Stammlösung)</b>	250 mM TRIS-HCl (Merck) 40% Glycerol (Chemsolute) 200 mM DTT (Roth) 0,6% Bromphenolblau (Merck) pH 7,8
<b>TAE-Puffer (50x Stammlösung)</b>	2 M TRIS-HCl (Merck) 1 M Essigsäure (Roth) 50 mM EDTA (Sigma) in destilliertem Wasser, pH 8,0

## 2.2 Tiere und Tierhaltung

Alle Versuche wurden mit Per1<sup>Brd1</sup>/Per2<sup>Brd1</sup> Doppelmutanten (Per1/2) und/oder congenen Wildtypkontrollen (WT) des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Der Mausstamm C57BL/6J ist die weltweit gebräuchlichste Linie, mit vollständig sequenziertem Genom und einer Vielzahl an existierenden und zukünftig möglichen congenen Stämmen. C57BL/6 Mäuse sind einfach und gut zu züchten und robust

(Battey, Jordan et al. 1999). Per1/2 Mäuse sind charakterisiert durch eine Nullmutation in den Genen *Per1* und *Per2* und zeigen einen vollständig gestörten zirkadianen Rhythmus sowohl auf molekularer Ebene als auch bezüglich ihres Verhaltens. Trotzdem sind Per1/2 Mäuse Überlebens- und Entwicklungsfähig, fruchtbar und morphologisch nicht von Wildtyp Mäusen zu unterscheiden. Zusammengefasst lassen sich Per1/2 Mäuse halten und züchten wie normale Wildtyp Mäuse (Zheng, Albrecht et al. 2001).

Tierzucht und -haltung erfolgten in Barrierehaltung in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck. Die Mäuse wurden unter Vermeidung von Einzelhaltung in einem regulären 12 h Hell-Dunkel-Zyklus (12 h Helligkeit/12 h Dunkelheit, LD) in Macrolon Typ 3 Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG) auf staubfreiem Weichholzgranulat (LTE-E001, Abedd, Lab & Vet Service GmbH) gehalten. Ein pelletiertes Alleinfuttermittel (Altromin 1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) und Wasser standen den Tieren frei zugänglich zur Verfügung.

Alle Versuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Zeichen V 312-72241.122-1 (29-3/11)) in Übereinstimmung mit nationalem Recht (Tierschutzgesetz) und internationalen Richtlinien (GV-SOLAS, FELASA) durchgeführt.

### **2.2.1 DSS induzierte Kolitis**

*Dextran sodium sulfate* (DSS) ist das sulfatierte Natriumsalz von Dextranen und besitzt eine molekulare Masse von  $M_r=40000$ . Die Gabe von DSS Polymeren über das Trinkwasser stellt ein etabliertes Tiermodell für intestinale Entzündung dar und ähnelt in wichtigen immunologischen und histopathologischen Aspekten dem humanen CED, insbesondere der CU (Wirtz, Neufert et al. 2007).

Experimentelle Kolitis wurde in Mäusen mit einem Alter von 12-14 Wochen durch zyklische Gabe von 2% w/v DSS (Batch DB001-27, TdB Consultancy) über das Trinkwasser induziert. Dabei wurden drei Zyklen aus jeweils fünf Tagen Wasser mit DSS und fünf Tagen mit normalem Trinkwasser durchlaufen. Kontrollmäuse erhielten die gesamte Zeit über normales Trinkwasser. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Mäuse überwacht und klinische Parameter zur Beurteilung des Entzündungsgrades aufgenommen. Die klinische Beurteilung des

Krankheitsverlaufes erfolgte dabei durch Bewertung des Körpergewichtes (MAULalpha Präzisionswaage, Matutt), der Stuhlkonsistenz sowie des Vorhandenseins von okkultem Blut (Haemocult Test, Beckman Coulter GmbH) oder makroskopisch sichtbaren rektalen Blutungen/blutigem Stuhl (**Tabelle 2.1**). Alle Parameter wurden zu einem kumulativen Score (*Disease Activity Index*, DAI) verrechnet, der objektiv eine vergleichende Betrachtung der Kolitisintensität ermöglicht (Rath, Berger et al. 2012). Ein Gewichtsverlust von > 20% als objektives Kriterium sowie weitere subjektive Kriterien [Auffälligkeiten in Verhalten (z.B. Apathie) oder Erscheinung (z.B. Fellstruktur, Piloarrektion), Gesichtsausdruck des Schmerzes (Langford, Bailey et al. 2010)] als Zeichen übermäßigen Leidens wurden als individuelle Abbruchkriterien definiert.

An Tag 17 oder Tag 30 des Experimentes wurden die Mäuse narkotisiert, mittels hochauflösender Koloskopie untersucht und anschließend zur Biopsiegewinnung ohne Wiedererwachen aus der Narkose getötet.

**Tabelle 2.1: Kriterien zur Ermittlung des *Disease Activity Index* (DAI).**

Score	Gewichtsverlust (%)	Stuhlkonsistenz	(okkultes) Blut
0	keiner	normal	negativ
1	0-5		
2	5-10	weich	positiv, Blutungen
3	10-15		
4	15-20	Diarrhö	ausgeprägte Blutungen

[maximal erreichbarer Wert: 12, modifiziert nach (Rath, Berger et al. 2012)]

### 2.2.2 Mausendoskopie

Um den Entzündungsgrad der Mukosa makroskopisch zu bewerten, wurden die Tiere am Versuchsende mittels hochauflösender Videoendoskopie untersucht. Dazu wurden die Mäuse im Vorfeld durch intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun 2%, Bayer) und 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketavet 10%, Pfizer) narkotisiert, was ausreichend für eine tiefe Vollnarkose mit Analgesie und Muskelrelaxation für 30-45 min ist. Die Koloskopien wurden mit einem AidaVet mit Hopkins Optik (64019BA, beide Karl Storz) durchgeführt. Die Beurteilung der Kolitisintensität erfolgte dabei durch Bewertung der Verdickung der

Darmwand, Veränderungen des Blutgefäßsystems, der Granularität der Mukosa, dem Vorhandensein von Fibrinauflagerungen sowie der Stuhlkonsistenz (**Tabelle 2.2**). Alle Parameter wurden zu einem kumulativen Score (*murine endoscopic index of colitis severity*, MEICS) verrechnet, der objektiv eine vergleichende Betrachtung der Kolitisintensität ermöglicht (Becker, Fantini et al. 2006).

**Tabelle 2.2: Kriterien zur Ermittlung des *murine endoscopic index of colitis severity* (MEICS).**

Score	Verdickung Kolonwand	Veränderung Blutgefäße	Granularität Mukosa	Fibrin Auflagerung	Konsistenz Stuhl
0	transparent	normal	keine	kein	normal
1	mäßig	mäßig	mäßig	gering	noch geformt
2	ausgeprägt	ausgeprägt	ausgeprägt	mäßig	ungeformt
3	intransparent	Blutungen	extrem	extrem	verteilt

[maximal erreichbarer Wert: 15, modifiziert nach (Becker, Fantini et al. 2006)]

### 2.2.3 Desynchronisation von Mäusen

Um den zirkadianen Rhythmus von WT Mäusen extern (exogen) zu desynchronisieren, wurden Tiere für zwei bis vier Wochen individuell unter konstantem Licht (400 lux) gehalten.

C57BL/6J WT Mäuse zeigen Aktivitäten (Lafraddrehungen) fast ausschließlich in der Dunkelheit, während sie bei Licht überwiegend ruhen/schlafen. Als starker externer Signalgeber lässt sich durch veränderte Lichtbedingungen dieser zirkadiane Rhythmus verschieben oder komplett desynchronisieren (Jud, Schmutz et al. 2005). So lässt sich unter kontrollierten Laborbedingungen der für die Maushaltung normale 12 h Hell-Dunkel-Zyklus (*light-dark*, LD) in Bedingungen mit konstantem Licht (*light-light*, LL) wandeln. Durch die kontinuierlichen Lichtsignale an den SCN wird dieser zentrale Schrittmacher arrhythmisch und die zirkadianen Verhaltensweisen von Mäusen desynchronisiert (Ohta, Yamazaki et al. 2005).

Durch Überwachung von Lafraddrehungen mit der ClockLab Software (Actimetrics) wurden mittels  $\chi^2$  Periodogrammen Aktivitätsprofile der Mäuse erstellt. Lag die Lafradaktivität der Tiere in fünf aufeinander folgenden Tagen außerhalb des physiologischen Zeitrahmens, wurden die Tiere als zirkadian gestört betrachtet. Als



Kontrolltiere wurden individuell gehaltene WT Mäuse gleichen Alters und Geschlechts mit regulärem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus verwendet.

#### **2.2.4 Injektionen**

Für Injektionen wurden die Mäuse im Fixiergriff gehalten und die jeweilige Substanz (TNF- $\alpha$ , BrdU, Nec-1) mittels 1 ml Spritze und 26 G Kanüle intraperitoneal verabreicht.

#### **2.2.5 BrdU Inkorporationstest**

BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) ist ein Thymidin-Analogon und kann, nach Aufnahme in die Zelle, bei der DNA-Replikation in phosphorylierter Form an Stelle von Desoxythymidintriphosphat in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Anschließend lässt sich die BrdU markierte DNA mittels spezifischer monoklonaler Antikörper per Immunfluoreszenz nachweisen und somit proliferierende Zellen identifizieren (Gratzner 1982).

Die *in vivo* Bestimmung der Zellproliferation von intestinalen Epithelzellen (IEZ) wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit (BrdU Labeling and Detecton Kit I, Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je neun Per1/2 und WT Mäusen wurden 10  $\mu$ l/g Körpergewicht der BrdU Stocklösung (1000-fach konzentriert in 10 mM PBS, 0,2  $\mu$ m steril filtriert) intraperitoneal injiziert. Jeweils 2, 10 und 24 Stunden nach Injektion wurden 3 Mäuse pro Genotyp getötet, Biopsien von Ileum und Kolon entnommen und Gefrierschnitte mittels Immunfluoreszenz (siehe **2.4**) auf inkorporiertes BrdU getestet.

#### **2.2.6 Gewinnung von Biopsien**

Licht ist das stärkste Umweltsignal (Zeitgeber), welches die endogene zirkadiane Uhr beeinflusst und mit dem täglichen, 24-stündigem Hell-Dunkel-Zyklus synchronisiert. Die Zeit wird daher als Zeitgeber Zeit (*Zeitgeber time*, ZT) angegeben, wobei ZT0 definiert ist als Beginn der Hellphase und ZT12 dem Beginn der Dunkelphase entspricht (Jud, Schmutz et al. 2005). Der Zeitpunkt eines Experimentes oder auch der Zeitpunkt der Biopsiegewinnung ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn Fragestellungen des zirkadianen Rhythmus (z.B. zirkadian

regulierte Gene) untersucht werden sollen. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation zwischen ZT4 und ZT6 getötet.

Direkt im Anschluss wurde das Abdomen durch einen Kreuzschnitt eröffnet. Vollblut wurde mittels Herzpunktion gewonnen, zur Gerinnung 20 min auf Eis gelagert und anschließend 5 min bei 4°C und 10,000 x *g* zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Der Darm wurde in seiner gesamten Länge freipräpariert, entnommen und die Kolonlänge bestimmt. Ileum und Kolon wurden mit eiskühlem PBS gespült. Biopsien von Ileum, Kolon und Leber wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Weiterhin wurden Ileum- und Kolonproben zur histologischen Auswertung in 4% w/v Paraformaldehyd fixiert. Ileum- und Kolonbiopsien mit einer Oberfläche von 1 mm<sup>2</sup> wurden für die Elektronenmikroskopie in entsprechenden Lösungen (siehe 2.3) bei 4°C fixiert.

### **2.3 Elektronenmikroskopie**

Seit ihrer Entwicklung in den frühen 1940er Jahren wird die Elektronenmikroskopie für verschiedenste Untersuchungen in der Strukturbiologie erfolgreich eingesetzt. Beruhend auf der Absorption und Streuung eines Elektronenstrahls beim Durchgang durch dünne Proben in einem Vakuum lassen sich Strukturen von Zellen bis hin zu einzelnen Organellen und Molekülen mit einer Auflösung bis in den Subnanometer-Bereich darstellen (Winey, Meehl et al. 2014).

Für die konventionelle Elektronenmikroskopie wurden Ileumbiopsien in Fixierlösung nach Monti-Graziadei fixiert (Graziadei and Graziadei 1979). Nach Spülen in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer für 30 min und der Osmierung mit 2% w/v OsO<sub>4</sub> (Roth) in Na-Cacodylatpuffer für 2 h wurden die Proben in Ethanol (30-100% in 10% Schritten für je 30 min, Universität zu Lübeck) entwässert und schließlich über das Intermedium Propylenoxid (Sigma) in das Kunstharz Araldit (Fluka) eingebettet. Von den entstandenen Blöcken wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Leica) zunächst Semidünnschnitte von 0,5 µm Dicke angefertigt und zwecks Übersichtfärbung mit Methylenblau-Azur II nach Richardson gefärbt (Richardson, Jarett et al. 1960). Dazu wurden die Schnitte auf Superfrost Plus Objektträger (Thermo Scientific) aufgebracht, mit Methylenblau-Azur II überschichtet, zwei bis

fünf Minuten bei 80°C auf einem Heizblock (Gerhardt) inkubiert, mit destilliertem Wasser gespült und schließlich in Entellan (Merck) unter Deckgläsern (Thermo Scientific) eingebettet. Nach Verifikation des Anschnittes des Kryptenbodens (Vorhandensein von Granula-haltigen Panethzellen) am Lichtmikroskop (BH-2, Objektiv Splan 100x/113372, beide Olympus) wurden die Blöcke mit einem Skalpell getrimmt und mittels Ultramikrotom (Ultracut E, Leica) Ultradünnschnitte von 60-80 nm Dicke angefertigt und auf Nickel Grids (150 mesh, Plano) übertragen. Die Kontrastierung mittels Ultrastainer (EM AC20, Leica) erfolgte dann mit 0,5% w/v Uranylacetat (Ultrastain 1) und 1% w/v Bleicitrat (Ultrastain 2, beides Laurylab).

Die Immunogoldfärbung wurde modifiziert nach der von Griffith beschriebenen Methode durchgeführt (Griffiths 1993). Biopsien vom Ileum wurden zunächst für 3 h in 5% w/v Paraformaldehyd (Merck)/0,2 M PIPES (Sigma) fixiert, für 12-24 h in 3% Polyvinylpyrrolidon (Agar Scientific)/2,3 M Saccharose (Roth) kryogeschützt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ultradünnschnitte von 60-80 nm Dicke wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut R mit EM FCS, beide Leica) angefertigt und mittels Transfersaccharose auf Kupfer/Palladium Grids (100 mesh, Plano) übertragen. Anschließend wurden die Schnitte mit 10% v/v FCS (Life Technologies) in PBS geblockt und je 45 min mit einem Kaninchen anti-Maus RIP3 Primärantikörper (1:200, Enzo Life Sciences) und einem Gold-konjugierten (12 nm) Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:50, Jackson ImmunoResearch) in PBS mit 5% v/v FCS inkubiert, jeweils nach 5-maligem Waschen in PBS. Nach einem 3-maligen finalen Waschritt in destilliertem Wasser wurden die Schnitte zuletzt mit 0,4% Uranylacetat (Merck) in 0,36% Glutaraldehyd (Serva)/1,62% Methylcellulose (Sigma) kontrastiert und getrocknet.

Die Bildgebung erfolgte schließlich am Transmissionselektronenmikroskop (JEM-1011, Jeol) mit der Software ITEM 5.0 (Build 1223, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

## **2.4 Histologie und Immunfluoreszenz**

Ileum- und Kolonbiopsien wurden 24-48 h in 4% Paraformaldehyd (Merck) fixiert, mit Leitungswasser gespült und in Ethanol (3x 70%, 80%, 90%, 3x100 %, je min. 2 h und max. 12 h, Universität zu Lübeck) entwässert. Anschließend wurden die

Biopsien paraffiniert (4x, je min. 2h und max. 12 h, Roth) und in Blöcke gegossen. Schnitte der paraffinierten Ileum- und Kolonbiopsien wurden am Mikrotom (HN40, Leica) mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Thermo Scientific) aufgebracht. Anschließend erfolgte die Färbung mittels HE [Hämatoxylin/Eosin, Waldeck (Fischer, Jacobson et al. 2008)], PAS-Reaktion [*periodic acid-Schiff*, Roth (Mc 1946)] oder Alcianblau [8 GS, Serva (Lev and Spicer 1964)] nach Standardmethoden (Lang 2006). Nach der Färbung wurden die Schnitte in Entellan (Merck) unter einem Deckglas (Thermo Scientific) eingebettet und dunkel bei RT gelagert.

Die Bildgebung für die Lichtmikroskopie erfolgte am Mikroskop Axiophot unter Nutzung der Digitalkamera AxioCam, den Objektiven Plan-Neofluar (40x/0,75 440341 und 20x/0,50 440351) sowie der Software AxioVision (V 4.6.1.0, alle Carl Zeiss).

Gefrierschnitte von in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Ileum- und Kolonbiopsien wurden am Mikrotom (CM3050 S, Leica) mit einer Dicke von 6 µm angefertigt, auf Superfrost Plus Objektträger (Thermo Scientific) aufgebracht und bei -20°C in einer 1:1 Mischung von Aceton (Roth) und Methanol (J. T. Baker) fixiert. Anschließend erfolgten die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern (siehe Antikörperliste) sowie die Kernfärbung mit den DNA-Farbstoffen DAPI (1:10000, Thermo Fischer 62248) oder Hoechst (1:4000, Cambrex PA-3014), jeweils nach einem Waschschrift (3x 5 min) in PBS mit 0,5% v/v Tween 20 (Roth). Die TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Färbung zum Nachweis des Zelltods wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit (ApopTag Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Chemicon) nach Herstellerangaben an Gefrierschnitten durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Schnitte in Mowiol (Polysciences) unter einem Deckglas (Thermo Scientific) eingebettet und dunkel bei RT gelagert.

Die Bildgebung für die Immunfluoreszenz erfolgte am Mikroskop Axioskop 2 plus (Carl Zeiss) unter Nutzung der Digitalkamera DP72 (Olympus), den Objektiven Plan-Apochromat (20x/0,75 440649 und 10x/0,45 440639, beide Carl Zeiss) sowie der Software cellsens Standard 1.5 (Olympus). Die Belichtung wurde derart gewählt, dass die Hintergrundfärbung minimiert war.

## **2.5 Protein-Analytik**

### **2.5.1 Proteinisolation und Proteinbestimmung**

Der Gesamtproteingehalt von Gewebe- oder Zelllysaten wurde mit dem Roti-Quant Universal Reagenz (Roth), basierend auf der Biuret-Reaktion, nach Herstellerangaben bestimmt. Zellen in Suspension wurden mit PBS gewaschen, um FCS-Rückstände aus dem Medium zu entfernen, und nach Zentrifugation (700 rpm, 5 min, Sigma 2K15) als Pellet in NP40-Puffer resuspendiert/lysiert. Gewebebiopsien wurden mittels eines Glas-Gewebe-Zerkleinerers (Kimble Chase) in NP40-Puffer auf Eis homogenisiert/lysiert. Die Lysate wurden zunächst kurz zentrifugiert (10000 rpm, 2 min, Sigma 2K15), um Zellwandtrümmer zu sedimentieren. Anschließend wurden die Lysate sowie die Standardproben (BSA (Applichem) in destilliertem Wasser, höchster Standard 1000 µg/ml, 2-fache Serienverdünnung bis 7,8 µg/ml) sowie die Negativkontrolle (destilliertes Wasser) als Doppelbestimmung 1:1 mit dem Roti Quant Reagenz (ein Teil Reagenz 1 und fünfzehn Teile Reagenz 2) verdünnt und 15 min bei 60 °C in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Über die Messung der Absorption bei 492 nm am Spektralphotometer µQuant (BioTek) konnte dann der Proteingehalt der Proben anhand der Standardkurve berechnet werden.

### **2.5.2 Western Blotting**

Der Western Blot ist der Transfer von Proteinen auf ein Trägermedium mit dem Ziel der Sichtbarmachung z.B. mittels spezifischer Antikörper (Towbin, Staehelin et al. 1979) nach vorheriger elektrophoretischer Auftrennung des Proteingemisches z.B. mittels SDS-PAGE [*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Laemmli 1970)].

Jeweils 40 µg Proteingemisch und 5 µl 4x SDS-Puffer wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 µl gebracht und 5 min bei 95°C im Heizblock (BBA, Grant Boekel) denaturiert und auf eine einheitlich negative Ladung gebracht. Nach Beladung der Polyacrylamid-Gele (Criterion TGX Precast Gel 4-15%) mit den Proben sowie einem entsprechenden Größenmarker (Precision Plus Protein Dual Color) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine für ca. 20-40 min bei 230 V in einer Elektrophoresekammer (Mini-Protean II mit Power Pac Basic, alles

Biorad). Als Laufpuffer diente ein TRIS-Glycin-Puffer (25 mM TRIS-HCl (Merck), 192 mM Glycerin (Chemsolute), in destilliertem Wasser, pH 8,3) mit 0,1% w/v SDS (Sigma) zur Aufrechterhaltung der denaturierenden Umgebung.

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf 0,2 µm Nitrozellulosemembranen erfolgte dann durch ein elektrisches Feld mit dem Trans-Blot Turbo Transfersystem (beides Biorad) für 7 min bei 2,5 A und 25 V. Die restliche Bindungskapazität der Membran wurde anschließend mit 5% w/v Magermilch (Applichem) in T-TBS Puffer (20 mM TRIS-HCl (Merck), 140 mM NaCl (Applichem), 0,1% v/v Tween 20 (Roth), in destilliertem Wasser, pH 7,6) für 60 min bei RT geblockt. Der Nachweis der gewünschten Proteine erfolgte dann nach einem Waschschrift (2x 5 min in T-TBS) durch Inkubation mit einem entsprechenden spezifischen Primärantikörper (siehe Antikörperliste) in T-TBS bei 4°C über Nacht. Nach einem weiteren Waschschrift, der Inkubation mit einem passenden, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Antikörperliste) in T-TBS für 1 h bei RT und einem letzten Waschschrift folgte schließlich der Nachweis der Protein-Antikörper-Konjugate durch eine Chemilumineszenz-Reaktion. Dazu wurden die Membranen auf einer Glasplatte mit einer HRP-Substratlösung aus 1:1 Peroxid-Lösung/Luminol-Reagenz (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat, Millipore) überschichtet und mittels eines Geldokumentationssystems (Intelligent Dark Box II, LAS-1000 Kamera, LAS-1000 Pro (V 2.6) Software, alles Fujifilm) bei einer Belichtungszeit von 10-180 sec ausgewertet. Anschließend wurde die Intensität der Banden mit ImageJ (Version 1.46r, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) densitometrisch bestimmt.

### **2.5.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

Die Bestimmung von Zytokinen aus Mausseren erfolgte mit kommerziell erhältlichen Sandwich ELISA Kits DuoSet (Mouse IL-1β/IL-1F2, Mouse CXCL1/KC) und dem zugehörigen Ergänzung-Kit (Ancillary Reagent Kit 2, alle R&D Systems) nach Herstellerangaben. 96-well Mikrotiterplatten wurden dabei über Nacht und bei RT mit dem jeweiligen Capture Antikörper (Ratte anti-Maus IL-1β: 4 µg/ml; Ratte anti-Maus KC: 2 µg/ml) in PBS beschichtet. Nach 3-maligem Waschen mit 0,05% v/v Tween 20 in PBS folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% w/v

BSA in PBS für 1 h bei RT, gefolgt von erneutem Waschen. Anschließend wurden die in PBS mit 1% w/v BSA verdünnten Serum- (1:2 bis 1:8) und Standardproben (rekombinantes Maus IL-1 $\beta$ /KC, höchster Standard 1000 pg/ml, 2-fache Serienverdünnung bis 15,6 pg/ml) sowie die Negativkontrolle (1% w/v BSA in PBS) als Doppelbestimmung für 2 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Platten erfolgte die Inkubation mit den biotinylierten Detektionsantikörpern (Ratte anti-Maus IL-1 $\beta$ : 1,5  $\mu$ g/ml; Ratte anti-Maus KC: 200 ng/ml) für 2 h bei RT, gefolgt von einem erneuten Waschschrift. Nach 20 minütiger Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter HRP bei RT und im Dunkeln sowie einem weiteren Waschschrift folgte die Zugabe der Substratlösung (TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) und Wasserstoffperoxid). Nach 20 min Inkubation bei RT und im Dunkeln wurde die von der HRP katalysierte Oxidierung des TMB zum entsprechenden Diimin (Farbumschlag nach blau) durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure gestoppt (Farbumschlag nach gelb) und die Absorption bei 450 nm (Korrektur bei 540 nm) am Spektralphotometer  $\mu$ Quant (BioTek) gemessen.

## **2.6 Nukleinsäuren-Analytik**

### **2.6.1 Isolation genomischer DNA**

Zur Genotypisierung der Per1/2 Doppelmutanten wurde aus Schwanzspitzen- oder Ohrstanzbiopsien genomische DNA nach Herstellerangaben mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) gewonnen. Dabei wurden die Gewebebiopsien mittels Gewebe-Zerkleinerer (Kimble Chase) in im Kit enthaltenen Lysispuffer homogenisiert. Das auf Spinsäulen basierende System beruht auf dem Verdau der RNA mittels Rnase A und der Bindung der DNA an eine Silikamembran zwecks Waschens. Anschließend wird die DNA in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke eluiert und kann dann (unmittelbar oder nach Lagerung bei -20 °C) für Downstream-Anwendungen eingesetzt werden.

### **2.6.2 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

Für die Genotypisierungs-PCR wurden je Ansatz 10  $\mu$ l DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 3  $\mu$ l DNA, 0,4  $\mu$ l Vorwärtsprimer und je 0,2  $\mu$ l beider Rückwärtsprimer (alle Biomers, **Tabelle 2.3**) mit Nuklease- und Nukleinsäure-freiem

Wasser (Thermo Scientific) auf 20 µl aufgefüllt. Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte dann im T Gradient Thermocycler (Whatman Biometra, **Tabelle 2.3**). Mittels Gelelektrophorese wurden im Anschluss die Bandengrößen der Amplifikate anhand einer DNA-Leiter bestimmt, um Rückschluss auf den Genotyp ziehen zu können. Dazu wurden Agarosegele (1,5 % Agarose (Gibco) und 0,0032 % Ethidiumbromid (Sigma) in 1x TAE-Puffer) mit 5 µl DNA-Leiter (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific) sowie je 10 µl der in Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific) verdünnten Amplifikate (2 µl Ladepuffer + 10 µl Amplifikat) beladen. Die Auftrennung nach Größe erfolgte dann für 30 min bei 90 V im Easy Cast Elektrophoresesystem (B1A und 3000 Xi, Angewandte Gentechnologie Systeme und Biorad). Zur Geldokumentation wurde ein UV-Licht-Kamerasystem (Dunkelkammer, UST-20 M-BK UV-Flächenstrahler, Rainbow TV Zoom Lens S6X11 Kamera, alles Intas) und der Thermodrucker P93DW (Mitsubishi) genutzt.

**Tabelle 2.3: Genotypisierungsprotokolle für Per1 und Per2.**

	Per1 Genotypisierung	Per2 Genotypisierung
Primer:	for: TTGCCTACAGCCTCCTGAGT rev1: AGAACTGAGGACCCAAGCTG rev2: GGGGAACTTCCTGACTAGGG	for: GCTGGTCCAGCTTCATCAACC rev1: GAACACATCCTCATTCAAAGG rev2: CGCATGCTCCAGACTGCCTTG
Cycler- Programm:	95 °C – 5 min 95 °C – 30 sec 65 °C – 30 sec 72 °C – 60 sec 72 °C – 2 min 4 °C	95 °C – 5 min 95 °C – 30 sec 61 °C – 30 sec 72 °C – 60 sec 72 °C – 2 min 4 °C
	} 33 Zyklen	} 37 Zyklen
Banden:	WT: 550-600 bp Mut: 350-400 bp	WT: 381 bp Mut: 120 bp

### 2.6.3 mRNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem innuPREP RNA mini kit (Analytik Jena). Zellen in Suspension wurden mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation (700 rpm, 5 min, Sigma 2K15) als Pellet in Lysispuffer resuspendiert. Gewebebiopsien wurden mittels Gewebe-Zerkleinerer (Kimble Chase) in im Kit enthaltenen RNA-Lysispuffer auf Eis homogenisiert. Das auf Spinsäulen basierende



System beruht auf der selektiven Entfernung genomischer DNA mittels Vorfiltration und der Bindung der RNA an eine zweite Membran zwecks Waschens. Konzentration und Reinheit der anschließend in RNase freiem Wasser eluierten RNA wurden mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) bestimmt. Das Verhältnis der Absorption von 260 zu 280 nm lag dabei zwischen 1,9 und 2,1.

#### **2.6.4 cDNA-Synthese**

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit der RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) unter Nutzung des T Gradient Thermocycler (Whatman Biometra). Dazu wurden je Ansatz 1 µg RNA und 1 µl random Primer (Biomers) mit RNase freiem Wasser auf 12,5 µl Volumen aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 7 µl Mastermix (4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP Mix, 1,5 µl RNase freies Wasser, 0,5 µl Reverse Transkriptase) wurden die Ansätze kurz zentrifugiert (). Die cDNA Synthese erfolgte dann für 10 min Inkubation bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 42 °C. Anschließend wurde zur Beendigung der Reaktion die Reverse Transkriptase 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert und die Proben auf 4 °C gekühlt, 1:1 mit RNase freiem Wasser verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **2.6.5 qPCR (Quantitative Echtzeit-PCR)**

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden im 96-well Format je Ansatz 10 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 2 µl cDNA und je 0,1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (alle Biomers, *Wee1*: Metabion, **Tabelle 2.4**) mit Nuklease- und Nukleinsäure-freiem Wasser (Thermo Scientific) auf 20 µl aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte mit dem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) nach folgendem Cyclet-Programm: Vorinkubation für 5 min bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 45 s Denaturierung bei 95 °C und 60 s Primerhybridisierung und Elongation bei 60 °C. Die Quantifizierung der DNA-Vervielfältigung beruht dabei auf der Zunahme der Fluoreszenz des in die DNA interkalierenden CYBR Green Farbstoffes, die mit der Zunahme der DNA-Amplifikate korreliert. Die Spezifität der Amplifikate wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse

bestimmt, bei der die Fluoreszenzänderung gemessen wird, die durch Freisetzung des Farbstoffes beim Zerfall eines Doppelstranges infolge eines Temperaturanstiegs bis zur Schmelztemperatur auftritt. Die Schmelztemperatur eines doppelsträngigen DNA-Fragments ist dabei abhängig von Länge und Basenzusammensetzung, so dass die Schmelzkurvenanalyse Informationen zur Spezifität der PCR liefert und die Unterscheidung von unspezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren ermöglicht. Die relative Quantifizierung der Expressionslevel wurde mit dem *ddCt* Algorithmus und normiert auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin bestimmt (Holzapfel 2007).

**Tabelle 2.4: Verwendete Primerpaare für die qPCR.**

	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
<i><math>\beta</math>-Aktin</i>	5'-GATGCTCCCCGGGCTGTATT-3'	5'-GGGGTACTTCAGGGTCAGGA-3'
<i>ChrB</i>	5'-CCCGCTGGCTGAACCTTTC-3'	5'-GAGTTCTGACGGCGGAAGAG-3'
<i>clAP2</i>	5'-CGAGGAGGAGGAGTCAGATG-3'	5'-GGAGGCAATACAGCATTGGT-3'
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	5'-GCAAGGCGAAAAAGGATGC-3'	5'-GCTTCCTGAGGCTGGATTC-3'
<i>IL-6</i>	5'-CTCCCAACAGACCTGTCTATAC-3'	5'-GTGCATCATCGTTGTTTCATAC-3'
<i>KC</i>	5'-GCTGGGATTACCTCAAGAA-3'	5'-TGGGGACACCTTTTAGCATC-3'
<i>Lgr5</i>	5'-CGGCAACAGTGTGGACGACCT-3'	5'-GCGAGCACTGCACCGAGTGA-3'
<i>Lyz1</i>	5'-GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG-3'	5'-CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG-3'
<i>Muc2</i>	5'-GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG-3'	5'-GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC-3'
<i>Per1</i>	5'-TGGCTCAAGTGGCAATGAGTC-3'	5'-GGCTCGAGCTGACTGTTCATC-3'
<i>Per2</i>	5'-GCCAAGTTTGTGGAGTTCCTG-3'	5'-CTTGACCTTGACCAGGTAGG-3'
<i>RIP3</i>	5'-AGCTTTGGGATCCTCGTGTG-3'	5'-TGTCAGTGGAGGACGACTCT-3'
<i>Wee1</i>	5'-GGTGTCTGGGAGAAAGAGA-3'	5'-TCTGCTCATCAACAGAGCCA-3'

## 2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.7.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung muriner Zellen/Zelllinien erfolgte als kontinuierliche Zellkultur nach Standardmethoden (Schmitz 2011). Dabei wurde vollständige Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen durch Vereinzelung und Umsetzen vermieden. Eingesetzt wurde die murine Zelllinie IEC-1, die auf fetalen Epithelzellen des Mäusedünndarms basiert, welche durch lentivirale Einbringung der Gene für das *SV40 large T antigen* (TAg), den *Krüppel-like factor 4* (Klf4) und den *Inhibitor of DNA binding 3* (Id3) gentechnisch verändert und somit immortalisiert wurden (Schwerk, Koster et al. 2013). IEC-1 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt) bei 37 °C

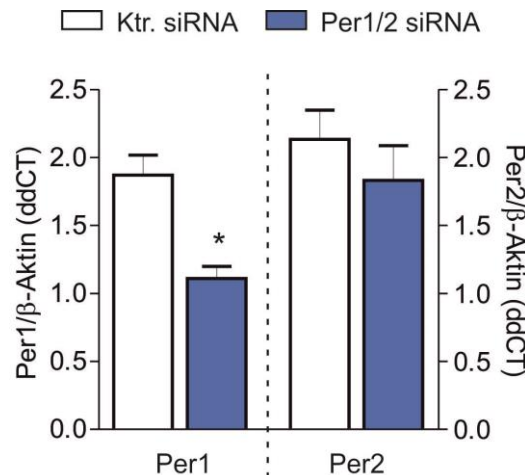
und 5% CO<sub>2</sub> in einem HERA Cell Brutschrank (Heraeus) kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM (ohne L-Glutamin, High Glucose (4,5 g/l), GE Healthcare) mit den Zusätzen FCS (10%, 1 h hitzeinaktiviert (56 °C), Gibco), L-Glutamin (1%, v/v Sigma), 2-Mercaptoethanol (50 µM, Sigma) und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml, beides PAA).

### 2.7.2 *Per1/Per2* Gen-Abschaltung (RNAi)

Die Methode des Einbringens kleiner interferierender RNA-Moleküle in Zellen mit dem Ziel der spezifischen Gen-Abschaltung stellt eine effektive experimentelle Möglichkeit dar, die Funktion von Genen und Genprodukten zu untersuchen. Dabei ist die Hemmung des Informationsflusses vom Gen über die RNA zum Protein (Inhibition der Translation) auch eine natürlich vorkommende Regulationsebene der Genexpression in vielen eukaryotischen Lebewesen. Kleine, nicht-codierende RNA Moleküle (z.B. siRNA, *small interfering RNA*), endogen erzeugt oder künstlich in die Zelle eingebracht, binden und aktivieren einen Enzymkomplex (RISC, *RNA-induced silencing complex*) und vermitteln so den Abbau einer zur siRNA komplementären mRNA. Je nach Effizienz dieses Prozesses lassen sich Gene auf diese Weise teilweise oder vollständig funktionell ausschalten (Siomi and Siomi 2009).

Im hier verwendeten experimentellen Setting sollten in der murinen Zelllinie IEC-1 die Uhrengene *Per1* und *Per2* mittels siRNA ausgeschaltet werden. Dazu wurden IEC-1 Zellen in 6-well Platten (Sarstedt) mit einer Dichte von 200.000 Zellen/well in DMEM Medium (GE Healthcare) mit 10% v/v FCS (Gibco), 1% w/v L-Glutamine (Sigma) und 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma) ausgesät. Nach 24 h Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen entweder mit je 25 nM von beiden murinen siRNA (*Per1*: 4390771/s71484, *Per2*: 4390771/s71485) oder mit 50 nM einer Negativ-Kontroll siRNA (4390844, mock Transfektion, alle Ambion) transfiziert. Dabei wurde das Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz (Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Nach Inkubation für 48 h wurden die *Per1/Per2* und die Kontroll-transfizierten Zellen mit Trypsin-EDTA (Sigma) geerntet und in 96-well Platten (Sarstedt) mit einer Dichte von 10.000 Zellen/well ausgesät. Nach weiteren 24 h Kultivierung wurden die Zellen für die jeweiligen Assays (siehe 2.7.3 und 2.7.4) verwendet. Der Nachweis der Gen-Abschaltung von *Per1* (*Per1* siRNA (n=3): 1,11 ±

0,09; Ktr. siRNA (n=3):  $1,87 \pm 0,15$ ; ddCT normiert auf  $\beta$ -Aktin;  $p < 0,05$ ) und *Per2* (*Per2* siRNA (n=3):  $1,83 \pm 0,26$ ; Ktr. siRNA (n=3):  $2,13 \pm 0,22$ ; ddCT normiert auf  $\beta$ -Aktin;  $p > 0,05$ ) erfolgte mittels qPCR (**Abbildung 2.2**).



**Abbildung 2.1: Effizienz der Gen-Abschaltung von IEC-1 Zellen mit *Per1/Per2* siRNA.**

### 2.7.3 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Caspase 3/7 und Caspase 8 Aktivität wurde ein Lumineszenz-basierter enzymatischer Assay (Caspase-Glo 3/7 Assay, Caspase-Glo 8 Assay, beide Promega) nach Herstellerangaben genutzt. Der Assay beruht auf der Zelllyse mit resultierender Freisetzung der Caspasen, welche daraufhin ihr jeweiliges Substrat spalten, wobei Aminoluciferin freigesetzt wird und mit der enthaltenen Luciferase reagiert und so ein Lumineszenzsignal erzeugt. Das Lumineszenzsignal ist dann proportional zur Enzymaktivität der Caspasen (Liu, Li et al. 2004).

Die Zellen wurden dabei als Dreifachbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem murinen TNF- $\alpha$  (R&D Systems) sowie dem Smac Mimetikum BV-6 (Selleckchem) alleine oder in Kombination stimuliert. Nach 4 h Inkubation wurden aus jedem well 45  $\mu$ l Volumen verworfen und 50  $\mu$ l der jeweiligen Test-Substratlösung zugegeben. Nach weiteren 60 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurden 75  $\mu$ l Überstand je well entnommen und in eine weiße Mikrotiterplatte (Thermo Scientific) überführt. Die Messung der Lumineszenz erfolge anschließend mit dem Lumineszenzleser Infinite M200 unter Nutzung der

Software i-control (Version 1.9.17.0, beides Tecan) und einer Integrationszeit von 1000 ms.

## **2.8 Statistik und Software**

Alle Rohdaten wurden mit Excel 2010 (Microsoft) erfasst und verwaltet. Für alle Berechnungen und die Darstellung von Diagrammen wurde Prism 5 (GraphPad) genutzt. Soweit nicht anders angegeben, drücken sich die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus (vertikale Balkendiagramme, Punktekurven) oder als Median (Box-Whisker-Plot). p-Werte für einfache Vergleiche wurden mittels ungepaartem t-Test ermittelt, während p-Werte für multiple Vergleiche mittels zweifacher ANOVA sowie Bonferroni Nachtest berechnet wurden. Die Überlebenskurven wurden mittels Log-rank (Mantel-Cox) Test ausgewertet. Die nichtlineare Regression der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde nach der Gleichung *log(agonist) vs. response* (drei Parameter Dosis-Wirkungs-Kurve) berechnet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde statistische Signifikanz angenommen. Wenn nicht anders angegeben, wurden Messungen und Experimente mindestens dreimal wiederholt.

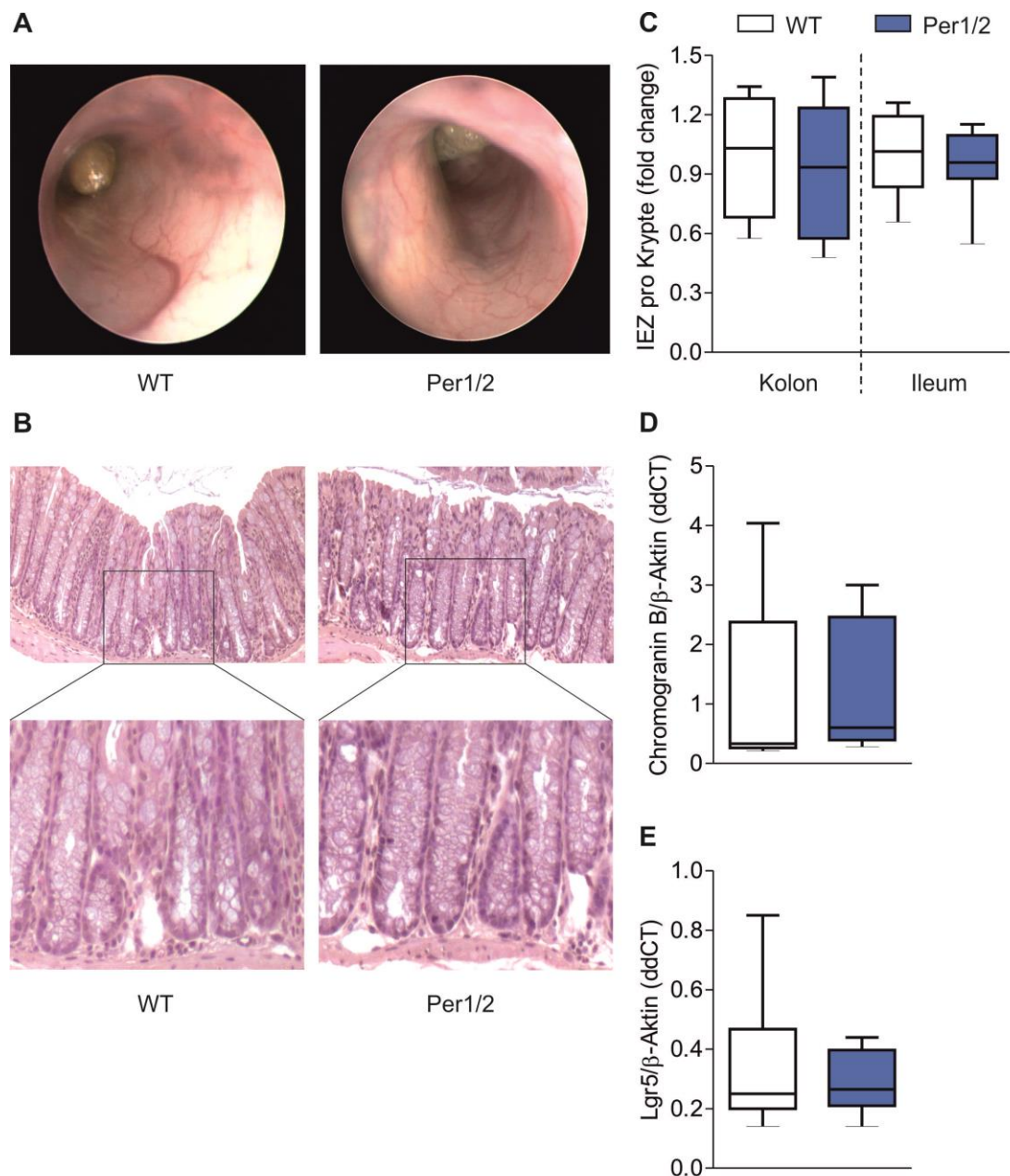
### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, den postulierten Einfluss eines gestörten zirkadianen Rhythmus auf das Darmepithel und die Suszeptibilität für experimentelle intestinale Darmentzündung am Beispiel der Per1/Per2 Doppel-Knockout Maus (Per1/2) nachzuweisen.

Ausgehend von der gesunden Maus soll im Vergleich von WT und Per1/2 zunächst das Darmepithel allgemein sowie im Hinblick auf Zellteilung und Zelltod charakterisiert werden. Aufbauend darauf sollen im Anschluss Entzündungsmodelle betrachtet werden.

#### 3.1 Per1/2 Mäuse zeigen eine veränderte Architektur der intestinalen Mukosa hinsichtlich der Barrierefunktion unter gesunden Bedingungen

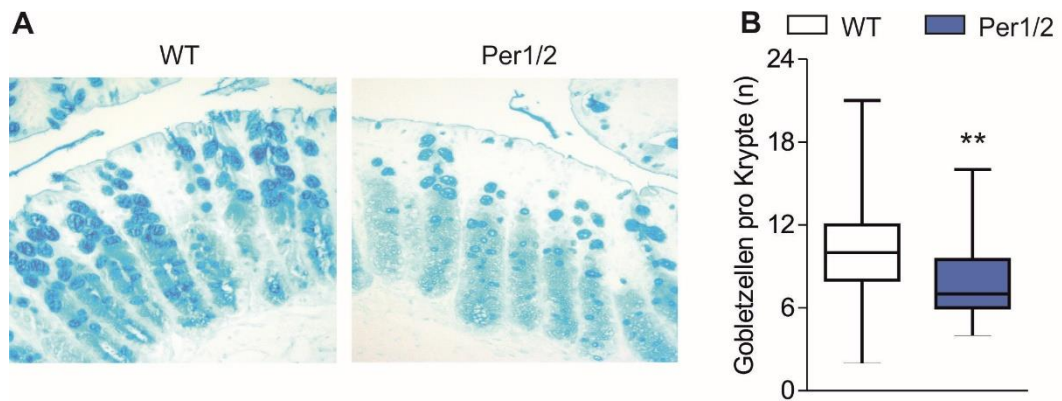
Als Erstes wurde das Darmepithel von gesunden WT und Per1/2 Mäusen auf etwaige Veränderungen hin untersucht (**Abbildung 3.1**). Sowohl eine grundlegende makroskopische als auch mikroskopische Untersuchung des Dün- und Dickdarmes mittels Endoskopie respektive Histologie ergaben keine Anhaltspunkte für spontane Entzündungsgeschehen in Per1/2 Mäusen (Per1/2 und WT: repräsentative Bilder). Die Charakterisierung der zellulären Zusammensetzung des Darmepithels zeigte ebenfalls keine Unterschiede in der Anzahl von IEZ in Krypten des Kolons und Ileums. In Darmbiopsien unterschied sich die Expression von Chromogranin B als Marker für enterochromaffine Zellen sowie Lgr5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) als Marker für intestinale Stammzellen nicht zwischen den Genotypen.



**Abbildung 3.1: Charakterisierung des Darmepithels naiver WT und Per1/2 Mäuse.**

(A) Repräsentative Bilder der Mausendoskopie des Kolons. (B) Repräsentative Bilder nach HE Färbung von Kolonbiopsien (Vergrößerung 20x, Einsatzbilder: tiefe Kryptenregion). (C) Quantifizierung der Anzahl von intestinalen Epithelzellen (IEZ) in Krypten von Kolon und Ileum (WT n=8, Per1/2 n=8). (D) Bestimmung der mRNA Transkripte von Chromogranin B als Marker für enterochromaffine IEZ in Kolonbiopsien mittels RT-qPCR (WT n=6, Per1/2 n=8, normiert auf  $\beta$ -Aktin). (E) Bestimmung der mRNA Transkripte von Lgr5 als Marker für intestinale Stammzellen in Kolonbiopsien mittels RT-qPCR (WT n=6, Per1/2 n=8, normiert auf  $\beta$ -Aktin). MW  $\pm$  SEM.

Die Spezialfärbung von Gewebeschnitten des Dickdarmes mit Alcianblau dagegen zeigte reduzierte Zahlen von sekretorischen Becherzellen in Per1/2 Mäusen (**Abbildung 3.2**). Die Expression von Mucin 2 (Muc2) war in beiden Genotypen ohne Unterschied (ohne Abbildung).

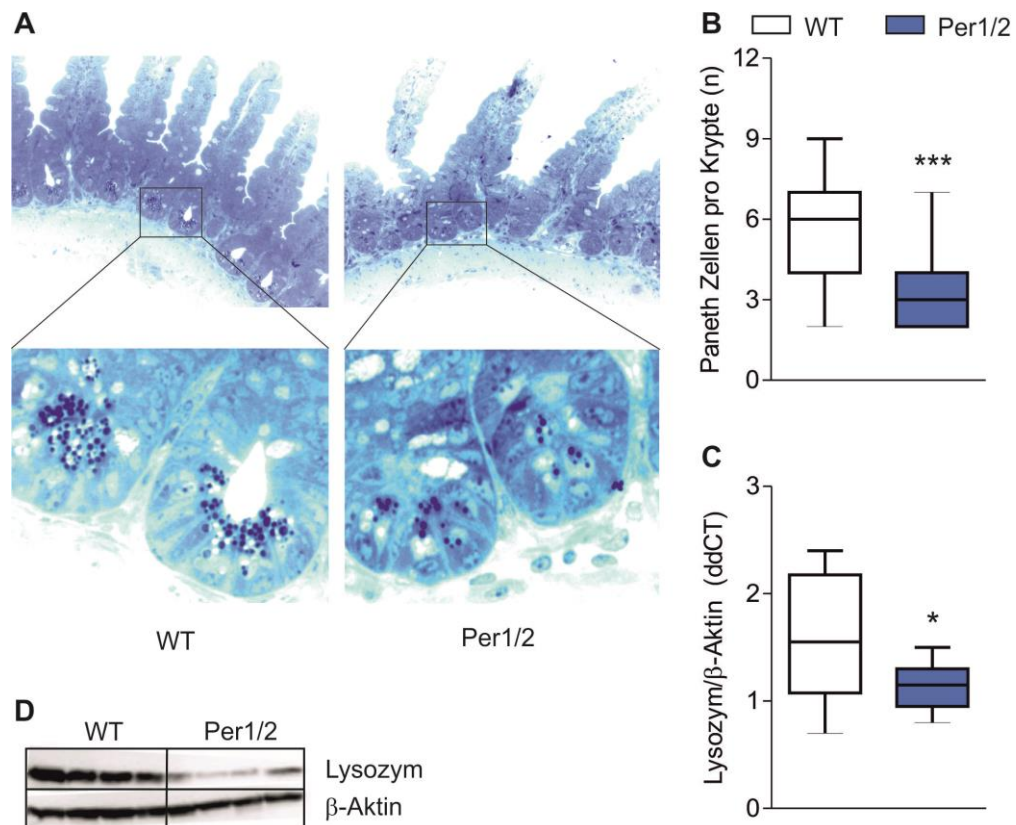


**Abbildung 3.2: Analyse von sekretorischen Becherzellen im Kolon von WT und Per1/2 Mäusen.**

(A) Repräsentative Bilder nach Alcianblau Färbung (Vergrößerung 20x). (B) Quantifizierung der Anzahl von Becherzellen pro Krypte (WT n=8, Per1/2 n=8). MW  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$ .



Weiterhin waren nach der Färbung von Semidünnschnitten des Ileums mit Methylenblau Azur II reduzierte Zahlen von Granula-haltigen Paneth Zellen in Per1/2 Mäusen zu beobachten (**Abbildung 3.3**). Korrespondierend mit diesem Befund war die Expression von Lysozym in diesen Mäusen reduziert verglichen mit WT Kontrollen, und auch der Proteinnachweis mittels Western Blot zeigte weniger Lysozym.

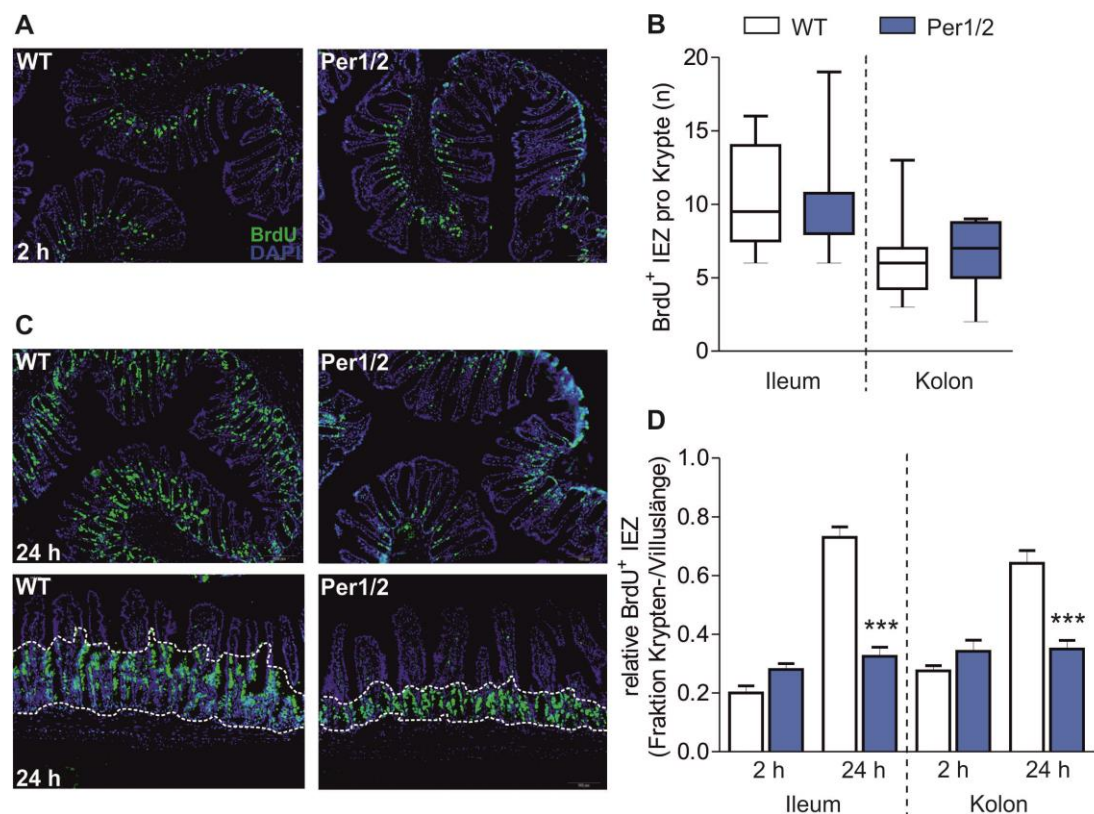


**Abbildung 3.3: Analyse von sekretorischen Paneth Zellen im Ileum von WT und Per1/2 Mäusen.**

(A) Repräsentative Bilder von Semidünnschnitten nach Methylenblau Azur II Färbung (Vergrößerung 100x, Einsatzbilder: Granula-haltige Paneth Zellen in der tiefen Krypte). (B) Quantifizierung der Anzahl von Granula-haltigen Paneth Zellen (WT n=8, Per1/2 n=8). (C) Bestimmung der mRNA Transkripte von Lysozym in Ileumbiopsien von unbehandelten Mäusen mittels RT-qPCR (WT n=8, Per1/2 n=8, normiert auf  $\beta$ -Aktin). (D) Bestimmung des Proteingehalts an Lysozym in Ileumbiopsien von unbehandelten Mäusen mittels Western Blot ( $\beta$ -Aktin als Kontrolle). MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2 Intestinale Epithelzellen von Per1/2 Mäuse weisen ein verändertes Proliferations-Verhalten auf

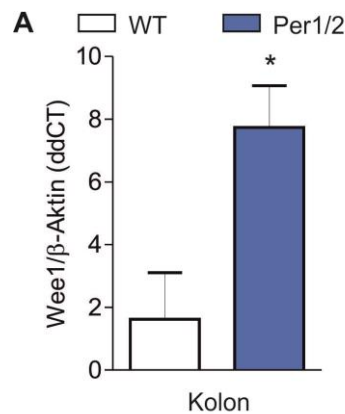
Die verringerten Zellzahlen an sekretorischen Paneth und Becherzellen in Per1/2 Mäusen warfen die Frage auf, ob die Zellproliferation von IEZ und somit die Neubildung dieser Populationen kompromittiert ist. Die *in vivo* Analyse der Zellteilung mittels BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) zeigte nach 2 h keine Unterschiede in der Proliferation von IEZ in der Stammzellzone (untere Krypte, **Abbildung 3.4**). Nach 24 h jedoch waren in Per1/2 Mäusen deutlich weniger proliferierte IEZ nachweisbar als in WT Tieren.



**Abbildung 3.4: Analyse der *in vivo* Zellteilung von IEZ des Ileums und Kolons in unbehandelten WT und Per1/2 Mäusen.**

(A) Repräsentative Bilder BrdU positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung von Kolonbiopsien 2 h nach BrdU Injektion (Vergrößerung 10x). (B) Bestimmung der Anzahl proliferierter IEZ in Ileum und Kolon (WT n=3, Per1/2 n=3). (C) Repräsentative Bilder BrdU positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung von Kolonbiopsien 24 h nach BrdU Injektion (Vergrößerung 10x oben/20x unten). (D) Bestimmung der Anzahl proliferierter IEZ als Fraktion der Villus-/Kryptenlänge in Ileum und Kolon (WT n=3, Per1/2 n=3, je Zeitpunkt). MW ± SEM; \*\*\* p<0,001.

Passend zu diesen Befunden zeigten sich auch auf regulatorischer Seite der Zellproliferation Veränderungen in Per1/2 Mäusen. So ist die Expression von Wee1, einem negativen Regulator des Zellzyklus beim Übergang von der G2 zur M Phase, erhöht verglichen mit WT Tieren (**Abbildung 3.5**).

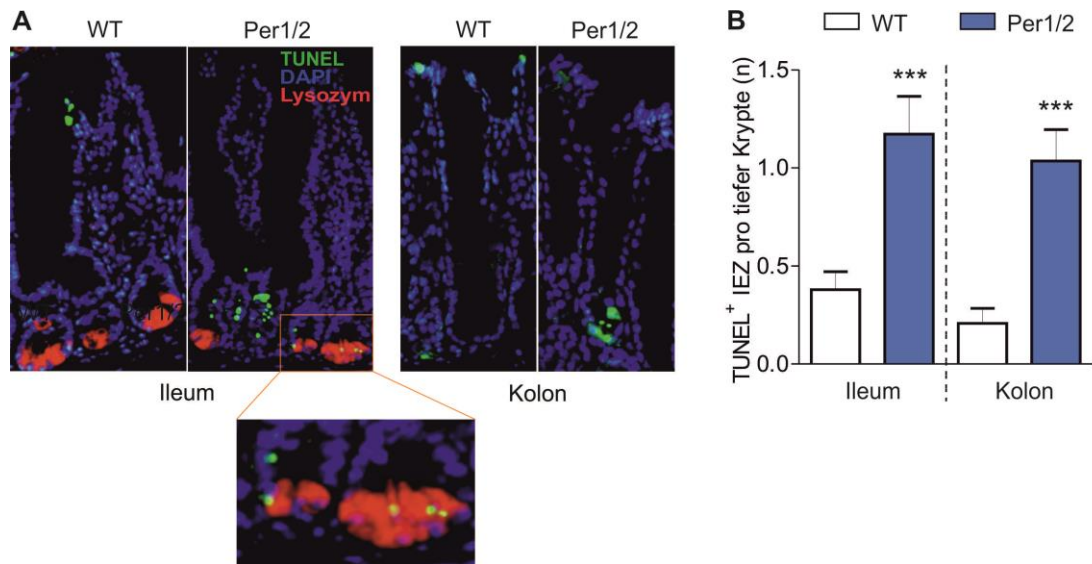


**Abbildung 3.5: Charakterisierung des Zellzyklus in WT und Per1/2 Mäusen.**

(A) Bestimmung der mRNA Transkripte des Zellzyklusregulators Wee1 in Kolonbiopsien von unbehandelten Mäusen mittels RT-qPCR (normalisiert auf β-Aktin). MW ± SEM; \* p<0,05.

### 3.3 Vermehrter nekroptotischer Zelltod von intestinalen Epithelzellen in Per1/2 Mäusen

Neben der gestörten Zellproliferation könnte auch ein verstärkter Zelltod die Befunde der verringerten Zellzahlen an sekretorischen Paneth und Becherzellen in Per1/2 Mäusen erklären. In der Tat waren nach TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) Färbung von Dünn- und Dickdarmbiopsien in Per1/2 Mäusen vermehrt positive IEZ in der Kryptentiefe zu beobachten als bei WT Tieren (**Abbildung 3.6**).

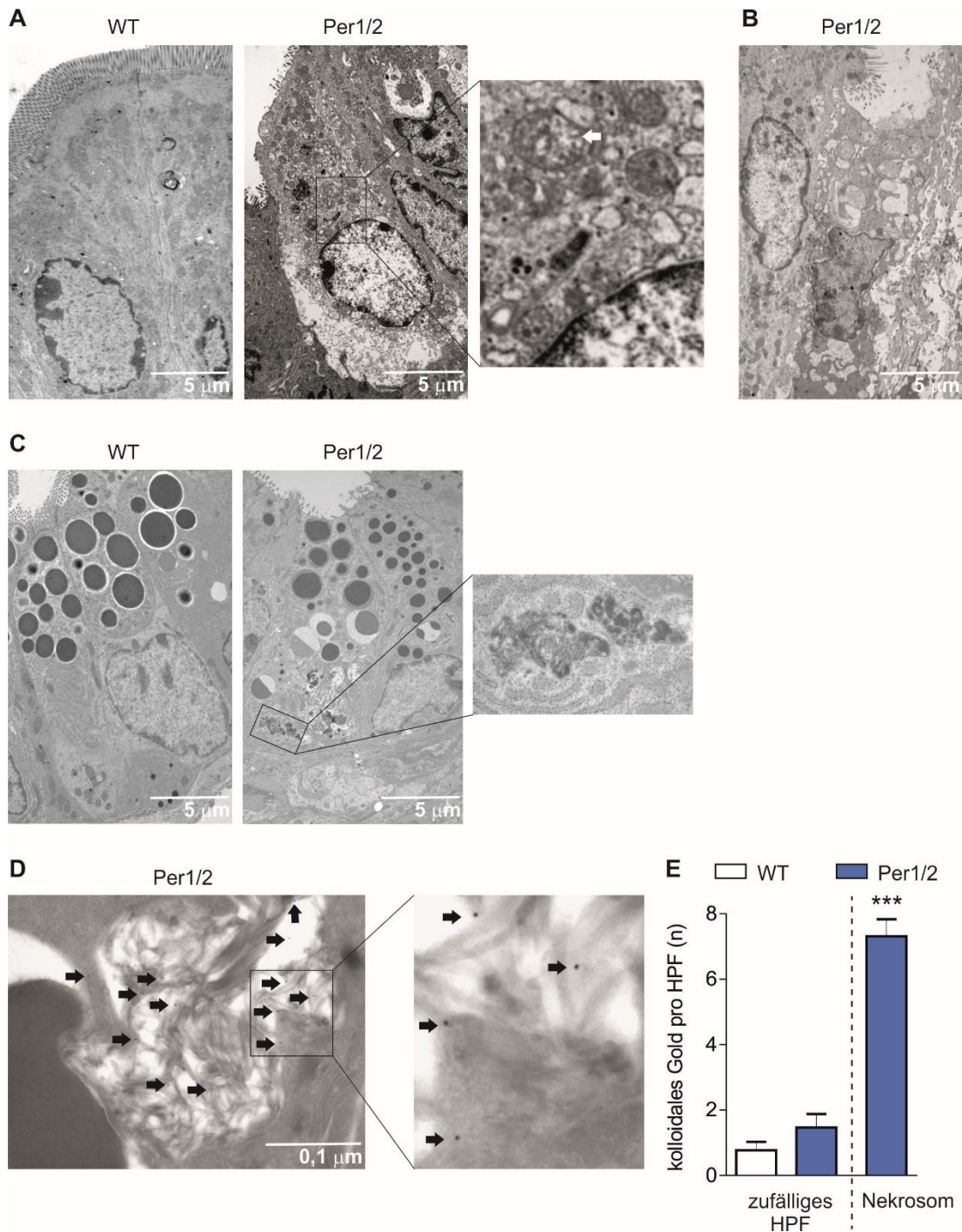


**Abbildung 3.6: Analyse des Zelltods von IEZ des Ileums und Kolons in unbehandelten WT und Per1/2 Mäusen.**

(A) Repräsentative Bilder TUNEL positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung von Ileum- und Kolonbiopsien (Vergrößerung 20x, Einsatzbild: TUNEL und Lysozym doppel-positive Paneth Zellen). (B) Bestimmung der Anzahl TUNEL positiver IEZ in Ileum und Kolon (WT n=8, Per1/2 n=8). MW  $\pm$  SEM; \*\*\* p<0,001.

Die morphologische Untersuchung der tiefen Kryptenregion des Ileums mittels Elektronenmikroskopie zeigte das Vorhandensein von nekrotischen Zellen in Per1/2 Mäusen, die in WT Tieren kaum auftraten (Per1/2 und WT: repräsentative Bilder, **Abbildung 3.7**). Weiterhin waren in Paneth Zellen von Per1/2 Mäusen, nicht jedoch von WT Tieren, Amyloid-ähnliche Ablagerungen von filamentöser Struktur zu beobachten (Per1/2 und WT: repräsentative Bilder), die sich mittels Immunogold-Färbung als positiv für den Nekroptosemarker RIP3 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) darstellten (Per1/2: repräsentatives Bild). Dabei zeigte die Auszählung der Immunkomplexe aus kolloidalem Gold und anti-RIP3 Immunglobulinen die Spezifität der Färbung.

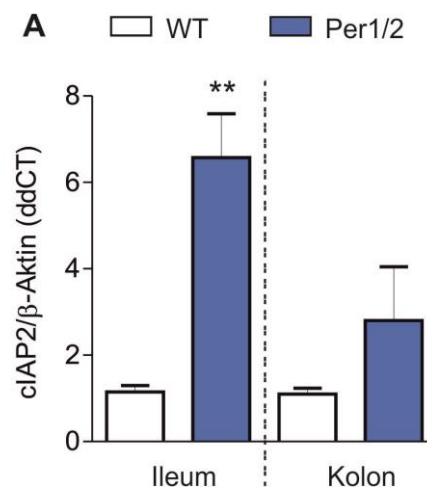




**Abbildung 3.7: Analyse der tiefen Kryptenregion des Ileums von unbehandelten WT und Per1/2 Tieren mittels Elektronenmikroskopie.**

(A) Repräsentative Bilder von Ultradünnschnitten (Messbalken: 5 µm). Nekrotische IEZ mit angeschwollenen Mitochondrien (Einsatzbild) und defektem Mikrovillisaum. (B) Nekrotische IEZ am Kryptenboden des Ileums einer Per1/2 Maus (Messbalken: 5 µm). (C) Repräsentative EM-Bilder von Granula-haltigen Paneth Zellen (Messbalken: 5 µm, Einsatzbild: Amyloid-ähnliche, filamentöse Struktur in Paneth Zellen von Per1/2 Mäusen). (D) EM-Bild einer positiv markierten, filamentösen Struktur nach Immunogoldfärbung mit anti-RIP3 (Messbalken: 0,1 µm, Einsatzbild: kolloidales Gold). (E) Nachweis der Spezifität der Immunogoldfärbung. MW ± SEM; \*\*\* p<0,001.

Einen weiteren Hinweis auf nekroptotischen Zelltod in IEZ von *Per1/2* Mäusen lieferte die unter gesunden Bedingungen verstärkte Expression von cIAP2 in diesen Tieren, einem multifunktionalem Protein, welches unter anderem die RIP1/Caspase 8 vermittelte Apoptose inhibiert (**Abbildung 3.8**).

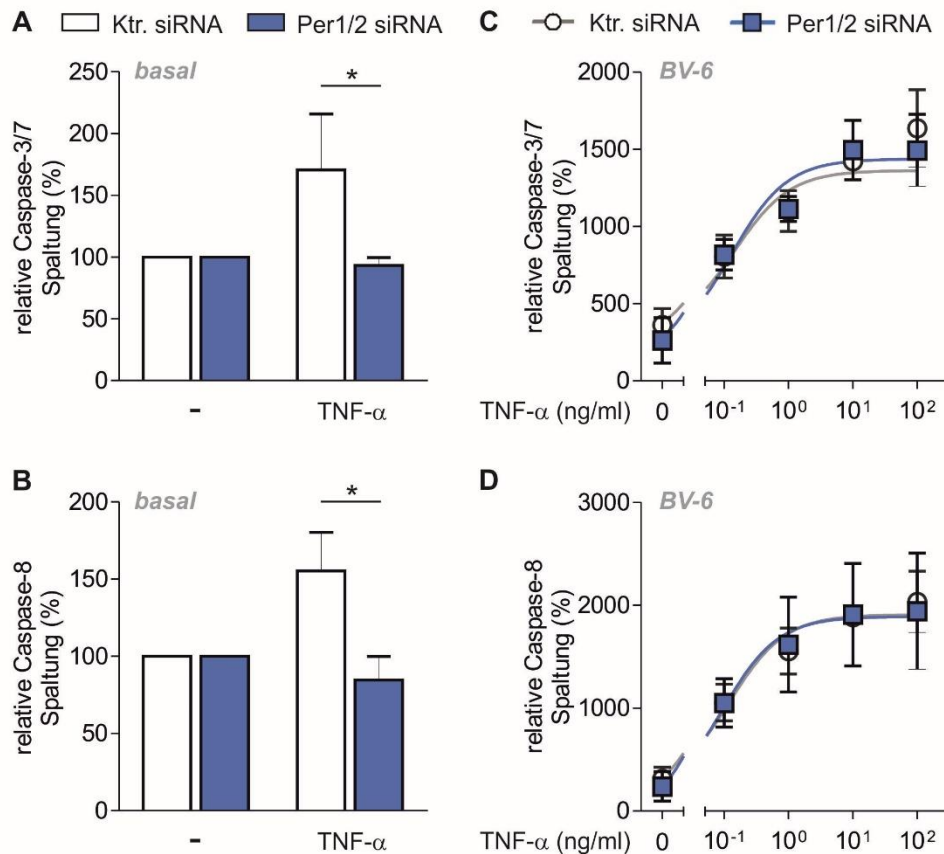


**Abbildung 3.8: Analyse des Zelltods in WT und *Per1/2* Mäusen.**

(A) Bestimmung der mRNA Transkripte des anti-apoptotischen Proteins cIAP2 in Ileum und Kolon Biopsien unbehandelter Mäuse mittels RT-qPCR (normalisiert auf  $\beta$ -Aktin). MW  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.4 Verringerte Apoptoseinduktion in der murinen Epithelzelllinie IEC-1 nach Zelltodstimulus mit $\text{TNF-}\alpha$

Um den Zelltod auch funktionell untersuchen zu können, wurde die Genexpression von *Per1* und *Per2* in der murinen Epithelzelllinie IEC-1 posttranskriptionell mittels spezifischer siRNAs herunter reguliert. Verglichen mit der Transfektionskontrolle reagierten die *Per1/Per2* transfizierten Zellen nicht mit einer Spaltung der Initiator-Caspasen 3 und 7 oder der Effektor-Caspase 8 auf den Zelltodstimulus  $\text{TNF-}\alpha$  (**Abbildung 3.9**). Wurden jedoch die Proteine der IAP Familie (cIAP1, cIAP2, XIAP), welche in der Zelle die Apoptose unterdrücken, mittels der Substanz BV-6 inhibiert, zeigten *Per1/Per2* transfizierte Zellen das gleiche Ansprechen hinsichtlich der Aktivierung der Caspasen 3/7 und 8 durch  $\text{TNF-}\alpha$  wie mock transfizierte Zellen.



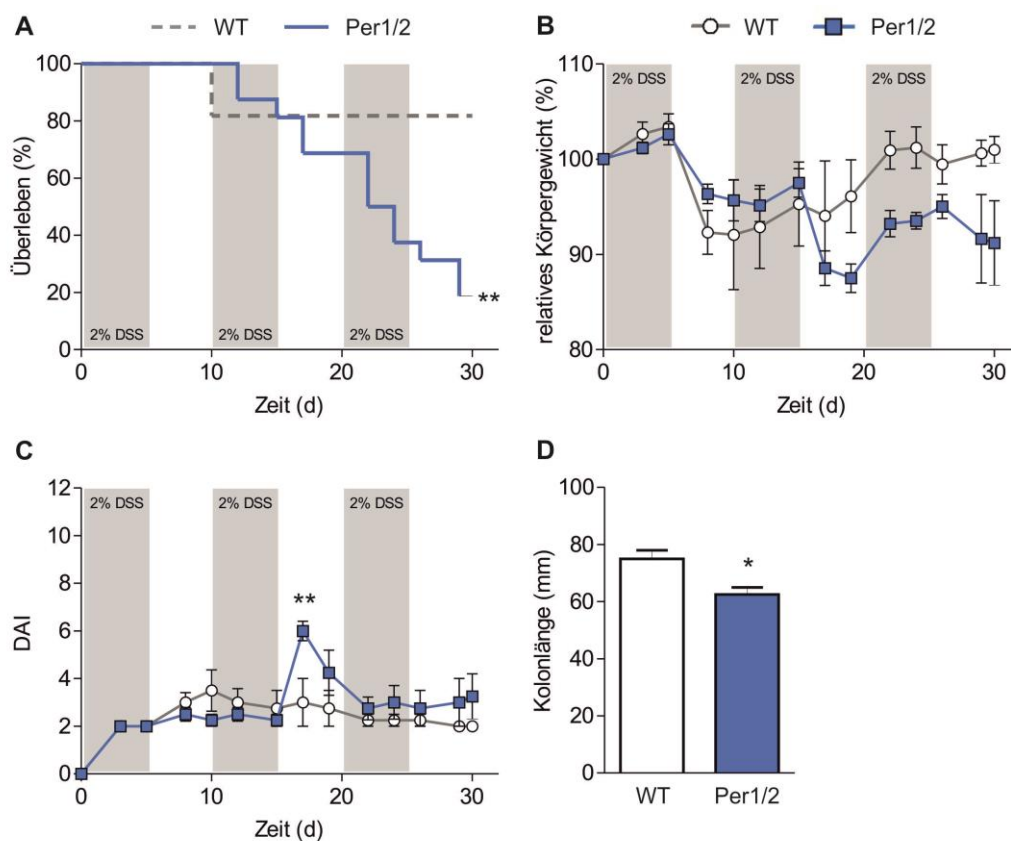
**Abbildung 3.9: Analyse der Apoptoseinduktion in Kontroll und *Per1/Per2* transfizierten IEC-1 Zellen.**

Aktivierung der Caspasen 3/7 (**A**) und 8 (**B**) nach TNF- $\alpha$  Stimulus sowie Dosis-Wirkungs-Kurven (nicht-lineare Regression) der Caspase 3/7 (**C**) und 8 (**D**) Aktivierung nach TNF- $\alpha$  Stimulus mit zusätzlicher BV-6 (1000 nM) Behandlung (n=3 je Gruppe). MW  $\pm$  SEM; \* p<0,05.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich des Darmepithels unbehandelter WT und *Per1/2* Mäuse, dass der Knockout der Uhrengene *Per1* und *Per2* bereits in phänotypisch gesunden Mäusen Veränderungen hervorruft. Diese Mäuse zeigen verringerte Zahlen an für die Darmbarriere wichtigen Paneth und Becherzellen, verringerte Teilungsraten von intestinalen Epithelzellen sowie Anzeichen vermehrten nekroptotischen Zelltods. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die murine Epithelzelllinie IEC-1 nicht mit Apoptoseinduktion auf den Zelltodstimulator TNF- $\alpha$  reagiert, wenn die Gene *Per1* und *Per2* vorher posttranskriptionell herunter reguliert wurden. Vor diesem Hintergrund sollte nun geklärt werden, ob die Veränderungen im Darmepithel von *Per1/2* Mäusen in einer erhöhten Anfälligkeit für intestinale Entzündungsprozesse resultieren.

### 3.5 Per1/2 Mäuse zeigen einen verstärkten pro-inflammatorischen Phänotyp bei Induktion einer experimentellen Darmentzündung

In zwei unabhängigen Experimenten wurde bei WT und Per1/2 Mäusen eine experimentelle chronische DSS Kolitis als Modell für die humane CU über 30 Tage induziert (**Abbildung 3.10**). Per1/2 Mäuse zeigten dabei eine signifikant erhöhte Sterblichkeitsrate verglichen mit WT Kontrollen. Sie verloren dabei mehr Körpergewicht und wiesen eine erhöhte klinische Entzündungsaktivität auf. Die Reduktion der Kolonlänge als Maß für die Entzündungsaktivität war bei Per1/2 Mäusen signifikant stärker ausgeprägt als bei WT Mäusen.

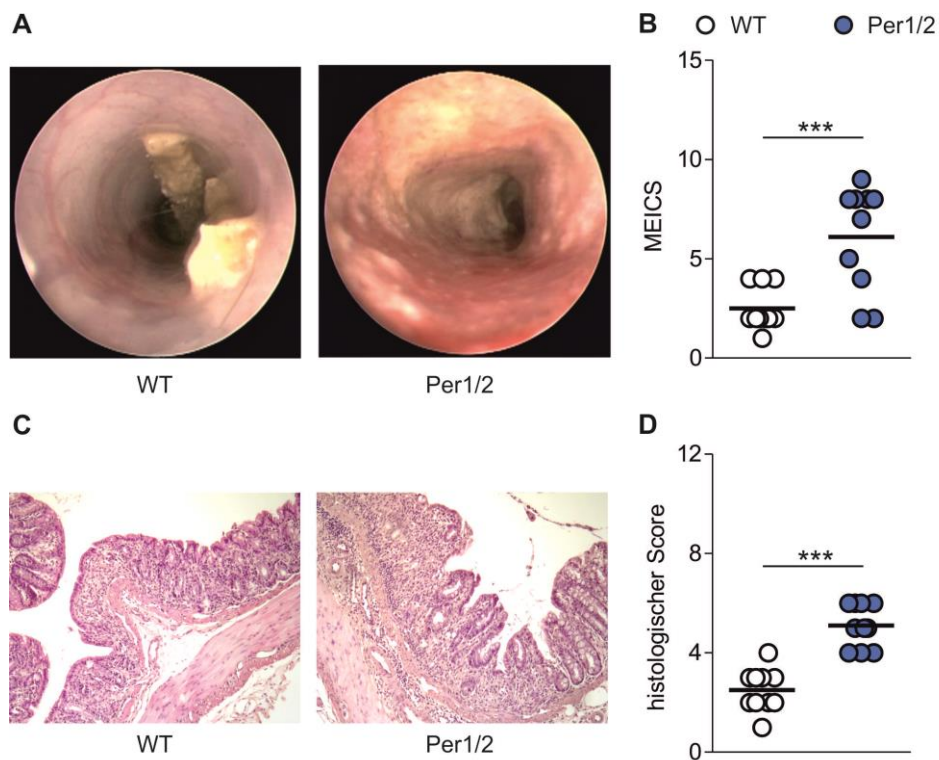


**Abbildung 3.10: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (1).**

(A) Überleben, (B) Entwicklung des Körpergewichts und (C) klinische Entzündungsaktivität (DAI) im Zeitverlauf der chronischen DSS Kolitis (30 Tage Dauer) sowie Kolonlänge (D) am Versuchsende (WT n=9-11, Per1/2 n=4-17). MW  $\pm$  SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01.



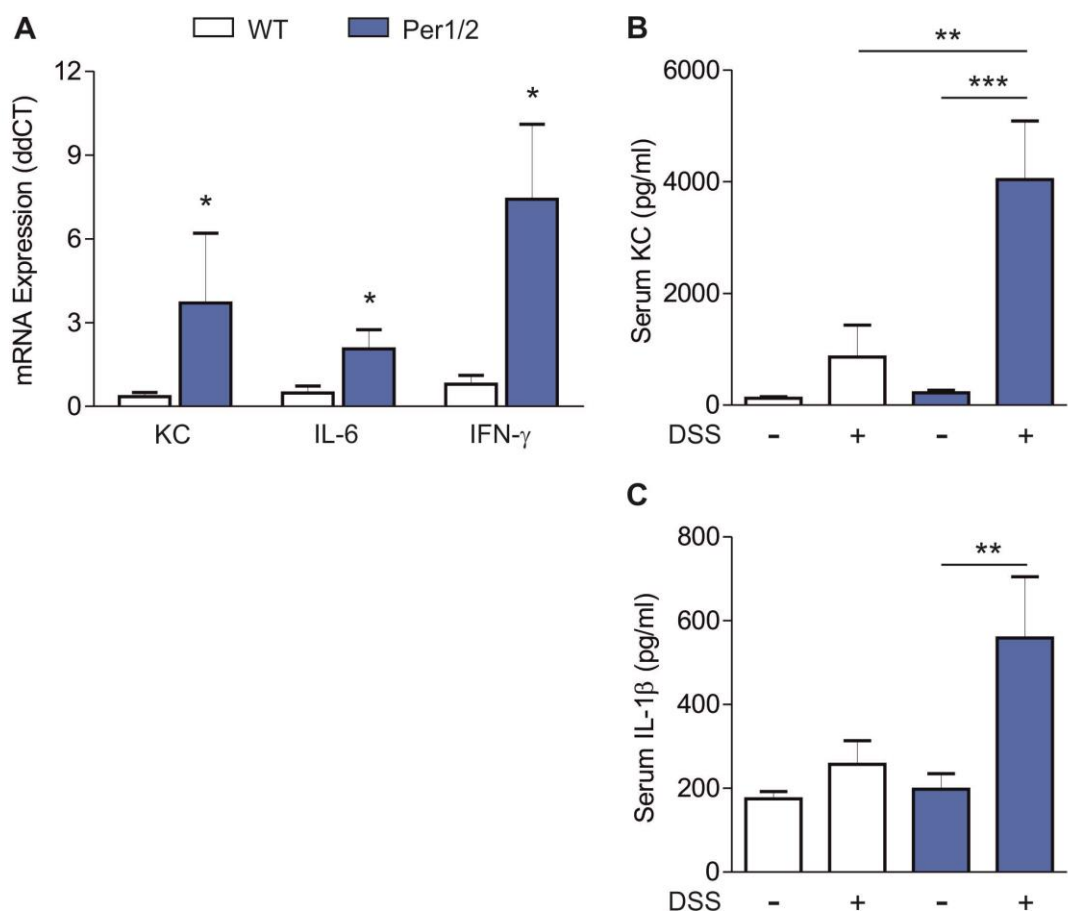
Die makroskopische Beurteilung der Mukosa mittels Endoskopie am Versuchsende der DSS Kolitis ergab einen signifikant höheren MEICS Score bei Per1/2 Mäusen (**Abbildung 3.11**). Auch auf mikroskopischer Ebene zeigten diese Tiere einen höheren Grad an Entzündungsparametern nach histologischer Auswertung von Kolon-Gewebeschnitten.



**Abbildung 3.11: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (2).**

(A) Repräsentative Bilder der Mausendoskopie und (B) Bestimmung des MEICS Scores sowie (C) repräsentative Bilder nach HE Färbung von Kolonbiopsien (Vergrößerung 10x) und (D) Bestimmung des histologischen Scores am Versuchsende der DSS Kolitis (WT n=10, Per1/2 n=10). MW  $\pm$  SEM; \*\*\* p<0,001.

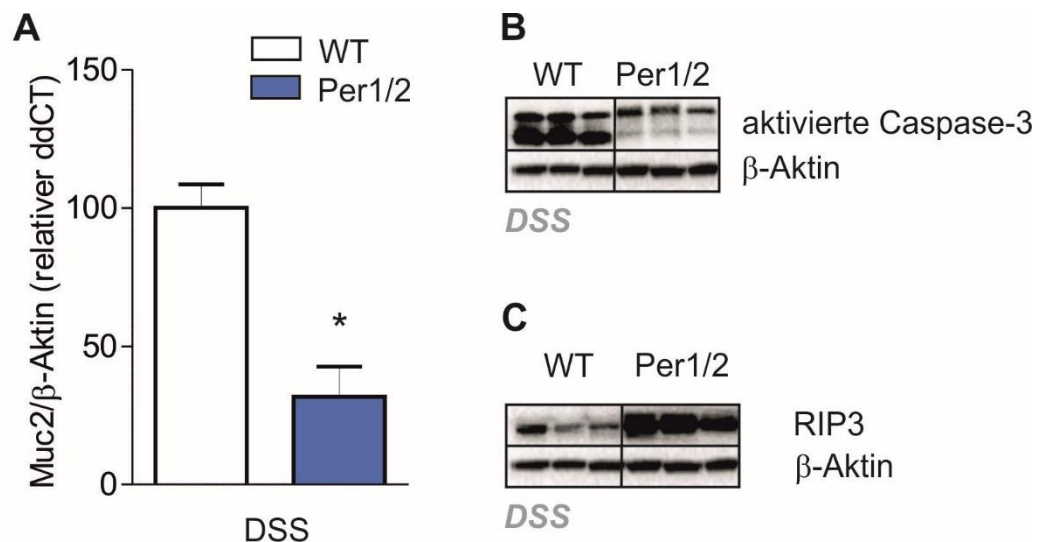
Neben diesen klinischen Befunden konnten auch verstärkte systemische Entzündungszeichen in Per1/2 Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 3.12**). So war in Kolonbiopsien dieser Mäuse, verglichen mit WT Tieren, die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine KC, IL-6 und IFN- $\gamma$  erhöht. Weiterhin konnten im Serum erhöhte Level der pro-inflammatorischen Zytokine KC und IL-1 $\beta$  gemessen werden. Interessanterweise war auch die Zunahme des KC und IL-1 $\beta$  Gehalts unter DSS Stimulus bezogen auf das unbehandelte Niveau bei Per1/2 Tieren stärker ausgeprägt als bei WT Tieren.



**Abbildung 3.12: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (3).**

(A) Bestimmung der mRNA Transkripte der pro-inflammatorischen Zytokine KC, IL-6 und IFN- $\gamma$  in Kolonbiopsien von Mäusen mit DSS Behandlung mittels RT-qPCR (WT n=10, Per1/2 n=10, normalisiert auf  $\beta$ -Aktin). (B) Bestimmung der Proteinlevel der pro-inflammatorischen Zytokine KC und (C) IL-1 $\beta$  im Serum von unbehandelten und DSS-behandelten Mäusen mittels ELISA (WT naïv n=8, WT DSS n=6, Per1/2 naïv n=8, Per1/2 DSS n=5). MW  $\pm$  SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

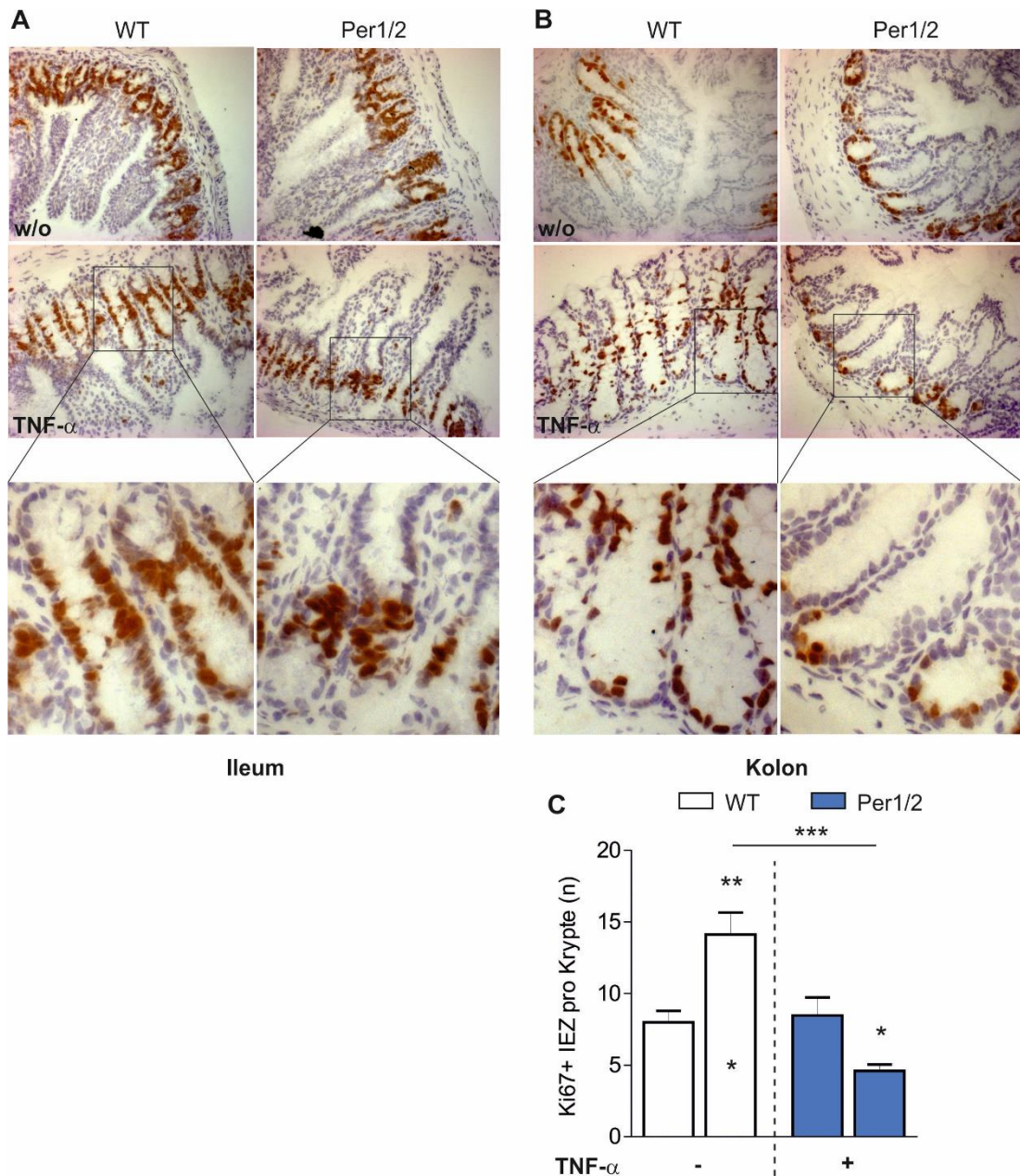
Weiterhin waren in Kolonbiopsien von Per1/2 Mäusen im Vergleich mit WT Tieren unter den entzündlichen Bedingungen einer DSS-Kolitis reduzierte Muc2-mRNA-Level und verringerte Proteinlevel an aktivierter Caspase 3 zu beobachten (**Abbildung 3.13**). Demgegenüber waren erhöhte Mengen des Nekroptosemarkers RIP3 zu verzeichnen.



**Abbildung 3.13: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (4).**

(A) Bestimmung der mRNA Transkripte von Muc2 sowie der Proteingehalte von (B) aktivierter Caspase 3 und (C) RIP3 in Kolonbiopsien von DSS behandelten Mäusen mittels RT-qPCR (normalisiert auf β-Aktin) respektive Western Blot (β-Aktin als Kontrolle). MW ± SEM; \* p<0,05.

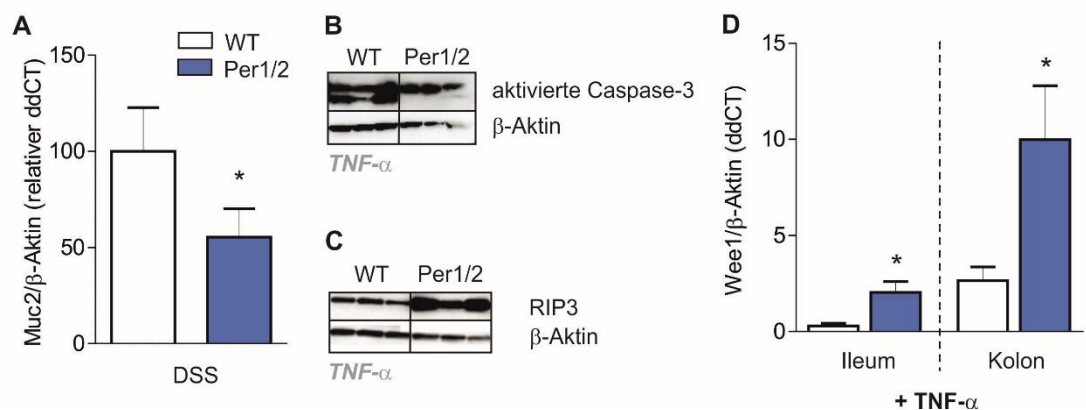
In einem weiteren Versuch wurde WT und Per1/2 Mäusen TNFα intraperitoneal injiziert, was als Modell einer Dünndarmentzündung (akute Ileitis) angesehen werden kann. Die immunhistochemische Auswertung von Ileum- und Kolonbiopsien mittels des Proliferationsmarkers Ki-67 bestätigen die BrdU Befunde hinsichtlich verringerter Proliferation bereits unter unbehandelten Bedingungen (Per1/2 und WT: repräsentative Bilder, **Abbildung 3.14**). Insbesondere nach i.p. Injektion des pro-inflammatorischen Stimulus TNF-α lassen sich deutlich weniger proliferierende Zellen in Villi und Krypten des Dün- und Dickdarms von Per1/2 Mäusen finden verglichen mit WT Tieren.



**Abbildung 3.14: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller Kolitis (1).**

Analyse der Proliferation von IEZ des Ileums und Kolons in WT und Per1/2 Mäusen. (A) Repräsentative Bilder Ki-67 positiver Zellen nach immunhistochemischer Färbung von Ileum- und (B) Kolonbiopsien unbehandelter und TNF- $\alpha$  behandelter Mäuse (Vergrößerung 10x, Einsatzbilder: tiefe Krypten). (C) Bestimmung der Anzahl Ki67 positiver IEZ im Kolon unbehandelter und TNF- $\alpha$  behandelter Mäuse (WT n=4, Per1/2 n=4-6) MW  $\pm$  SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Wie bei der DSS-Kolitis waren auch in diesem Entzündungsmodell in Darmbiopsien von Per1/2 Mäusen, verglichen mit WT Tieren, reduzierte Muc2-mRNA-Level und verringerte Proteinlevel an aktivierter Caspase 3 sowie erhöhte Mengen an RIP3 zu beobachten (**Abbildung 3.15**). Zusätzlich war auch der mRNA-Gehalt an Wee1 erhöht.



**Abbildung 3.15: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller Kolitis (2).**

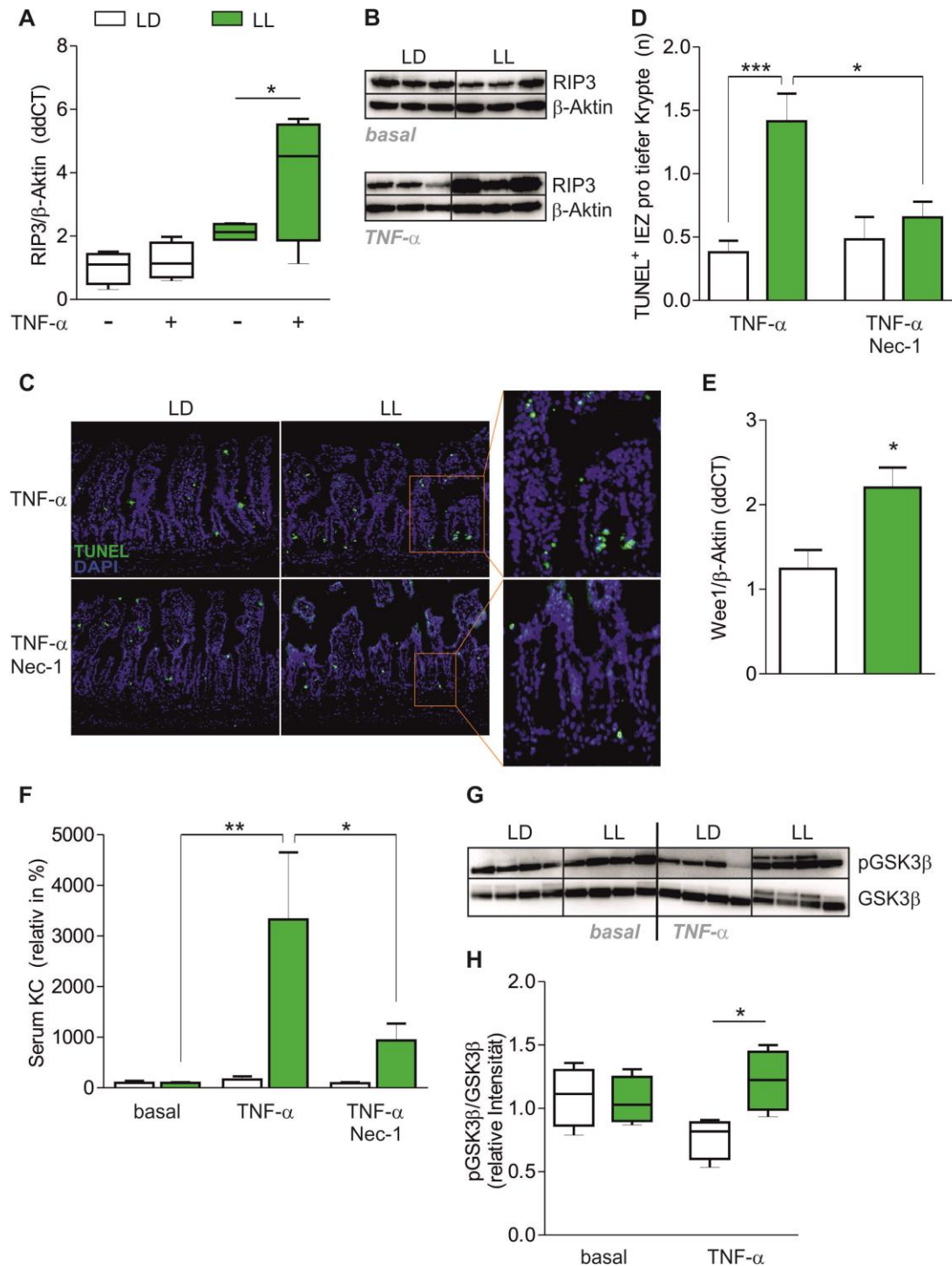
(A) Bestimmung der mRNA Transkripte von Muc2 sowie der Proteingehalte von (B) aktivierter Caspase 3 und (C) RIP3 in Kolonbiopsien von DSS behandelten Mäusen mittels RT-qPCR (normalisiert auf β-Aktin) respektive Western Blot (β-Aktin als Kontrolle). (D) Bestimmung der mRNA Transkripte von Wee1 mittels RT-qPCR (normalisiert auf β-Aktin). MW ± SEM; \* p<0,05.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Per1/2 Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für eine experimentelle Darmentzündung besitzen und dass Entzündungsprozesse in diesen Tieren stärker ausgeprägt sind. Ursächlich dafür scheint eine Dysbalance der zellulären Erneuerung des Darmepithels zu sein, bei der die Zellteilung und kontrollierte apoptotische Zelltodprozesse eingeschränkt sind und vermehrt mukosale Nekroptoseereignisse stattfinden.

### **3.6 Vermehrter nekroptotischer Zelltod von intestinalen Epithelzellen in extern desynchronisierten WT Mäusen**

Um zu überprüfen, ob die Befunde in Per1/2 Mäusen eine Relevanz hinsichtlich zirkadianer Disruption haben, wurden WT Mäuse über die Exposition gegenüber konstantem Licht (LL) exogen desynchronisiert. Als Kontrollgruppe dienten Mäuse mit einem regulären 12 h Hell-Dunkel-Zyklus (LD). Dabei war die Expression des Nekroptosemarkers RIP3 in Ileumbiopsien von LL Mäusen unter unbehandelten Bedingungen leicht aber nicht signifikant erhöht, unter den entzündlichen Bedingungen einer intraperitonealen TNF- $\alpha$  Injektion jedoch deutlich erhöht verglichen mit LD Tieren (**Abbildung 3.16**). Dieser induktive Effekt ist auch auf Proteinebene nachweisbar (LL und LD: repräsentative Bilder). Die Untersuchung des Zelltods nach TNF- $\alpha$  Gabe zeigte vermehrt TUNEL positive IEZ in den tiefen Krypten des Ileums von LL Mäusen, ein Befund, der durch gleichzeitige Verabreichung des Nekroptoseinhibitors Necrostatin 1 (Nec-1) reversibel war. Analog zu Per1/2 Mäusen war die Expression von Wee1 in Ileum Biopsien unter den entzündlichen Bedingungen der TNF- $\alpha$  Gabe erhöht. Das Proteinlevel des pro-inflammatorischen Zytokins KC wies ein ähnlich niedriges Niveau unter unbehandelten Bedingungen bei LL und LD Mäusen auf und eine Induktion nach TNF- $\alpha$  Gabe in LL Tieren, die unter zusätzlicher Nec-1 Gabe wiederum vermindert war. Ileumbiopsien von LL Mäusen zeigten unter unbehandelten Bedingungen ähnliche Proteinlevel der phosphorylierten (aktiven) Form der Kinase GSK3 $\beta$  bezogen auf die dephosphorylierte Form (LL und LD: repräsentative Bilder). Unter entzündlichen Bedingungen (TNF- $\alpha$ ) ist bei LL Mäusen ein Anstieg dieses Verhältnis im Vergleich zu LD Tieren (LL und LD: repräsentative Bilder) zu beobachten.





**Abbildung 3.16: Analyse von Zelltod und Proliferation in extern desynchronisierten WT Mäusen.**

(A) Bestimmung der mRNA Transkripte von RIP3 in Ileumbiopsien unbehandelter sowie TNF-α behandelter Mäuse mittels RT-qPCR (normalisiert auf β-Aktin). (B) Bestimmung des Proteingehalts an RIP3 in Ileumbiopsien unbehandelter sowie TNF-α behandelter Mäuse mittels Western Blot (β-Aktin als Kontrolle). (C) Repräsentative Bilder TUNEL positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung von Ileumbiopsien TNF-α behandelter Mäuse mit/ohne Gabe des Nekroptoseinhibitors Nec-1 (Vergrößerung 20x, Einsatzbilder: TUNEL positive IEC in der tiefen Krypte). (D) Bestimmung der Anzahl TUNEL positiver IEZ in den tiefen Krypten des Ileums. (E)

Bestimmung der mRNA Transkripte des Zellzyklusregulators Wee1 in Ileumbiopsien TNF- $\alpha$  behandelter Mäuse mittels RT-qPCR (normalisiert auf  $\beta$ -Aktin). **(F)** Bestimmung der Proteinlevel des pro-inflammatorischen Zytokins KC im Serum von unbehandelten Mäusen sowie nach Gabe von TNF- $\alpha$  allein oder in Kombination mit Nec-1 mittels ELISA (Angabe als relative Änderung der Konzentration). **(G)** Bestimmung des Proteingehalts an pGSK3 $\beta$  und GSK3 $\beta$  in Ileumbiopsien von unbehandelten und TNF- $\alpha$  behandelten Mäusen mittels Western Blot. **(H)** Densitometrische Auswertung der Bandenstärke mittels ImageJ (Angabe als relative Intensität des pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  Verhältnisses). MW  $\pm$  SEM; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.



## 4 Diskussion

Zunächst sollen die Veränderungen von *Per1/2* Mäuse im Darmepithel bereits unter unbehandelten Bedingungen diskutiert werden mit Fokus auf Morphologie, Zellproliferation und Zelltod. Anschließend daran werden die Ergebnisse aus den Entzündungsmodellen diskutiert, um dann im Anschluss allgemeinere Aspekte zu betrachten.

### 4.1 Eignung der *Per1/2* Doppel-Knockoutmaus als Modell für einen gestörten zirkadianen Rhythmus

*Per1/2* Mäuse tragen eine homozygote Nullmutation in den Uhrengenen *Per1* und *Per2*. Sie weisen unter einem regulären 12 h Hell-Dunkel-Zyklus ein von WT Mäusen nicht unterscheidbares zirkadianes Aktivitätsprofil auf. Werden diese Tiere jedoch konstanter Dunkelheit ausgesetzt, zeigen sie einen sofortigen und vollständigen Verlust dieser rhythmischen Aktivität und werden arrhythmisch. WT Tiere dagegen behalten auch in Dunkelheit ihr zirkadianes Aktivitätsprofil bei, lediglich bei kürzerer Periodenlänge (Bae, Jin et al. 2001, Zheng, Albrecht et al. 2001). Interessanterweise zeigen sowohl *Per1/Per3* als auch *Per2/Per3* Doppelmutanten in konstanter Dunkelheit nicht den Phänotyp der akuten Arrhythmie, sondern weisen einen schwächeren Phänotyp mit graduelltem Verlust der Rhythmik über mehrere Wochen auf, ähnlich den *Per1* und *Per2* Einzelmутanten (Bae, Jin et al. 2001). Neben *Per1/2* Mäusen wurde sofortige Arrhythmie in konstanter Dunkelheit auch in Mäusen mit gerichteter Mutation von *Bmal1* sowie in *Cry1/Cry2* Doppelmutanten beobachtet (van der Horst, Muijtjens et al. 1999, Vitaterna, Selby et al. 1999, Bunger, Wilsbacher et al. 2000). Das deutet darauf hin, dass nicht alle Uhrengene gleichermaßen wichtig für die Aufrechterhaltung eines zirkadianen Rhythmus sind und auch, dass vermutlich eine gewisse Redundanz in der Funktion verschiedener Uhrengene existiert. So reicht zum Beispiel ein einziges Allel aller vier WT *Cry* Gene (je 2 *Cry1/Cry2* Allele) für den Erhalt des Rhythmus aus (van der Horst, Muijtjens et al. 1999). Auch scheinen obige Beobachtungen zu implizieren, dass *Per3* nicht an der zirkadianen Regulierung der Bewegungsaktivität beteiligt ist und stattdessen vermutlich anderen rhythmischen Output bewirkt (Bae, Jin et al. 2001). Gleichzeitig wird deutlich, dass mit der Kombination der *Per1* und *Per2*

Nullmutation in den hier verwendeten Mäusen ein kritischer Funktionsverlust der molekularen Uhr auftritt. Dieser tritt tatsächlich nur bei *Per1/2* Doppelmutanten auf, da alle Daten von *Per1* als auch *Per2* Einzelmутanten auf eine wenigstens teilweise funktionierende Uhr hinweisen. So zeigen *Per1* Mutanten auch in konstanter Dunkelheit weiterhin ein rhythmisches Aktivitätsprofil, jedoch mit noch stärker verkürzter Periode als WT Tiere (Zheng, Albrecht et al. 2001). *Per2* Mutanten dagegen zeigen in Dunkelheit den Phänotyp des graduellen Rhythmusverlustes, stellen ihren Rhythmus nach einem Lichtpuls jedoch wieder her (Zheng, Larkin et al. 1999). *Per1/2* Doppelmutanten dagegen werden in konstanter Dunkelheit unmittelbar arrhythmisch und bleiben es auch nach einem Lichtpuls (Zheng, Albrecht et al. 2001). Weiterhin etablieren sie einen ultradianen Rhythmus unter sehr kurzen 2, 4 oder 6 h Hell-Dunkel-Zyklen, während WT Mäuse unter diesen Bedingungen ihren regulären zirkadianen Rhythmus wiederherstellen (Zheng, Albrecht et al. 2001). Das macht deutlich, dass *Per1/2* Mäuse keine funktionierende molekulare Uhr haben, sondern ihren Rhythmus allein nach dem externen Zeitgeber Licht synchronisieren.

Neben der Verhaltensebene lässt sich die Störung des zirkadianen Rhythmus in *Per1/2* Tieren auch auf molekularer Ebene nachvollziehen. Am evidentesten ist dabei der Verlust der rhythmischen Expression der *Per1* und *Per2* mRNA im zentralen Schrittmacher (Zheng, Albrecht et al. 2001). Da der SCN seinerseits alle peripheren Uhren synchronisiert, deutet auch dieser Befund auf einen vollständigen Funktionsverlust der molekularen Uhr. Weder *Per1* noch *Per2* Einzelmутanten zeigen diesen deutlichen Phänotyp. *Per1* Mutanten weisen eine unveränderte Rhythmik der *Per2* mRNA auf, während das *Per1* Fusionstranskript wie die *Per1* mRNA in WT Tieren oszilliert, jedoch mit höherem Peak. *Per2* Mutanten dagegen weisen einen fast vollständigen Verlust *Per1* mRNA Oszillation auf, während das *Per2* Fusionstranskript deutlich schwächer und mit kleinerem Peak oszilliert als die *Per2* mRNA in WT Tieren. In peripheren Geweben wie der Leber oder Niere zeigt sich ein ähnliches Bild (Zheng, Albrecht et al. 2001). Daraus wird deutlich, dass PER2 die Expression von Uhrengenen auf transkriptioneller Ebene reguliert, während PER1 zumindest für die *Per1* und *Per2* Expression entbehrlich ist. Untersuchungen auf Proteinebene belegen jedoch eine Rolle von PER1 in der posttranskriptionellen

Regulation von PER2 und demonstrieren so die Komplexität des Uhrenregelkreises und den unterschiedlichen Beitrag einzelner Komponenten (Zheng, Albrecht et al. 2001). Der gleichzeitige Verlust der beiden Komponenten *Per1* und *Per2* sorgt dann für eine kritische Störung der molekularen Uhr. Über die Analyse von Uhren-kontrollierten Genen lässt sich dieser auch an einem anderen zirkadianen Output als der Bewegungsaktivität nachvollziehen. So unterliegen in WT Mäusen die Gene *Crbp1*, *NG27*, *Alas1* und *Alas2* in der Leber einem zirkadianen Rhythmus. Während die *Crbp1* mRNA in *Per2* Mutanten zyklisch oszilliert, nicht jedoch in *Per1* Mutanten, gibt es auch Gene (*NG27*), deren Expression in *Per1* Mutanten weiterhin oszilliert aber nicht in *Per2* Mutanten. Zusätzlich gibt es Gene (*Alas1*), die in beiden Einzelmутanten weiterhin rhythmisch exprimiert werden. Alle diese Gene (*Crbp1*, *NG27*, *Alas1*) sowie weitere (*Alas2*) zeigen jedoch in *Per1/2* Doppelmутanten einen Verlust des zirkadianen Profils (Zheng, Albrecht et al. 2001).

Zusammengefasst deuten diese Befunde auf einen kompletten Funktionsverlust der molekularen Uhr in *Per1/2* Mäusen hin und machen diese somit zu einem hervorragenden Modellorganismus, um den Einfluss eines genetisch determinierten, gestörten zirkadianen Rhythmus auf die Homöostase des Darmepithels und intestinale Entzündungsprozesse zu untersuchen.

## **4.2 Per1/2 Mäuse zeigen eine veränderte Architektur der intestinalen Mukosa hinsichtlich der Barrierefunktion**

Der Hypothese folgend dass die Störung des zirkadianen Rhythmus in Per1/2 Mäusen die Barrierefunktion des Darmepithels beeinträchtigt wurde zunächst die Epithelbarriere unter unbehandelten Bedingungen detailliert auf mögliche Veränderungen hin untersucht. Bislang wurden keine Zeichen spontaner intestinaler Entzündung von Per1/2 Mäusen in der Literatur beschrieben, und auch in dieser Arbeit gab es nach endoskopischer und histologischer Auswertung keine Anhaltspunkte dafür. Weiterhin war die zelluläre Komposition der Mukosa hinsichtlich der Anzahl von IEZ pro Krypte sowie von enterochromaffinen Zellen und intestinalen Stammzellen nicht verschieden verglichen mit WT Tieren. Zusammengefasst wird deutlich, dass die allgemeine Mukosaarchitektur von Per1/2 Mäusen weitgehend unverändert ist mit der Ausnahme, dass ein spezifischer Verlust sekretorischer Becher- und Paneth Zellen vorliegt.

Als Grenzschicht zwischen der Umwelt und dem Organismus ist eine intakte Darmbarriere fundamental für die Lebensfähigkeit, um das Eindringen von Pathogenen zu verhindern und trotzdem die Aufnahme von Nährstoffen zu ermöglichen. Die als hochprismatisches und einschichtiges Darmepithel organisierten IEZ bilden dabei eine miteinander über Tight Junctions vernetzte, hochdynamische physikalische Barriere, die konstitutiv und induzierbar antimikrobielle Peptide wie Lysozyme und Defensine sowie Mukus in das Darmlumen sezernieren. Störungen der Darmbarriere gelten als ein maßgebliches Kennzeichen von CED (Schroder 1999, Schroder 1999, Laukoetter, Nava et al. 2008, Salim and Soderholm 2011, Camilleri, Madsen et al. 2012). Beeinträchtigungen der antimikrobiellen Abwehr sowohl in der Form von reduzierten Paneth Zell Produkten wie  $\alpha$ -Defensinen (Wehkamp and Stange 2010) als auch in Form von Becherzellverlust zusammen mit einer mangelhaften Mucusschicht (Gersemann, Becker et al. 2009) werden als Beobachtungen bei/Risikofaktoren für CED diskutiert (Gersemann, Stange et al. 2011). Der Zell- und Funktionsverlust von Paneth und Becherzellen in Per1/2 Mäusen unter unbehandelten Bedingungen ist dabei offensichtlich subtil genug, um keine spontanen Entzündungsgeschehen hervorzurufen, wie sie z.B. bei Mucin-2 defizienten Mäusen beobachtet werden

(Van der Sluis, De Koning et al. 2006). Vermutet werden kann, dass er eine höhere Suszeptibilität für und eine schwerere Verlaufsform von intestinalen Entzündungen determiniert. Interessanterweise ist die Expression von Cryptdinen, von Paneth Zellen produzierte Defensine der Maus, unter gesunden Bedingungen einem zirkadianen Rhythmus unterworfen (Froy, Chapnik et al. 2005). Ansätze dafür, wie die Defizienz der Uhrgene *Per1/Per2* zu dem beobachteten Phänotyp von *Per1/2* Mäusen führt, sollen nachfolgend aufgeklärt werden. Ganz grundsätzliche Möglichkeiten für einen Zellverlust sind dabei eine verminderte Neubildung (Proliferation/Differenzierung) oder ein vermehrter Untergang (kontrollierter oder unkontrollierter Zelltod).

### **4.3 Intestinale Epithelzellen von Per1/2 Mäuse weisen ein reduziertes Proliferations-Verhalten auf**

In der Tat gibt es hinsichtlich der Proliferation von IEZ in Per1/2 Mäusen Auffälligkeiten. So zeigte sich bei der *in vivo* Analyse der Zellteilung mittels BrdU Inkorporation in Per1/2 Mäusen eine geringere Proliferationsrate von IEZ über die Zeit.

In den letzten Jahren hat sich die Differenzierung von Barriere-protectiven Paneth und Becherzellen aus intestinalen Stammzellen als möglicher pathogener Faktor bei CED etabliert (Gersemann, Stange et al. 2011). Paneth Zellen entwickeln sich unter Kontrolle des Wnt Signalweges direkt aus intestinalen Stammzellen. Dabei spielt der Transkriptionsfaktor Tcf-4 eine regulatorische Rolle bei der Differenzierung zur Paneth Zelle sowie bei der Paneth Zell-spezifischen Genexpression (z.B. von Defensinen) (van Es, Jay et al. 2005). Patienten mit MC im Ileum (Ileitis terminalis) weisen reduzierte Expressionslevel von  $\alpha$ -Defensinen und Tcf-4 auf, und Extrakte der intestinalen Mukosa dieser Patienten zeigen eine reduzierte antibakterielle Aktivität. Diese Befunde konnten auch in Mausmodellen (transgene, humanes  $\alpha$ -Defensin 5 exprimierende Maus; hetero- und homozygote Tcf-4 Knockout Maus) bestätigt werden (Wehkamp, Salzman et al. 2005, Wehkamp, Wang et al. 2007). Aber auch eine genetische Disposition für verstärkte Autophagy durch das ATG16L1 (*autophagy related 16-like 1*) Risikoallel und ER Stress durch Störungen der *Unfolded Protein Response* wurden in Zusammenhang gebracht mit Paneth Zell Defekten und Ileitis (Adolph, Tomczak et al. 2013). Unabhängig von den zugrundeliegenden Ursachen der Paneth Zell Störung scheint in der Gesamtheit die reduzierte antimikrobielle Abwehr dann ursächlich zu sein für das Eindringen luminaler Pathogene in die Mukosa mit resultierenden Entzündungsprozessen durch das adaptive Immunsystem. Auf der anderen Seite ist die Anreicherung von Paneth Zellen, wie sie bei Mäusen mit einem Darmepithel-spezifischen Knockout von Sirt1 beobachtet werden kann, protektiv hinsichtlich Darmentzündung sowie Kolorektalem Karzinomen (Lo Sasso, Ryu et al. 2014). Anders als Paneth Zellen differenzieren sich Becherzellen nach der Proliferation von intestinalen Stammzellen aus epithelialen Vorläuferzellen bei der Migration entlang der Kryptenachse unter Kontrolle der Transkriptionsfaktoren Hath1, KLF4 und Hes1.

Mäuse mit einem Knockout von Math1 (Yang, Bermingham et al. 2001), dem murinen Homolog zum humanen Hath1, oder von Klf4 (Katz, Perreault et al. 2002) bilden (fast) keine Becherzellen aus. Bei CU Patienten ist eine Verringerung der Dicke der Mukusschicht, insbesondere in entzündeten Arealen der Mukosa, zu beobachten (McCormick, Horton et al. 1990, Pullan, Thomas et al. 1994), verbunden mit reduzierten Zahlen an ausgereiften Becherzellen im oberen Teil der Krypte (Gersemann, Becker et al. 2009). Eine defekte Mukusschicht könnte dann die Funktion einer physikalischen und chemischen Barriere nur unzureichend erfüllen, so dass luminale Pathogenen in die Mukosa translozieren und Entzündungsprozesse induzieren können. In der Tat können bei CED Patienten, im Gegensatz zu gesunden Kontrollen, hohe Konzentrationen an Bakterien nicht nur direkt auf der Epithelschicht, sondern auch innerhalb von IEZ, beobachtet werden. Dabei korrelierte das Ausmaß der bakteriellen Invasion mit dem Entzündungsgrad (Swidsinski, Ladhoff et al. 2002).

Aus diesen Daten wird deutlich, dass Prozesse, die in die Homeostase der intestinalen Stammzellen (Zellteilung, Erhalt des eigenen undifferenzierten Status, Differenzierung der Tochterzellen) eingreifen, auch Auswirkungen auf nachgeschaltete Ereignisse haben. Störungen der Zellteilung von intestinalen Stammzellen und der anschließenden Differenzierung in die Zielzellen könnten also den Paneth und Becherzellverlust der Per1/2 Mäuse erklären. In der Tat ist in *Drosophila* die Defizienz für das Gen *period*, dem Homolog zu den humanen *Per1-3* Genen, assoziiert mit einem veränderten Teilungsverhalten von intestinalen Stammzellen nach dem toxischen Stimulus DSS. Im Gegensatz zum Kontrollstamm zeigt dabei der *period* defiziente Stamm keinen zirkadianen Rhythmus mehr in den Mitose-Raten und insgesamt weniger Mitosen der intestinalen Stammzellen (Karpowicz, Zhang et al. 2013). Interessanterweise zeigen Darmbiopsien von Per1/2 Mäusen eine höhere Expression der Kinase Wee1 (*Wee1-like protein kinase*) unter unbehandelten Bedingungen. Wee1 verzögert den Eintritt einer sich teilenden Zelle in die Mitose, so dass vorher ein ausreichendes Zellwachstum stattfinden kann. In Hefezellen führt die Überexpression des Mitose-Induktors cdc25 zu einer vorzeitigen Mitose mit letalem Phänotyp, was durch Wee1 Aktivität verhindert wird (Russell and Nurse 1987). Übermäßige Wee1 Aktivität könnte somit zu einem Arrest

der Zelle vor der M Phase führen, wie auch die Daten in *Drosophila* vermuten lassen (Karpowicz, Zhang et al. 2013). Nach den in der Datenbank CircaDB [<http://circadb.hogeneschlab.org>, (Pizarro, Hayer et al. 2013)] hinterlegten Affimetrix und GNF Microarray Daten weist die Expression von Wee1 in der Leber von WT Mäusen einen zirkadianen Rhythmus auf (Miller, McDearmon et al. 2007, Hughes, DiTacchio et al. 2009), der in homozygoten *Clock* Mutanten gestört ist (Miller, McDearmon et al. 2007). Zusammenfassend kann postuliert werden, dass in arrhythmischen *Per1/2* Mäusen der zirkadiane Rhythmus des Zellteilungsregulators Wee1 gestört ist und somit das Proliferationsverhalten der intestinalen Stammzellen unphysiologisch beeinflusst. Störungen der daraus resultierenden Stammzellteilung- und differenzierung könnten dann ursächlich für den beobachteten Paneth und Becherzellverlust sein.



#### **4.4 Vermehrter nekroptotischer Zelltod von intestinalen Epithelzellen in Per1/2 Mäusen**

Zusätzlich zum Befund einer reduzierten Zellproliferation im Darmepithel von Per1/2 Mäusen könnte auch ein vermehrter Zelltod den Verlust von Paneth und Becherzellen erklären. Tatsächlich zeigten sich nach TUNEL Färbung vermehrt tote/sterbende IEZ in den Krypten des Dün- und Dickdarms von Per1/2 Mäusen, während diese Zellen bei WT Tieren am Villus- und Kryptenende zu beobachten waren. Nachfolgend wurden die tiefen Kryptenregionen zusätzlich morphologisch mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Dabei zeigten sich WT Mäuse unauffällig, während bei Per1/2 Mäusen vermehrt Zellen mit Zeichen nekrotischen Zelltods [Kriterien siehe (Kroemer, Galluzzi et al. 2009)] wie geschwollenen Mitochondrien zu beobachten waren. Auf Proteinebene zeigte sich unter unbehandelten Bedingungen höhere Level des Nekroptosemarkers RIP3 in Darmbiopsien von Per1/2 Mäusen. Auffällig in Granula-haltigen Paneth Zellen von Per1/2 Tieren waren Amyloid-ähnliche Ablagerungen filamentöser Struktur, die sich nach Immunogoldfärbung als RIP3 positiv darstellten. Diese Plaques waren nicht von Doppelmembranen umgeben, wie es typisch für Autophagosomen ist. Stattdessen ähneln sie dem Necrosome, einem Immunkomplex aus RIP1 und RIP3, der nekroptotischen Zelltod vermittelt und elektronenmikroskopisch ebenfalls eine filamentöse Struktur aufweist (Li, McQuade et al. 2012).

Physiologischer Zelltod im Darmepithel findet an den Spitzen der Villi und Krypten statt. Dabei migrieren die IEZ entlang der Krypten/Villusachse, und bei Erreichen der luminalen Oberfläche wird das Zelltodprogramm der Apoptose initiiert. Anschließend werden die IEZ in das Lumen abgeschieden (Grossmann, Walther et al. 2002). Die Befunde in Per1/2 Mäuse dagegen deuten auf vermehrten Zelltod in den tiefen Krypten hin, und weisen morphologisch sowie vom Proteinmarker RIP3 Charakteristiken nekroptotischen Zelltods auf. Interessanterweise wurde Nekroptose in der tiefen Kryptenregion bereits mit dem Phänotyp der höheren Suszeptibilität für Kolitis in Verbindung gebracht. So zeigen Mäuse mit einem konditionalen Knockout von FADD (*FAS-associated death domain protein*) spezifisch im Darmepithel nekroptotischen Zelltod in IEZ, weisen einen Verlust von Paneth Zellen auf und entwickeln spontane Entzündungen in Dün- und Dickdarm.

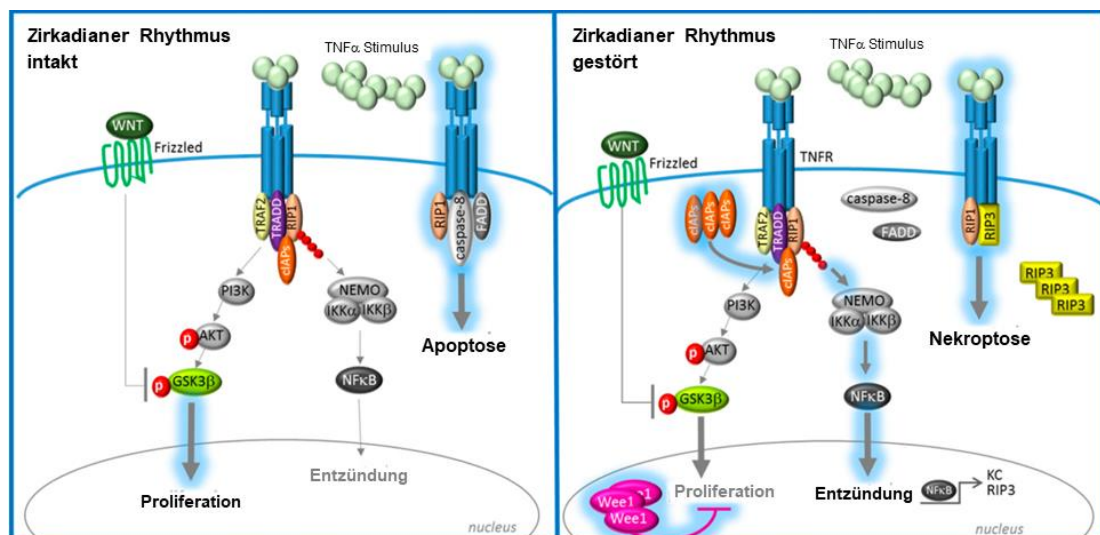
Gleichzeitige Defizienz für RIP3 verhindert diesen Phänotyp, so dass gefolgert werden kann, dass FADD die RIP3-vermittelte Nekroptose von IEZ, speziell Paneth Zellen, inhibiert und dadurch die Integrität der Darmbarriere bewahrt (Welz, Wullaert et al. 2011). Auch Mäuse mit einem konditionalen Knockout von Caspase 8 spezifisch im Darmepithel zeigen einen Verlust von Paneth Zellen, entwickeln eine spontane Ileitis und sind anfälliger für eine experimentelle DSS Kolitis. Nekroptose Inhibitoren konnten dabei den epithelialen Zelltod inhibieren (Gunther, Martini et al. 2011). In Biopsien von MC Patienten konnten höhere Level an RIP3 in Paneth Zellen und vermehrter nekroptotischer Zelltod im terminalen Ileum identifiziert werden (Gunther, Martini et al. 2011). Auch in *Per1/2* Mäusen ist der Verlust von Paneth Zellen assoziiert mit vermehrtem nekroptotischen Zelltod.

In der Gesamtheit ergibt sich ein Bild, dass sekretorische Zellen wie Paneth Zellen äußerst sensibel für RIP3 vermittelte Nekroptose sind, und ein Verlust von Paneth Zellen die Suszeptibilität von Darmentzündungen sowohl im Menschen als auch im Mausmodell erhöht. Warum ausgerechnet Paneth Zellen mit Nekroptose reagieren ist unklar. Möglicherweise steht diesen metabolisch hoch aktiven Zellen (Produktion von antimikrobiellen Peptiden) nicht genug Energie für den Energie-abhängigen Prozess der Apoptose zur Verfügung (Eguchi, Shimizu et al. 1997, Los, Mozoluk et al. 2002). Die Ergebnisse der Studien mit Darmepithel-spezifischen Caspase 8 und FADD Knockout Mäusen führten zu der Idee, dass eine Störung des Signalweges zur Einleitung der Apoptose in der RIP3 vermittelten Nekroptose mündet (Gunther, Neumann et al. 2013). Interessanterweise ist die Expression des anti-apoptotisch wirksamen Proteins cIAP2 im Darm von *Per1/2* Mäusen unter unbehandelten Bedingungen erhöht. Offensichtlich greift die Arrhythmie der *Per1/2* Mäuse nicht nur in die zellulären Prozesse der Zellteilung ein, sondern auch in die Zelltodregulation. Um diese Hypothese auch in einem experimentellen System zu überprüfen, wurden in der murinen Epithelzelllinie IEC-1 mittels siRNA die Gene *Per1* und *Per2* gesilenced und anschließend der Zelltod mit dem Stimulus TNF- $\alpha$  induziert. Im Gegensatz zu Kontrollzellen zeigen *Per1/Per2* transfizierte IEC-1 Zellen eine verringerte Aktivierung der Initiatorcaspasen 3/7 sowie 8. Bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Smac Mimetikum BV-6, welches die zelluläre Anti-Apoptose (XIAP, cIAP1, cIAP2) inhibiert, zeigen *Per1/Per2* transfizierte Zellen wieder das

gleiche Aktivierungsverhalten der Caspasen 3/7 und 8 wie Kontroll-siRNA transfizierte Zellen. Während es in dieser Arbeit für den Darm und eine Darmepithelzelllinie gezeigt wurde, lässt sich Apoptose-Resistenz auch in primären Hepatozyten beobachten, die aus Clock Knockout Mäusen isoliert wurden (Matsunaga, Kohno et al. 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Mutation im Per2 Gen (S662G), die zu vorgelagertem Schlafphasensyndrom führt, assoziiert ist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Röntgenstrahlen-induzierter Apoptose (Gu, Xing et al. 2012). Insofern stärken die Ergebnisse der Zellkulturexperimente die aus Per1/2 Mäusen erhobenen Befunde in Per1/2 Mäusen und belegen die Hypothese, dass zirkadiane Disruption in Prozesse der Zelltodregulation eingreift.

#### 4.5 Postulierter mechanistischer Zusammenhang zwischen mukosaler Nekroptose und Zellzyklusinhibition sowie verstärkter Anti-Apoptose

Ein intakter zirkadianer Rhythmus sorgt für eine Homöostase des Darmepithels durch die Koordination von Zellteilung und Zelltod der intestinalen Epithelzellen sowohl unter unbehandelten als auch entzündlichen Bedingungen. Ist der zirkadiane Rhythmus durch endogene oder exogene Einflüsse beeinträchtigt, wird dieses Gleichgewicht gestört und es kommt auf der einen Seite zu Einschränkungen in der Gewebserneuerung (verringerte Proliferation) und auf der anderen Seite zu Einschränkungen des regulären Zelltods (verringerte zelluläre Apoptose), insbesondere unter entzündlichen Bedingungen (**Abbildung 4.1**).



**Abbildung 4.1: Postulierter Mechanismus von zirkadianer Disruption hinsichtlich Homöostase und Zelltod von IEZ.**

Bei intaktem zirkadianem Rhythmus sind Proliferation und Apoptose von intestinalen Epithelzellen ausbalanciert. Diese Homöostase wird durch zirkadiane Störungen beeinträchtigt: die verstärkte Expression des Zellzyklusregulators Wee1 sorgt für reduzierte Teilungsraten, und durch die verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins cIAP2 wird einerseits die Apoptose inhibiert, während es gleichzeitig über die Aktivierung des NFκB Signalweges zu vermehrter RIP3-induzierter Nekroptose kommt. Nekroptose von intestinalen Epithelzellen kann dann unter entzündlichen Bedingungen zu einer sich selbst verstärkenden chronischen Entzündung führen [nach (Pagel, Bar et al. 2017)].

Eine Hemmung der Proliferation erfolgt über die verstärkte Expression des Zellzyklusregulators Wee1, was einen Arrest sich teilender Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus und somit reduzierte Teilungsraten hervorruft. Eine Hemmung der

Apoptose erfolgt über das verstärkt exprimierte anti-apoptotische Protein cIAP2, was eine Aktivierung des NFκB Signalweges und folglich eine Heraufregulation von RIP3 hervorruft. RIP3 wiederum induziert dann Nekroptose in intestinalen Epithelzellen, was insbesondere unter entzündlichen Anfangsbedingungen zu einer selbstverstärkenden chronischen Entzündung führen und somit ursächlich zu CED beitragen kann (Pagel, Bar et al. 2017).

#### **4.6 Eignung der DSS Kolitis als Modell für eine experimentelle, intestinale Entzündung**

Zur Erforschung von CED stehen diverse Tier-experimentelle Kolitis-Modelle zur Verfügung. Nicht zuletzt aufgrund der äußerst vielfältigen Phänotypen von CED gibt es jedoch (bisher) kein Modell einer experimentellen Kolitis, welches alle charakteristischen Bandbreiten von CED widerspiegelt. Grundsätzlich kann unterschieden werden in spontan-entzündliche, chemisch induzierte, immunologisch vermittelte [z.B. adoptiver Transfer von stark CD45RB exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in immundefiziente Empfängermäuse (Morrissey, Charrier et al. 1993)] oder genetisch manipulierte [z.B. IL-2 (Sadlack, Merz et al. 1993) oder T-Zellrezeptor (Mombaerts, Mizoguchi et al. 1993) oder IL-10 (Kuhn, Lohler et al. 1993) Knockout Mäuse] Modelle, wobei die Übergänge wie bei der spontanen Ileitis bei transgenen TNF<sup>ΔARE/ΔARE</sup> Mäusen (Kontoyiannis, Pasparakis et al. 1999) fließend sein können. Die Festlegung auf Per1/2 Mäuse in dieser Studie schließt die letzten beiden Modelle von vornherein aus, um eine mögliche Beeinflussung des definierten zirkadianen Phänotyps zu vermeiden. Weiterhin wurde das Auftreten einer spontanen Darmentzündung wie der Ileitis bei SAMP1/Yit Mäusen [natürliche Auszucht (Matsumoto, Okabe et al. 1998)] in Per1/2 Mäusen bisher nicht beschrieben.

Bei den chemisch induzierten Entzündungsmodellen sind insbesondere die DSS (*dextran sodium sulphate*), TNBS (*2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid*) und Oxazolone Kolitis zu nennen. Bei der TNBS Kolitis wird TNBS zusammen mit Ethanol in den Dickdarm appliziert. Ethanol schädigt dabei die Darmbarriere, während TNBS vermutlich als Hapten wirkt und Proteine des Kolons oder der Mikrobiota immunogenisiert. Die resultierende Immunreaktion ist überwiegend Th1 getrieben und gekennzeichnet durch die Kolonwand infiltrierende Lymphozyten und Makrophagen und ähnelt dem humanen MC (Neurath, Fuss et al. 1995). Die Oxazolone Kolitis (rektale Applikation des Haptens Oxazolone in Ethanol) dagegen ist eine überwiegend Th2 vermittelte Immunantwort mit Infiltration von Neutrophilen und Lymphozyten in die obere Mukosa sowie Ulzerationen und ähnelt somit der humanen CU (Baird, Fuss et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit war primär die Barrierefunktion (sowie die postulierte Störung derselben durch

zirkadiane Disruption) des Darmepithels mit seinen unterschiedlichen Populationen von IEZ der Fokus des Interesses. Um Mechanismen des angeborenen Immunsystems hinsichtlich der Kolitisentstehung zu untersuchen, eignet sich insbesondere das DSS Kolitis Modell (Wirtz, Neufert et al. 2007). Das auch T- und B-Zell-defiziente C.B-17<sup>scid</sup> Mäuse unter DSS-Gabe eine ausgeprägte Kolitis entwickeln verdeutlicht, dass das adaptive Immunsystem zumindest in der akuten Phase eine untergeordnete Rolle bei der DSS Kolitis spielt (Dieleman, Ridwan et al. 1994). Die Gabe von DSS über das Trinkwasser induziert akute, physikalische Schäden im Darmepithel. Der exzessive Kontakt des Immunsystems mit der Mikroflora des Darms infolge der Barrierschäden führt zu unkontrollierten, unspezifischen Entzündungsreaktionen durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen. Im chronischen Stadium ist die Entzündung charakterisiert als eine gemischte Th1/Th2 T-Zellantwort mit einer überschießenden Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (Strober, Fuss et al. 2002). Histopathologisch lassen sich, überwiegend begrenzt auf das (distale) Kolon, umfangreiche Schäden der Epithelzell- und Kryptenstruktur beobachten sowie Infiltrationen von Immunzellen in die Mukosa, Ödeme und Ulzerationen (Kawada, Arihiro et al. 2007). In ihrem gesamten Phänotyp erscheint die DSS Kolitis daher als ein Modell für die humane CU. Durch das Ansprechen auf Therapeutika von humanem CED (z.B. Cyclosporine A, anti-IL-12p40) konnte gezeigt werden, dass die DSS Kolitis tatsächlich ein relevantes Modell ist für die Übertragung von Ergebnissen aus Mausstudien auf humanen CED (Melgar, Karlsson et al. 2008). Die Induktion der DSS-Kolitis ist einfach, der Erkrankungsbeginn ist unmittelbar und die Erkrankungsdauer und –schwere lassen sich leicht kontrollieren. Durch Variation der DSS-Konzentration sowie der Zyklenlänge und –anzahl (Trinkwasser mit/ohne DSS) lassen sich akute, chronische oder wiederkehrende Darmentzündungen induzieren, so dass eine große Variabilität innerhalb des Modells möglich ist (Perse and Cerar 2012). Zusätzlich ist das Modell flexibel erweiterbar, denn die kombinierte Gabe von Azoxymethan induziert hocheffizient kolorektale Karzinome (De Robertis, Massi et al. 2011). Die Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung einer DSS Kolitis ist abhängig vom jeweiligen Mausstamm (Wirtz, Neufert et al. 2007). Die hier verwendeten C57BL/6 Mäuse gelten als mittel bis hoch anfällig für dieses

Entzündungsmodell (Mahler, Bristol et al. 1998, Wirtz, Neufert et al. 2007). In der Datenbank Pubmed vom NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) finden sich zur DSS Kolitis (Suchbegriffe „dss colitis“ AND mice) 526, für die TNBS Kolitis (Suchbegriffe „tnbs colitis“ AND mice) 173 und für die Oxazolone Kolitis (Suchbegriffe „oxazolone colitis“ AND mice) 28 Einträge (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; 10.11.2019 um 16:17 Uhr; keine weitere Differenzierung der Einträge). Damit ist die DSS Kolitis vermutlich das gebräuchlichste aller chemisch induzierten, experimentellen Kolitis Modelle und wird auch in der Literatur als das meist genutzte und akzeptierte Modell angesehen (Perse and Cerar 2012). Nicht zuletzt bietet die weite Verbreitung und Nutzung des DSS Modells den Vorteil der Vergleichbarkeit, mit allen Einschränkungen natürlich, die mit lokalen Umgebungseinflüssen wie dem Tierpflegepersonal (Anzahl, Ausbildung, individuelle Verhaltensweisen), dem Futter und Trinkwasser, den Räumlichkeiten (Raumgröße, Helligkeit, Belüftung, Temperatur), der Frequentierung mit wissenschaftlichen oder technischen Personal sowie unzähligen Weiteren einhergehen.



#### **4.7 Per1/2 Mäuse zeigen einen verstärkten pro-inflammatorischen Phänotyp bei Induktion einer experimentellen Kolitis**

Zur Überprüfung der Grundannahme, dass die zirkadiane Disruption aufgrund der *Per1/Per2* Defizienz auch die Suszeptibilität für intestinale Entzündungen erhöht, wurde in *Per1/2* und WT Mäusen schließlich eine chronische DSS Kolitis induziert. Der Verlauf dieser experimentellen Kolitis stellte sich in *Per1/2* Mäusen schwerwiegender dar als in WT Tieren, nicht nur mit erhöhter Entzündungsaktivität sondern bis hin zu dramatisch erhöhter Letalität. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Literaturdaten die zeigen, dass zirkadiane Störungen die Suszeptibilität für intestinale Entzündungen erhöhen. So führen einerseits akuter und chronischer Schlafentzug infolge erzwungener Bewegung im Laufrad (Modell für Schichtarbeit) als auch der Phasenwechsel des Hell-Dunkel-Zyklus (Modell für Jetlag) zu einer verstärkten Ausprägung einer experimentellen Kolitis (Preuss, Tang et al. 2008, Tang, Preuss et al. 2009). Auch im Menschen konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im Uhrengen *PER3* assoziiert ist mit der Suszeptibilität für CED sowie einer schwereren Verlaufsform von MC (Mazzocchi, Palmieri et al. 2012).

Der exakte Wirkmechanismus von DSS ist weitgehend unbekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass es direkt toxisch auf das Darmepithel wirkt. So ist nach DSS-Gabe, noch vor der Ausbildung von klinischen Symptomen, ein fokaler Verlust der Kryptenarchitektur bis hin zu Kryptenatrophie und Erosionen zu beobachten (Cooper, Murthy et al. 1993). Dabei wird DSS offensichtlich spezifisch im Kolon verstoffwechselt, indem es an dort vorkommende Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge (MCFAs, *medium-chain-length fatty acids*) wie Dodecansäure bindet. Dabei entstehen nm-große Vesikel, die mit der Zellmembran der Kolonozyten verschmelzen und das DSS so ins Zytoplasma einbringen, wo es seine pro-inflammatorische Wirkung entfalten kann (Laroui, Ingersoll et al. 2012). Das könnte die Aktivierung entzündlicher Signalwege sein, die in der verstärkten Expression entzündlicher Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, KC und IFN- $\gamma$  durch die Darmmukosa resultieren (Yan, Kolachala et al. 2009). Ein ebenfalls früher Befund während der Kolitis Induktion ist der Verlust des Tight Junction Proteins ZO-1, was letztlich die Darmpermeabilität erhöht und dadurch möglicherweise zusätzlich die Aufnahme von DSS erleichtert (Poritz, Garver et al. 2007). Aber auch eine Hemmung

der Polymerase- und Ribonukleaseaktivität durch DSS ist beschrieben worden (Miyazawa, Olijnyk et al. 1967, Kerr, Ciorba et al. 2012, Viennois, Chen et al. 2013), was weitreichende Auswirkungen auf die Zellhomöostase vor allem von proliferierenden Zellen, wie sie in den Krypten vorkommen, haben könnte. In späteren Phasen der DSS Kolitis kommt es dann zu Erosionen und Ulzerationen sowie durch den Einstrom von Immunzellen in die Lamina propria und die Mukosa zu einer Beteiligung des adaptiven Immunsystems (Chassaing, Aitken et al. 2014). Zusammenfassend wird deutlich, dass die DSS Kolitis mechanistisch unter anderem auf einer Kompromittierung der Barrierefunktion des Darmepithels beruht. Diese tritt in Form des spezifischen Verlustes von sekretorischen Becher- und Paneth Zellen bei Per1/2 Mäusen bereits unter unbehandelten Bedingungen auf, obwohl sich hier noch kein entzündlicher Phänotyp zeigt. Die Anfälligkeit für Darmentzündung und die Ausprägung derselben sind dann jedoch signifikant erhöht. Neben der DSS-Kolitis wurde in einem zweiten intestinalen Entzündungsmodell WT und Per1/2 Mäusen TNF $\alpha$  intraperitoneal injiziert, und auch hier zeigten sich Zellteilung und -tod kompromittiert.

#### **4.8 Auch extern desynchronisierte WT Mäuse zeigen epitheliale Nekroptose**

Der durch die Defizienz der Uhrgene *Per1* und *Per2* genetisch determinierte starke Phänotyp der völligen zirkadianen Disruption ist zur Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sehr geeignet, bezüglich der Translation auf den Menschen jedoch durchaus als hoch artifiziell anzusehen. Einzelne Genpolymorphismen von Uhrgenen konnten bisher mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert werden. So ist die rs2797685 Genvariante von *PER3* assoziiert mit einem höheren Erkrankungsrisiko von CED und einer schwereren Verlaufsform von MC (Mazzoccoli, Palmieri et al. 2012). Polymorphismen von Uhrgenen und Komponenten der molekularen Uhr wurden auch in Zusammenhang mit Schlaflosigkeit [*PER2* (Li, Huang et al. 2015)] und vorverlagertem [*PER2* (Toh, Jones et al. 2001); *CK1 $\delta$*  (Xu, Padiath et al. 2005)] sowie verzögertem [*PER3* (Ebisawa, Uchiyama et al. 2001, Archer, Robilliard et al. 2003); *CK1 $\epsilon$*  (Takano, Uchiyama et al. 2004)] Schlafphasensyndrom beschrieben (Ebisawa 2007). Weiterhin ist in entzündlichen Mukosa-Arealen von CED Patienten die Expressionsstärke vieler Uhrgene verändert verglichen mit benachbarten nicht-entzündlichen Gebieten (Palmieri, Mazzoccoli et al. 2015), und auch in Gewebeproben von Magenkarzinomen ist die Uhrgenenexpression dereguliert verglichen mit gesundem Gewebe (Hu, Yeh et al. 2014). Aber ein vollständiger, genetisch bedingter Funktionsverlust der molekularen Uhr wie im Tiermodell der *Per1/2* Maus ist bisher nicht beschrieben. Aus diesem Grund sollte abschließend ein weiteres Tiermodell für zirkadiane Störung genutzt werden um zu überprüfen, ob die beobachteten Befunde eine allgemeingültige Relevanz besitzen. Dabei fiel die Wahl auf das Modell der exogenen Desynchronisation mittels veränderter Lichtregimen. Licht ist ein starker externer Zeitgeber, und veränderte Lichtbedingungen, die sich experimentell einfach kontrollieren lassen, haben einen großen Einfluss auf die Phase der inneren molekularen Uhr (Jud, Schmutz et al. 2005). Unter konstanten Lichtbedingungen (LL) wird der zentrale Schrittgeber arrhythmisch in seinem Output und in der Folge auch die zirkadianen Verhaltensweisen von Mäusen (Ohta, Yamazaki et al. 2005). Obwohl kontinuierliche Lichtbedingungen für den Menschen eher untypisch sind, ist es Licht in der

biologischen Dunkelphase zunehmend nicht. Vom Fernseher über Autoscheinwerfer zur Straßenbeleuchtung bis hin zur Nachtarbeit und dem Polartag sind viele Lichtsignale denkbar, die dem regulären 24 h Tag-Nacht-Zyklus zuwiderlaufen. In der Maus sind wiederholte Phasenwechsel des Hell-Dunkel Zyklus assoziiert mit einer schwereren Verlaufsform von experimenteller Kolitis, die molekularen Zusammenhänge bleiben jedoch unklar (Preuss, Tang et al. 2008).

Exogen durch konstantes Licht desynchronisierte WT Mäuse zeigen einen vergleichbaren, aber abgeschwächten intestinalen Phänotyp wie Per1/2 Tiere. Unter unbehandelten Bedingungen sind sie eher unauffällig verglichen mit LD Tieren. Unter den entzündlichen Bedingungen einer TNF- $\alpha$  Applikation zeigen sie aber auch erhöhte Level des Nekroptosemarkers RIP3 sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene, vermehrt Zelltod in den tiefen Krypten und eine erhöhte Proteinlevel des pro-inflammatorischen Zytokins KC. Dabei sind diese Effekte reversibel, denn nach gleichzeitiger Gabe von TNF- $\alpha$  zusammen mit dem Nekroptoseinhibitor Necrostatin 1 (Nec-1) sind, verglichen mit alleiniger TNF- $\alpha$  Gabe, geringere Zahlen TUNEL positiver Zellen in den Kryptentiefen zu beobachten, und der induktive Effekt auf die KC Bildung fällt kleiner aus. Weiterhin zeigen LL Mäuse, bezogen auf LD Tiere und analog zu Per1/2 Tieren, ebenfalls eine verstärkte Wee1 Expression im Darm. Auch der Phosphorylierungsstatus von GSK3 $\beta$  wird durch konstantes Licht beeinflusst und stellt sich ähnlich dar wie in Per1/2 Mäusen, mit einer leichten Reduktion des pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  Verhältnis unter unbehandelten Bedingungen und einer Induktion unter den entzündlichen Bedingungen der TNF- $\alpha$  Gabe. In der Gesamtheit sind extern desynchronisierte Mäuse unter unbehandelten Bedingungen unauffällig, reagieren aber auf Entzündungsreize mit verstärkter mukosaler Nekroptose und erhöhter Suszeptibilität für experimentelle Kolitis (Preuss, Tang et al. 2008). Nekroptotischer Zelltod vor allem in den tiefen Krypten wiederum ist ebenfalls assoziiert mit erhöhter Suszeptibilität für experimentelle Entzündung (Gunther, Martini et al. 2011) sowie humanem CED (Gunther, Martini et al. 2011, Pierdomenico, Negroni et al. 2014).

#### **4.9 Diskussion des Zusammenhanges zwischen Störungen des zirkadianen Rhythmus und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Der Zusammenhang von Schlafstörungen als Ausdruck eines gestörten zirkadianen Rhythmus und CED ist vielfältig dokumentiert. Auch verschiedenste Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes (Nedeltcheva and Scheer 2014), Übergewicht (McFadden, Jones et al. 2014, Parsons, Moffitt et al. 2015) und Krebs (Davis, Mirick et al. 2001, Schernhammer, Laden et al. 2001) werden in Verbindung mit zirkadianer Disruption gebracht. Nicht zuletzt gelten Rhythmusstörungen als Risikofaktoren für gastrointestinale Erkrankungen wie Magengeschwüre (Segawa, Nakazawa et al. 1987) und dem Reizdarmsyndrom (Nojkov, Rubenstein et al. 2010) und CED (Sonnenberg 1990). Vor allem artifizielle Arbeitsumgebungen wie sitzenden Innentätigkeiten aber auch lange und irreguläre Arbeitszeiten wie Schichtarbeit stellen Risikofaktoren für CED dar (Sonnenberg 1990).

Der Assoziation von Schichtarbeit sowohl mit CED als auch anderen Erkrankungen muss jedoch auch kritisch gesehen werden. So stellt sich die Frage, ob die beobachteten negativen Effekte auf die Gesundheit direkt auf einer zirkadianen Disruption basieren, oder vielmehr auf indirekten/verzerrenden Effekten beruhen, die zum Beispiel durch eine Veränderung der Lebensweise (z.B. Ess- und Rauchgewohnheiten, Stress) hervorgerufen werden (Bollinger and Schibler 2014). So wurde in der US-amerikanischen „Nurses‘ Health Study“ über 20 Jahre hinweg die Inzidenz von Lungenkrebs in Krankenschwestern untersucht. Dabei zeigten Frauen in Schichtarbeit ein 28 % erhöhtes Erkrankungsrisiko verglichen mit Frauen ohne Tätigkeit im Schichtdienst. Interessanterweise war die Erhöhung des relativen Erkrankungsrisikos assoziiert mit dem Rauchen und wurde bei Nichtrauchern (mit und ohne jahrelange Schichtarbeit) nicht beobachtet. Vor dem Hintergrund des Rauchens als ätiologischer Faktor bei Lungenkrebs ist es jedoch auch denkbar, dass zirkadiane Disruption infolge von Schichtarbeit das Erkrankungsrisiko zusätzlich erhöht (Schernhammer, Feskanich et al. 2013). In der Tat wirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) durch Zigarettenrauch karzinogen in Mäusen und Menschen (Portal-Nunez, Shankavaram et al. 2012), und in Mäusen wurde eine rhythmische, CLOCK-abhängige Expression und Aktivierung

von AhR beschrieben (Tanimura, Kusunose et al. 2011). Rauchen könnte also zu bestimmten Zeiten ein größerer Risikofaktor sein als zu Anderen.

Auch bei der Entwicklung von Brustkrebs ist die Beteiligung von Schichtarbeit umstritten. So assoziieren einige Studien Schichtarbeit mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko (Megdal, Kroenke et al. 2005, Grundy, Richardson et al. 2013), und eine Metaanalyse von 10 Einzelstudien konnte sogar eine Vergrößerung des Erkrankungsrisikos um 3 % pro 5 Jahre rotierender Schichtarbeit (oder 13 % für 500 Nachschichten) definieren (Wang, Yeung et al. 2013). Dagegen sehen andere epidemiologische Metaanalysen diese Assoziation nicht, begründen das aber mit Studien-übergreifender Heterogenität [Klassifikation von Schichtarbeit, Definition des Risikos, statistische Methodik, Korrektur hinsichtlich Störfaktoren (Ijaz, Verbeek et al. 2013, Kamdar, Tergas et al. 2013)]. Die Debatte, ob zirkadiane Disruption einen Risikofaktor in der Ätiologie von Brustkrebs darstellt oder eher andere Faktoren wie Veränderungen der Lebensumstände oder Stress, die mit Schichtarbeit einhergehen, ist somit nicht abschließend geklärt, und weitere methodisch einwandfreie und einheitliche Studien sind nötig (Ijaz, Verbeek et al. 2013, Papantoniou and Kogevinas 2013, Stevens and Hansen 2013, Stevens, Hansen et al. 2013).

Erzwungene atypische Aktivität (Modell für Schichtarbeit) und der Phasenwechsel des Hell-Dunkel-Zyklus (Modell für Jetlag) erhöhen im Mausmodell die Entzündungsaktivität einer experimentellen Kolitis (Preuss, Tang et al. 2008, Tang, Preuss et al. 2009), und wiederholte Phasenwechsel (Modell für chronischen Jetlag) führen sogar zu erhöhten Sterblichkeitsraten von alten Mäusen verglichen mit alten Mäusen unter normalen Lichtbedingungen (Davidson, Sellix et al. 2006). Aber auch hier ist die exakte Ursache (zirkadiane Disruption oder Störfaktoren, molekularer Zusammenhang) unklar. Selbst im Falle einer zugrundeliegenden zirkadianen Disruption wurde in diesen Studien nicht der Umfang derselben (zentraler Schrittmacher, periphere Organe) spezifiziert. Erste Hinweise, dass Jetlag in Mäusen tatsächlich auch periphere Gewebe beeinflusst, zeigt die Verringerung der Expressionsstärke sowie die Verschiebung der Rhythmen der Uhrgene *Rev-erb $\alpha$* , *Per2* und *Bmal1* nach wiederholten Phasenwechseln des Hell-Dunkel-Zyklus in der Leber (Filipski, Innominato et al. 2005).

In der Gesamtheit existieren genug Literaturevidenzen, um einen Beitrag von zirkadianen Störungen an der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen zu postulieren. Somit besteht im Interesse eines umfassenden Krankheitsverständnisses auch die Notwendigkeit, die molekularen Zusammenhänge zu erforschen. In dieser Arbeit wird zudem das Problem der epidemiologischen Störgrößen (z.B. Lebensgewohnheiten und Ernährung) umgangen, da die zirkadiane Disruption der Per1/2 Mäuse genetisch determiniert ist und sowohl im zentralen Schrittmacher als auch jedem peripheren Organ/jeder peripheren molekularen Uhr vorliegt und diese Mäuse zusammen mit WT Kontrollen unter kontrollierten, für alle Mäuse gleichen Bedingungen gehalten werden.

#### **4.10 Weitere Einflussfaktoren zur Determination der Kolitis Suszeptibilität neben intestinalen Epithelzellen**

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Epithelzellen und den postulierten Störungen und daraus resultierenden Effekten hinsichtlich Darmentzündung, die zirkadiane Disruption in diesen hervorruft. Nichtsdestotrotz sind auch Beiträge anderer angeborener oder adaptiver Prozesse an der Kolitissuszeptibilität von *Per1/2* Mäusen möglich. So konnte die Beteiligung des adaptiven Immunsystems über zirkadian regulierte Differenzierung von Immunzellen gezeigt werden. Knockout Mäuse für das Uhrgen *Rev-erba* zeigen veränderte diurnale Variationen in der Th17 Zellpopulation. Werden diese Mäuse Licht-abhängig desynchronisiert, führt das zu vermehrten intestinalen Th17 Zellen und einer erhöhten Suszeptibilität für experimentelle Colitis (Yu, Rollins et al. 2013). Vor dem Hintergrund des zirkadianen Einflusses auf Immunzellpopulationen ist eine weitere Studie interessant die zeigt, dass von aktivierten T- (*in vivo*) oder NKT- (*in vitro*) Zellen produziertes IFN- $\gamma$  die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden und Mukus aus Paneth und Becherzellen induziert (Farin, Karthaus et al. 2014). Ein weiterer Beleg für einen zirkadianen Einfluss auf das Immunsystem stammt aus einem TLR9 (*toll like receptor 9*)-abhängigen Sepsismodell der Maus. TLR9 mRNA und Protein Level unterliegen zirkadianen Oszillationen in Immunzellen (Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen), und die Erkrankungsschwere ist abhängig vom Zeitpunkt der Sepsis Induktion (Silver, Arjona et al. 2012). Auch auf IEZ ist der TLR9 zirkadian organisiert (Mukherji, Kobiita et al. 2013). Das Erkennen von kommensalen Bakterien durch epitheliale TLR ist entscheidend für die Homeostase des Darmes und beeinflusst diverse physiologische Prozesse wie Nährstoffresorption, Barrierefunktion, Angiogenese und Verhalten (Hooper, Wong et al. 2001, Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004, Cryan and Dinan 2012). Dabei werden die arrhythmischen Mikrobiotasingnale durch die oszillierende Expression von TLR9 rhythmisch in die zirkadianen zellulären Prozesse eingegliedert. Störungen dieses Mikrobiota-IEZ-Dialogs können durch epitheliale Überproduktion von Cortikosterone zu einem prädiabetischen Syndrom mit Hyperglykämie und Insulinresistenz führen (Mukherji, Kobiita et al. 2013). Für die intestinale Mikrobiota von Menschen und Mäusen wurde bereits gezeigt, dass sie zirkadiane Rhythmen aufweist, die unter anderem



abhängig von der Nahrungsaufnahme sind. Störungen der molekularen Uhr, wie sie beim Jetlag auftreten oder bei *Per1/2* Mäusen durch eine genetisch determinierte zirkadiane Disruption, führen zu einem Verlust dieser Oszillationen sowie zu einer abnormen Komposition des Mikrobioms. Als Konsequenz resultieren metabolische Beeinträchtigungen wie Glukoseintoleranz und Adipositas. Dieser Phänotyp ist durch Stuhltransplantation auf Keim-freie Mäuse übertragbar, so dass auch die mikrobielle Zusammensetzung einen wichtigen Beitrag zur Homeostase des Darmes leistet (Thaiss, Zeevi et al. 2014). Die Gesamtheit aller möglichen Einflussfaktoren kann in ihrer Komplexität im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht beleuchtet werden.

#### **4.11 Ausblick**

Das Fazit dieser Studie ist die Untermauerung der enormen Bedeutung von zirkadianen Rhythmen für die Gesundheit. Das Leben auf der Erde ist durch die Entwicklung von biologischen Uhren an die wechselnden Hell-Dunkel Bedingungen infolge der Erdrotation angepasst. Die innere Uhr dient der Antizipation der äußeren Bedingungen, z.B. durch Rückkopplung mit dem Zeitgeber Licht, und in Kombination wird dadurch eine Vielzahl von physiologischen Prozessen gesteuert. Die Änderungen in der Lebensweise, die zur modernen Gesellschaft quasi dazugehören, wie Schicht- und Nachtarbeit, die Überquerung von Zeitzonen oder nächtliche gesellschaftliche Aktivitäten, aber auch nächtliche Beleuchtung, resultieren in Störungen der zirkadianen Zeitgebung und sind so an verschiedensten Erkrankungen beteiligt. Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge von zirkadianen Rhythmen mit der Körperphysiologie sowie von zirkadianer Disruption mit den Krankheiten könnte somit Ansatzpunkte für entsprechende Präventionsmaßnahmen oder Therapieansätze liefern. Denkbar dabei ist einerseits, über die Wiederherstellung/Stabilisierung des zirkadianen Rhythmus (Planung des Tagesablaufs hinsichtlich sportlicher Betätigung, Essens- und Schlafenszeiten, Lichttherapie) Krankheiten direkt zu beeinflussen, als auch über die Anpassung der Behandlungszeiten die Wirksamkeit von Medikamenten zu verbessern oder deren Nebenwirkungen zu verringern (Husse, Leliavski et al. 2013).

Vorteilhafte Effekte von Chronotherapien konnten schon mehrfach demonstriert werden. So ist eine niedrig dosierte Glucocorticoid (Prednisolon) Therapie mit spezieller Formulierung, die abends eingenommen wird und nachts den höchsten Wirkspiegel entfaltet, ohne den Schlaf zu unterbrechen, wirksamer als morgens eingenommenes, unmittelbar wirksames Prednisolon (Buttgereit, Mehta et al. 2013, Henness and Yang 2013). Auch bei der Therapie von Krebs zeigen chronobiologisch abgestimmte Therapien Erfolge. So verbessert sich beim kolorektalen Karzinom das Überleben von Männern mit chronobiologisch optimierten Infusionen von 5-Fluoruracil, Leucovorin oder Oxaliplatin verglichen mit konventionell durchgeführten Infusionen signifikant (Giacchetti, Dugue et al. 2012). Auch Bluthochdruck als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen lässt sich chronobiologisch (Medikation zum Schlafengehen versus nach dem Aufstehen)

besser therapieren. Entsprechend behandelte Patienten zeigen unmittelbar eine stärker und länger anhaltende Blutdrucksenkung sowie langfristig (Jahre) ein reduziertes Risiko von kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt und ischämischer oder hämorrhagischer Schlaganfall und dadurch eine geringere Sterblichkeit (Hermida, Ayala et al. 2010). Chronotherapeutische Ansätze könnten also auch die Behandlung von CED verbessern.

Die Ermittlung des individuellen Chronotyps, z.B. über Erfassung der Aktivitäts- und Ruhephasen, der Schlafzeiten (Mittelpunkt des Schlafes, *midpoint of sleep*), der Körpertemperatur oder Hormonlevel (Melatonin), ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Chronotherapie. Denn die unter anderem genetisch determinierten inneren Rhythmen sind von Mensch zu Mensch verschieden und verändern sich sogar mit dem Alter (Bollinger and Schibler 2014). Möglicherweise gibt es bald weitere sichere Marker zur Bestimmung des zirkadianen Phänotyps, und die Bestimmung desselben sollte grundsätzlich in jede Anamnese sowie die krankheitsspezifische Therapie einfließen.

## 5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind bis heute nicht heilbar. Sie stellen mit ihrem langfristigen Verlauf auf Patientenseite eine große Einschränkung der Lebensqualität und auf Seite des Gesundheitssystems einen großen Kostenfaktor dar. Die Pathogenese von CED ist komplex und bei weitem nicht vollständig verstanden. Sicher ist jedoch, dass neben einer genetischen Prädisposition auch Umweltfaktoren dazu beitragen, die Integrität der Darmbarriere zu beeinträchtigen und chronische Entzündungsprozesse auszulösen. Störungen des zirkadianen Rhythmus werden seit einigen Jahren als Risikofaktor für CED diskutiert. Dabei handelt es sich um einen periodisch wiederholenden Rhythmus mit einer Schwingungsdauer von 24 Stunden infolge des Hell-Dunkel-Zyklus der Erde, der es Organismen ermöglicht, ihre Körperfunktionen wie Blutdruck, Herzfrequenz oder Körpertemperatur an wiederkehrende Phänomene anzupassen.

Die Hypothese, dass ein gestörter zirkadianer Rhythmus die Balance der Gewebserneuerung aus Zellteilung und Zelltod unter Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Darmepithels beeinträchtigt und somit einen Risikofaktor für Darmentzündung darstellt, soll im Mausmodell untersucht werden. Der Knockout der Uhrgene *Per1* und *Per2* in jeder Zelle von sogenannten *Per1/2* Mäusen führt dabei zu einer dauerhaften und ausgeprägten Störung der molekularen Uhr auf zellulärer Ebene sowie des kompletten zirkadianen Rhythmus auf Ebene des Organismus. Diese Mäuse zeigen im Vergleich mit Wildtyptieren reduzierte Zahlen an sekretorischen Paneth und Becherzellen im Dün- und Dickdarm. Weiterhin ist im Darmepithel die Expression des Zellzyklusregulators *Wee1* erhöht, und einhergehend damit lassen sich reduzierte Teilungsraten von intestinalen Epithelzellen in *Per1/2* Mäusen beobachten. Auch Zeichen eines deregulierten Zelltods von intestinalen Epithelzellen sind vorhanden. So wird das anti-apoptotische Protein *clAP2* im Darmepithel von *Per1/2* Mäusen verstärkt exprimiert, und korrespondierend damit zeigen diese Tiere erhöhte Proteinlevel des Nekroptosemarkers *RIP3*. Wird in *Per1/2* Mäusen eine experimentelle Darmentzündung induziert, zeigen diese Tiere im Vergleich mit Wildtypmäusen einen systemisch (höhere KC- und IL-1 $\beta$  Level im Serum) und lokal (höhere Entzündungsscores in Makroskopie und Mikroskopie) stärker ausgeprägten

Phänotyp einer intestinalen Entzündung sowie eine um 60 % erhöhte Sterblichkeit, ein Befund der bisher einzigartig ist.

Zusätzlich zu dem genetisch determinierten Mausmodell (Per1/2) für zirkadiane Disruption wurde auch ein exogen determiniertes Mausmodell genutzt. Dabei führt die Exposition von Wildtypmäusen gegenüber konstantem Licht zu einer Störung des zirkadianen Rhythmus bei intakter molekularer Uhr. Solcherart behandelte Mäuse zeigen, verglichen mit Kontrollmäusen unter einem regulären 12 h Hell-Dunkel-Zyklus, bei einer experimentellen Entzündung mittels systemischer TNF $\alpha$  Gabe ähnliche Effekte wie auch Per1/2 Mäuse: vermehrter Zelltod von intestinalen Epithelzellen (höhere Zahlen TUNEL-positiver Zellen) zusammen mit einem erhöhten Proteinlevel des Nekroptosemarkers RIP3 sowie höhere systemische Entzündungszeichen (höhere KC Level im Serum). Interessanterweise ließ sich die Erhöhung der Zelltodereignisse im Darmepithel durch gleichzeitige Gabe des Nekroptoseinhibitors Necrostatin-1 signifikant reduzieren.

Zusammengefasst ist zu erkennen, dass ein stabiler zirkadianer Rhythmus wichtig für die Homeostase des Darmepithels hinsichtlich der Balance von Zellteilung und Zelltod ist. Störungen des zirkadianen Rhythmus, sowohl endogen als auch exogen bedingt, führen zu vermehrten intestinalen Nekroptoseereignissen und erhöhen somit die Anfälligkeit für und Ausprägung von intestinalen Entzündungen.

## 6 Literaturverzeichnis

Adolph, T. E., M. F. Tomczak, L. Niederreiter, H. J. Ko, J. Bock, E. Martinez-Naves, J. N. Glickman, M. Tschurtschenthaler, J. Hartwig, S. Hosomi, M. B. Flak, J. L. Cusick, K. Kohno, T. Iwawaki, S. Billmann-Born, T. Raine, R. Bharti, R. Lucius, M. N. Kweon, S. J. Marciniak, A. Choi, S. J. Hagen, S. Schreiber, P. Rosenstiel, A. Kaser and R. S. Blumberg (2013). "Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation." Nature **503**(7475): 272-276.

Akhtar, R. A., A. B. Reddy, E. S. Maywood, J. D. Clayton, V. M. King, A. G. Smith, T. W. Gant, M. H. Hastings and C. P. Kyriacou (2002). "Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus." Curr Biol **12**(7): 540-550.

An, G., B. Wei, B. Xia, J. M. McDaniel, T. Ju, R. D. Cummings, J. Braun and L. Xia (2007). "Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans." J Exp Med **204**(6): 1417-1429.

Andreu, P., S. Colnot, C. Godard, S. Gad, P. Chafey, M. Niwa-Kawakita, P. Laurent-Puig, A. Kahn, S. Robine, C. Perret and B. Romagnolo (2005). "Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine." Development **132**(6): 1443-1451.

Archer, S. N., D. L. Robilliard, D. J. Skene, M. Smits, A. Williams, J. Arendt and M. von Schantz (2003). "A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference." Sleep **26**(4): 413-415.

Bae, K., X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings, S. M. Reppert and D. R. Weaver (2001). "Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock." Neuron **30**(2): 525-536.

Barkla, D. H. and P. R. Gibson (1999). "The fate of epithelial cells in the human large intestine." Pathology **31**(3): 230-238.

Battey, J., E. Jordan, D. Cox and W. Dove (1999). "An action plan for mouse genomics." Nat Genet **21**(1): 73-75.

Baumgart, D. C. (2009). "The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis." Dtsch Arztebl Int **106**(8): 123-133.

Becker, C., M. C. Fantini and M. F. Neurath (2006). "High resolution colonoscopy in live mice." Nat Protoc **1**(6): 2900-2904.

Bell-Pedersen, D., V. M. Cassone, D. J. Earnest, S. S. Golden, P. E. Hardin, T. L. Thomas and M. J. Zoran (2005). "Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms." Nat Rev Genet **6**(7): 544-556.

Berg, D. F., A. M. Bahadursingh, D. L. Kaminski and W. E. Longo (2002). "Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease." Am J Surg **184**(1): 45-51.

Bhatnagar, B. N., C. L. Sharma, S. N. Gupta, M. M. Mathur and D. C. Reddy (2004). "Study on the anatomical dimensions of the human sigmoid colon." Clin Anat **17**(3): 236-243.

Boirivant, M., I. J. Fuss, A. Chu and W. Strober (1998). "Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4." J Exp Med **188**(10): 1929-1939.

Bollinger, T. and U. Schibler (2014). "Circadian rhythms - from genes to physiology and disease." Swiss Med Wkly **144**: w13984.

Buchi, K. N., J. G. Moore, W. J. Hrushesky, R. B. Sothorn and N. H. Rubin (1991). "Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa." Gastroenterology **101**(2): 410-415.

Bunger, M. K., L. D. Wilsbacher, S. M. Moran, C. Clendenin, L. A. Radcliffe, J. B. Hogenesch, M. C. Simon, J. S. Takahashi and C. A. Bradfield (2000). "Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals." Cell **103**(7): 1009-1017.

Burger, D. and S. Travis (2011). "Conventional medical management of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **140**(6): 1827-1837 e1822.

Buttgereit, F., D. Mehta, J. Kirwan, J. Szechinski, M. Boers, R. E. Alten, J. Supronik, I. Szombati, U. Romer, S. Witte and K. G. Saag (2013). "Low-dose prednisone chronotherapy for rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial (CAPRA-2)." Ann Rheum Dis **72**(2): 204-210.

Camilleri, M., K. Madsen, R. Spiller, B. Greenwood-Van Meerveld and G. N. Verne (2012). "Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease." Neurogastroenterol Motil **24**(6): 503-512.

Cao, S. S., M. Wang, J. C. Harrington, B. M. Chuang, L. Eckmann and R. J. Kaufman (2014). "Phosphorylation of eIF2alpha is dispensable for differentiation but required at a posttranscriptional level for paneth cell function and intestinal homeostasis in mice." Inflamm Bowel Dis **20**(4): 712-722.

Cardone, L., J. Hirayama, F. Giordano, T. Tamaru, J. J. Palvimo and P. Sassone-Corsi (2005). "Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1." Science **309**(5739): 1390-1394.

Cario, E., G. Gerken and D. K. Podolsky (2004). "Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C." Gastroenterology **127**(1): 224-238.

Cermakian, N. and D. B. Boivin (2003). "A molecular perspective of human circadian rhythm disorders." Brain Res Brain Res Rev **42**(3): 204-220.

Challet, E., I. Caldelas, C. Graff and P. Pevet (2003). "Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals." Biol Chem **384**(5): 711-719.

Chassaing, B., J. D. Aitken, M. Malleshappa and M. Vijay-Kumar (2014). "Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice." Curr Protoc Immunol **104**: Unit 15 25.

Cooper, H. S., S. N. Murthy, R. S. Shah and D. J. Sedergran (1993). "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." Lab Invest **69**(2): 238-249.

Crosnier, C., D. Stamataki and J. Lewis (2006). "Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control." Nat Rev Genet **7**(5): 349-359.

Cryan, J. F. and T. G. Dinan (2012). "Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour." Nat Rev Neurosci **13**(10): 701-712.

Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela and U. Schibler (2000). "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus." Genes Dev **14**(23): 2950-2961.

Davidson, A. J., M. T. Sellix, J. Daniel, S. Yamazaki, M. Menaker and G. D. Block (2006). "Chronic jet-lag increases mortality in aged mice." Curr Biol **16**(21): R914-916.

Davis, S., D. K. Mirick and R. G. Stevens (2001). "Night shift work, light at night, and risk of breast cancer." J Natl Cancer Inst **93**(20): 1557-1562.

De Robertis, M., E. Massi, M. L. Poeta, S. Carotti, S. Morini, L. Cecchetelli, E. Signori and V. M. Fazio (2011). "The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies." J Carcinog **10**: 9.

Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, K. W. Beagley, R. P. Bucy and C. O. Elson (1994). "Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice." Gastroenterology **107**(6): 1643-1652.

Dignass, A., J. C. Preiss, D. E. Aust, F. Autschbach, A. Ballauff, G. Barretton, B. Bokemeyer, S. Fichtner-Feigl, S. Hagel, K. R. Herrlinger, G. Jantschek, A. Kroesen, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, M. Reinshagen, G. Rogler, D. Schleiermacher, C. Schmidt, S. Schreiber, H. Schulze, E. Stange, M. Zeitz, J. C. Hoffmann and A. Stallmach (2011). "[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]." Z Gastroenterol **49**(9): 1276-1341.

Duffield, G. E., J. D. Best, B. H. Meurers, A. Bittner, J. J. Loros and J. C. Dunlap (2002). "Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells." Curr Biol **12**(7): 551-557.



Ebisawa, T. (2007). "Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: human sleep disorders and clock genes." J Pharmacol Sci **103**(2): 150-154.

Ebisawa, T., M. Uchiyama, N. Kajimura, K. Mishima, Y. Kamei, M. Katoh, T. Watanabe, M. Sekimoto, K. Shibui, K. Kim, Y. Kudo, Y. Ozeki, M. Sugishita, R. Toyoshima, Y. Inoue, N. Yamada, T. Nagase, N. Ozaki, O. Ohara, N. Ishida, M. Okawa, K. Takahashi and T. Yamauchi (2001). "Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome." EMBO Rep **2**(4): 342-346.

Eguchi, Y., S. Shimizu and Y. Tsujimoto (1997). "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis." Cancer Res **57**(10): 1835-1840.

Fanucci, A., P. Cerro and E. Fanucci (1988). "Normal small-bowel measurements by enteroclysis." Scand J Gastroenterol **23**(5): 574-576.

Farin, H. F., W. R. Karthaus, P. Kujala, M. Rakhshandehroo, G. Schwank, R. G. Vries, E. Kalkhoven, E. E. Nieuwenhuis and H. Clevers (2014). "Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma." J Exp Med **211**(7): 1393-1405.

Filipski, E., P. F. Innominato, M. Wu, X. M. Li, S. Iacobelli, L. J. Xian and F. Levi (2005). "Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice." J Natl Cancer Inst **97**(7): 507-517.

Filipski, E., V. M. King, X. Li, T. G. Granda, M. C. Mormont, X. Liu, B. Claustrat, M. H. Hastings and F. Levi (2002). "Host circadian clock as a control point in tumor progression." J Natl Cancer Inst **94**(9): 690-697.

Firsov, D., N. Tokonami and O. Bonny (2012). "Role of the renal circadian timing system in maintaining water and electrolytes homeostasis." Mol Cell Endocrinol **349**(1): 51-55.

Fischer, A. H., K. A. Jacobson, J. Rose and R. Zeller (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections." CSH Protoc **2008**: pdb prot4986.

Froy, O., N. Chapnik and R. Miskin (2005). "Mouse intestinal cryptidins exhibit circadian oscillation." FASEB J **19**(13): 1920-1922.

Gallego, M. and D. M. Virshup (2007). "Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 139-148.

Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-1408.

Gerber, A., C. Esnault, G. Aubert, R. Treisman, F. Pralong and U. Schibler (2013). "Blood-borne circadian signal stimulates daily oscillations in actin dynamics and SRF activity." Cell **152**(3): 492-503.

Gersemann, M., S. Becker, I. Kubler, M. Koslowski, G. Wang, K. R. Herrlinger, J. Griger, P. Fritz, K. Fellermann, M. Schwab, J. Wehkamp and E. F. Stange (2009). "Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis." Differentiation **77**(1): 84-94.

Gersemann, M., E. F. Stange and J. Wehkamp (2011). "From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **17**(27): 3198-3203.

Giacchetti, S., P. A. Dugue, P. F. Innominato, G. A. Bjarnason, C. Focan, C. Garufi, S. Tumolo, B. Coudert, S. Iacobelli, R. Smaaland, M. Tampellini, R. Adam, T. Moreau, F. Levi and A. I. C. Group (2012). "Sex moderates circadian chemotherapy effects on survival of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis." Ann Oncol **23**(12): 3110-3116.

Gratzner, H. G. (1982). "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." Science **218**(4571): 474-475.

Graziadei, P. P. and G. A. Graziadei (1979). "Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons." J Neurocytol **8**(1): 1-18.

Griffiths, G. (1993). Fine Structure Immunocytochemistry, Springer.

Grima, B., E. Chelot, R. Xia and F. Rouyer (2004). "Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the Drosophila brain." Nature **431**(7010): 869-873.

Groos, S., G. Hunefeld and L. Luciano (1996). "Parenteral versus enteral nutrition: morphological changes in human adult intestinal mucosa." J Submicrosc Cytol Pathol **28**(1): 61-74.

Grossmann, J., K. Walther, M. Artinger, P. Rummele, M. Woenckhaus and J. Scholmerich (2002). "Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells." Am J Gastroenterol **97**(6): 1421-1428.

Grundschober, C., F. Delaunay, A. Puhlhofer, G. Triqueneaux, V. Laudet, T. Bartfai and P. Nef (2001). "Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts." J Biol Chem **276**(50): 46751-46758.

Grundy, A., H. Richardson, I. Burstyn, C. Lohrlich, S. K. SenGupta, A. S. Lai, D. Lee, J. J. Spinelli and K. J. Aronson (2013). "Increased risk of breast cancer associated with long-term shift work in Canada." Occup Environ Med **70**(12): 831-838.

Gu, X., L. Xing, G. Shi, Z. Liu, X. Wang, Z. Qu, X. Wu, Z. Dong, X. Gao, G. Liu, L. Yang and Y. Xu (2012). "The circadian mutation PER2(S662G) is linked to cell cycle progression and tumorigenesis." Cell Death Differ **19**(3): 397-405.

Gunther, C., E. Martini, N. Wittkopf, K. Amann, B. Weigmann, H. Neumann, M. J. Waldner, S. M. Hedrick, S. Tenzer, M. F. Neurath and C. Becker (2011). "Caspase-8

regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis." Nature **477**(7364): 335-339.

Gunther, C., H. Neumann, M. F. Neurath and C. Becker (2013). "Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium." Gut **62**(7): 1062-1071.

Hardin, P. E. (2004). "Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond." J Biol Rhythms **19**(5): 348-360.

Harmar, A. J. (2003). "An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei." J Neuroendocrinol **15**(4): 335-338.

Hayden, M. S., A. P. West and S. Ghosh (2006). "NF-kappaB and the immune response." Oncogene **25**(51): 6758-6780.

Heazlewood, C. K., M. C. Cook, R. Eri, G. R. Price, S. B. Tauro, D. Taupin, D. J. Thornton, C. W. Png, T. L. Crockford, R. J. Cornall, R. Adams, M. Kato, K. A. Nelms, N. A. Hong, T. H. Florin, C. C. Goodnow and M. A. McGuckin (2008). "Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis." PLoS Med **5**(3): e54.

Helander, H. F. and L. Fandriks (2014). "Surface area of the digestive tract - revisited." Scand J Gastroenterol **49**(6): 681-689.

Hennes, S. and L. P. Yang (2013). "Modified-release prednisone: in patients with rheumatoid arthritis." Drugs **73**(18): 2067-2076.

Hermida, R. C., D. E. Ayala, A. Mojon and J. R. Fernandez (2010). "Influence of circadian time of hypertension treatment on cardiovascular risk: results of the MAPEC study." Chronobiol Int **27**(8): 1629-1651.

Hoffmann, J. C., J. C. Preiss, F. Autschbach, H. J. Buhr, W. Hauser, K. Herrlinger, W. Hohne, S. Koletzko, C. F. Kriegelstein, W. Kruis, H. Matthes, G. Moser, M. Reinshagen, G. Rogler, S. Schreiber, A. G. Schreyer, B. Sido, B. Siegmund, A. Stallmach, B. Bokemeyer, E. F. Stange and M. Zeitz (2008). "[Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]." Z Gastroenterol **46**(9): 1094-1146.

Holzapfel, B. W., L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). In: Biologie in unserer Zeit, Wiley.

Hoogerwerf, W. A. (2010). "Role of clock genes in gastrointestinal motility." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **299**(3): G549-555.

Hoogerwerf, W. A., V. B. Shahinian, G. Cornelissen, F. Halberg, J. Bostwick, J. Timm, P. A. Bartell and V. M. Cassone (2010). "Rhythmic changes in colonic motility are regulated by period genes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298**(2): G143-150.

Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk and J. I. Gordon (2001). "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine." Science **291**(5505): 881-884.

Hu, M. L., K. T. Yeh, P. M. Lin, C. M. Hsu, H. H. Hsiao, Y. C. Liu, H. Y. Lin, S. F. Lin and M. Y. Yang (2014). "Deregulated expression of circadian clock genes in gastric cancer." BMC Gastroenterol **14**: 67.

Hughes, M. E., L. DiTacchio, K. R. Hayes, C. Vollmers, S. Pulivarthy, J. E. Baggs, S. Panda and J. B. Hogenesch (2009). "Harmonics of circadian gene transcription in mammals." PLoS Genet **5**(4): e1000442.

Husse, J., A. Leliavski and H. Oster (2013). "[Biological role and clinical relevance of central and peripheral circadian clocks]." Dtsch Med Wochenschr **138**(10): 493-496.

Ijaz, S., J. Verbeek, A. Seidler, M. L. Lindbohm, A. Ojajarvi, N. Orsini, G. Costa and K. Neuvonen (2013). "Night-shift work and breast cancer--a systematic review and meta-analysis." Scand J Work Environ Health **39**(5): 431-447.

Ijaz, S., J. Verbeek, A. Seidler, M. L. Lindbohm, A. Ojajarvi, N. Orsini, G. Costa and K. Neuvonen (2013). "Response to letter to the editor, re: Ijaz S, et al. "Night-shift work and breast cancer--a systematic review and meta-analysis"." Scand J Work Environ Health **39**(6): 633-634.

Itzkowitz, S. H., D. H. Present, Crohn's and I. B. D. S. G. Colitis Foundation of America Colon Cancer in (2005). "Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **11**(3): 314-321.

Johansson, M. E., M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm and G. C. Hansson (2008). "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15064-15069.

Johnson, C. H. (2004). "Precise circadian clocks in prokaryotic cyanobacteria." Curr Issues Mol Biol **6**(2): 103-110.

Johnson, R. F., R. Y. Moore and L. P. Morin (1988). "Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract." Brain Res **460**(2): 297-313.

Jones-Hall, Y. L., A. Kozik and C. Nakatsu (2015). "Ablation of tumor necrosis factor is associated with decreased inflammation and alterations of the microbiota in a mouse model of inflammatory bowel disease." PLoS One **10**(3): e0119441.

Jud, C., I. Schmutz, G. Hampp, H. Oster and U. Albrecht (2005). "A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions." Biol Proced Online **7**: 101-116.

Kamdar, B. B., A. I. Tergas, F. J. Mateen, N. H. Bhayani and J. Oh (2013). "Night-shift work and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis." Breast Cancer Res Treat **138**(1): 291-301.

Kararli, T. T. (1995). "Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals." Biopharm Drug Dispos **16**(5): 351-380.

Karpowicz, P., Y. Zhang, J. B. Hogenesch, P. Emery and N. Perrimon (2013). "The circadian clock gates the intestinal stem cell regenerative state." Cell Rep **3**(4): 996-1004.

Katz, J. P., N. Perreault, B. G. Goldstein, C. S. Lee, P. A. Labosky, V. W. Yang and K. H. Kaestner (2002). "The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon." Development **129**(11): 2619-2628.

Kawada, M., A. Arihiro and E. Mizoguchi (2007). "Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **13**(42): 5581-5593.

Kerr, T. A., M. A. Ciorba, H. Matsumoto, V. R. Davis, J. Luo, S. Kennedy, Y. Xie, A. Shaker, B. K. Dieckgraefe and N. O. Davidson (2012). "Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: a poly-A purification solution." Inflamm Bowel Dis **18**(2): 344-348.

Khor, B., A. Gardet and R. J. Xavier (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **474**(7351): 307-317.

Kim, Y. S. and S. B. Ho (2010). "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress." Curr Gastroenterol Rep **12**(5): 319-330.

Kita, Y., M. Shiozawa, W. Jin, R. R. Majewski, J. C. Besharse, A. S. Greene and H. J. Jacob (2002). "Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies." Pharmacogenetics **12**(1): 55-65.

Knutsson, A., J. Hallquist, C. Reuterwall, T. Theorell and T. Akerstedt (1999). "Shiftwork and myocardial infarction: a case-control study." Occup Environ Med **56**(1): 46-50.

Kondo, T. and M. Ishiura (2000). "The circadian clock of cyanobacteria." Bioessays **22**(1): 10-15.

Kontoyiannis, D., M. Pasparakis, T. T. Pizarro, F. Cominelli and G. Kollias (1999). "Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies." Immunity **10**(3): 387-398.

Korinek, V., N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P. J. Peters and H. Clevers (1998). "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4." Nat Genet **19**(4): 379-383.

Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-1787.

Kornmann, B., N. Preitner, D. Rifat, F. Fleury-Olela and U. Schibler (2001). "Analysis of circadian liver gene expression by ADDER, a highly sensitive method for the display of differentially expressed mRNAs." Nucleic Acids Res **29**(11): E51-51.

Krishnan, B., S. E. Dryer and P. E. Hardin (1999). "Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*." Nature **400**(6742): 375-378.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschoop, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kudryashova, E., R. Quintyn, S. Seveau, W. Lu, V. H. Wysocki and D. S. Kudryashov (2014). "Human defensins facilitate local unfolding of thermodynamically unstable regions of bacterial protein toxins." Immunity **41**(5): 709-721.

Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky and W. Muller (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.

Kyoko, O. O., H. Kono, K. Ishimaru, K. Miyake, T. Kubota, H. Ogawa, K. Okumura, S. Shibata and A. Nakao (2014). "Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis." PLoS One **9**(5): e98016.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lang, G. (2006). Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, Springer.

Langford, D. J., A. L. Bailey, M. L. Chanda, S. E. Clarke, T. E. Drummond, S. Echols, S. Glick, J. Ingrao, T. Klassen-Ross, M. L. Lacroix-Fralish, L. Matsumiya, R. E. Sorge, S. G. Sotocinal, J. M. Tabaka, D. Wong, A. M. van den Maagdenberg, M. D. Ferrari, K. D. Craig and J. S. Mogil (2010). "Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse." Nat Methods **7**(6): 447-449.

Laroui, H., S. A. Ingersoll, H. C. Liu, M. T. Baker, S. Ayyadurai, M. A. Charania, F. Laroui, Y. Yan, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2012). "Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon." PLoS One **7**(3): e32084.

Larson, D. W. and J. H. Pemberton (2004). "Current concepts and controversies in surgery for IBD." Gastroenterology **126**(6): 1611-1619.

Laukoetter, M. G., P. Nava and A. Nusrat (2008). "Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(3): 401-407.

- Le Minh, N., F. Damiola, F. Tronche, G. Schutz and U. Schibler (2001). "Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators." EMBO J **20**(24): 7128-7136.
- Lee, J., Y. Lee, M. J. Lee, E. Park, S. H. Kang, C. H. Chung, K. H. Lee and K. Kim (2008). "Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex." Mol Cell Biol **28**(19): 6056-6065.
- Lee, T. W. and R. N. Fedorak (2010). "Tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibodies in the treatment of inflammatory bowel disease: clinical practice pharmacology." Gastroenterol Clin North Am **39**(3): 543-557.
- Lev, R. and S. S. Spicer (1964). "Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low Ph." J Histochem Cytochem **12**: 309.
- Li, J., C. Huang, Y. Lan and Y. Wang (2015). "A cross-sectional study on the relationships among the polymorphism of period2 gene, work stress, and insomnia." Sleep Breath **19**(4): 1399-1406.
- Li, J., T. McQuade, A. B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y. S. Hsiao, E. Damko, D. Moquin, T. Walz, A. McDermott, F. K. Chan and H. Wu (2012). "The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis." Cell **150**(2): 339-350.
- Li, J. D., W. P. Hu and Q. Y. Zhou (2012). "The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei." Prog Brain Res **199**: 119-127.
- Liu, D., C. Li, Y. Chen, C. Burnett, X. Y. Liu, S. Downs, R. D. Collins and J. Hawiger (2004). "Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide." J Biol Chem **279**(46): 48434-48442.
- Lo Sasso, G., D. Ryu, L. Mouchiroud, S. C. Fernando, C. L. Anderson, E. Katsyuba, A. Piersigilli, M. O. Hottiger, K. Schoonjans and J. Auwerx (2014). "Loss of Sirt1 function improves intestinal anti-bacterial defense and protects from colitis-induced colorectal cancer." PLoS One **9**(7): e102495.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Los, M., M. Mozoluk, D. Ferrari, A. Stepczynska, C. Stroh, A. Renz, Z. Herceg, Z. Q. Wang and K. Schulze-Osthoff (2002). "Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling." Mol Biol Cell **13**(3): 978-988.
- Macdonald, T. T. and G. Monteleone (2005). "Immunity, inflammation, and allergy in the gut." Science **307**(5717): 1920-1925.

Mahler, M., I. J. Bristol, E. H. Leiter, A. E. Workman, E. H. Birkenmeier, C. O. Elson and J. P. Sundberg (1998). "Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis." Am J Physiol **274**(3): G544-551.

Markiewicz, A. (1992). "Chronobiological aspects of jejunum function in humans." Chronobiol Int **9**(6): 453-461.

Marra, G., M. Anti, A. Percesepe, F. Armelao, R. Ficarelli, C. Coco, A. Rinelli, F. M. Vecchio and E. D'Arcangelo (1994). "Circadian variations of epithelial cell proliferation in human rectal crypts." Gastroenterology **106**(4): 982-987.

Matsumoto, S., Y. Okabe, H. Setoyama, K. Takayama, J. Ohtsuka, H. Funahashi, A. Imaoka, Y. Okada and Y. Umesaki (1998). "Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain." Gut **43**(1): 71-78.

Matsunaga, N., Y. Kohno, K. Kakimoto, A. Hayashi, S. Koyanagi and S. Ohdo (2011). "Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes." Toxicology **280**(3): 144-151.

Mazzocchi, G., O. Palmieri, G. Corritore, T. Latiano, F. Bossa, D. Scimeca, G. Biscaglia, M. R. Valvano, R. D'Inca, S. Cucchiara, L. Stronati, V. Annese, A. Andriulli and A. Latiano (2012). "Association study of a polymorphism in clock gene PERIOD3 and risk of inflammatory bowel disease." Chronobiol Int **29**(8): 994-1003.

Mc, M. J. (1946). "Histological demonstration of mucin after periodic acid." Nature **158**: 202.

McAuley, J. L., S. K. Linden, C. W. Png, R. M. King, H. L. Pennington, S. J. Gendler, T. H. Florin, G. R. Hill, V. Korolik and M. A. McGuckin (2007). "MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection." J Clin Invest **117**(8): 2313-2324.

McCormick, D. A., L. W. Horton and A. S. Mee (1990). "Mucin depletion in inflammatory bowel disease." J Clin Pathol **43**(2): 143-146.

McFadden, E., M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth and A. J. Swerdlow (2014). "The relationship between obesity and exposure to light at night: cross-sectional analyses of over 100,000 women in the Breakthrough Generations Study." Am J Epidemiol **180**(3): 245-250.

Megdal, S. P., C. H. Kroenke, F. Laden, E. Pukkala and E. S. Schernhammer (2005). "Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis." Eur J Cancer **41**(13): 2023-2032.

Melgar, S., L. Karlsson, E. Rehnstrom, A. Karlsson, H. Utkovic, L. Jansson and E. Michaelsson (2008). "Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease." Int Immunopharmacol **8**(6): 836-844.



Mendoza, J., C. Graff, H. Dardente, P. Pevet and E. Challet (2005). "Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle." J Neurosci **25**(6): 1514-1522.

Miller, B. H., E. L. McDearmon, S. Panda, K. R. Hayes, J. Zhang, J. L. Andrews, M. P. Antoch, J. R. Walker, K. A. Esser, J. B. Hogenesch and J. S. Takahashi (2007). "Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3342-3347.

Miyazawa, F., O. R. Olijnyk, C. J. Tilley and T. Tamaoki (1967). "Interactions between dextran sulfate and Escherichia coli ribosomes." Biochim Biophys Acta **145**(1): 96-104.

Mombaerts, P., E. Mizoguchi, M. J. Grusby, L. H. Glimcher, A. K. Bhan and S. Tonegawa (1993). "Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice." Cell **75**(2): 274-282.

Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-1790.

Morris, C. J., J. N. Yang and F. A. Scheer (2012). "The impact of the circadian timing system on cardiovascular and metabolic function." Prog Brain Res **199**: 337-358.

Morrissey, P. J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt and J. D. Watson (1993). "CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells." J Exp Med **178**(1): 237-244.

Mukherji, A., A. Kobiita, T. Ye and P. Chambon (2013). "Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs." Cell **153**(4): 812-827.

Narducci, F., G. Bassotti, M. Gaburri and A. Morelli (1987). "Twenty four hour manometric recording of colonic motor activity in healthy man." Gut **28**(1): 17-25.

Nedeltcheva, A. V. and F. A. Scheer (2014). "Metabolic effects of sleep disruption, links to obesity and diabetes." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **21**(4): 293-298.

Neurath, M. F., I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stuber and W. Strober (1995). "Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice." J Exp Med **182**(5): 1281-1290.

Niess, J. H. and H. C. Reinecker (2006). "Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota." Cell Microbiol **8**(4): 558-564.

Nojkov, B., J. H. Rubenstein, W. D. Chey and W. A. Hoogerwerf (2010). "The impact of rotating shift work on the prevalence of irritable bowel syndrome in nurses." Am J Gastroenterol **105**(4): 842-847.

O'Neill, J. S. and A. B. Reddy (2012). "The essential role of cAMP/Ca<sup>2+</sup> signalling in mammalian circadian timekeeping." Biochem Soc Trans **40**(1): 44-50.

Ohta, H., S. Yamazaki and D. G. McMahon (2005). "Constant light desynchronizes mammalian clock neurons." Nat Neurosci **8**(3): 267-269.

Oishi, K., K. Miyazaki, K. Kadota, R. Kikuno, T. Nagase, G. Atsumi, N. Ohkura, T. Azama, M. Mesaki, S. Yukimasa, H. Kobayashi, C. Iitaka, T. Umehara, M. Horikoshi, T. Kudo, Y. Shimizu, M. Yano, M. Monden, K. Machida, J. Matsuda, S. Horie, T. Todo and N. Ishida (2003). "Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes." J Biol Chem **278**(42): 41519-41527.

Pabst, O. (2012). "New concepts in the generation and functions of IgA." Nat Rev Immunol **12**(12): 821-832.

Pacha, J. and A. Sumova (2013). "Circadian regulation of epithelial functions in the intestine." Acta Physiol (Oxf) **208**(1): 11-24.

Pagel, R., F. Bar, T. Schroder, A. Sunderhauf, A. Kunstner, S. M. Ibrahim, S. E. Autenrieth, K. Kalies, P. Konig, A. H. Tsang, D. Bettenworth, S. Divanovic, H. Lehnert, K. Fellermann, H. Oster, S. Derer and C. Sina (2017). "Circadian rhythm disruption impairs tissue homeostasis and exacerbates chronic inflammation in the intestine." FASEB J **31**(11): 4707-4719.

Palmieri, O., G. Mazzocchi, F. Bossa, R. Maglietta, O. Palumbo, N. Ancona, G. Corritore, T. Latiano, G. Martino, R. Rubino, G. Biscaglia, D. Scimeca, M. Carella, V. Annese, A. Andriulli and A. Latiano (2015). "Systematic analysis of circadian genes using genome-wide cDNA microarrays in the inflammatory bowel disease transcriptome." Chronobiol Int **32**(7): 903-916.

Panda, S., M. P. Antoch, B. H. Miller, A. I. Su, A. B. Schook, M. Straume, P. G. Schultz, S. A. Kay, J. S. Takahashi and J. B. Hogenesch (2002). "Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock." Cell **109**(3): 307-320.

Panda, S., J. B. Hogenesch and S. A. Kay (2002). "Circadian rhythms from flies to human." Nature **417**(6886): 329-335.

Papantoniou, K. and M. Kogevinas (2013). "Shift work and breast cancer: do we need more evidence and what should this be?" Occup Environ Med **70**(12): 825-826.

Parsons, M. J., T. E. Moffitt, A. M. Gregory, S. Goldman-Mellor, P. M. Nolan, R. Poulton and A. Caspi (2015). "Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study." Int J Obes (Lond) **39**(5): 842-848.

Perse, M. and A. Cerar (2012). "Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks." J Biomed Biotechnol **2012**: 718617.

Peterson, L. W. and D. Artis (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." Nat Rev Immunol **14**(3): 141-153.

Pierdomenico, M., A. Negroni, L. Stronati, R. Vitali, E. Prete, J. Bertin, P. J. Gough, M. Aloï and S. Cucchiara (2014). "Necroptosis is active in children with inflammatory bowel disease and contributes to heighten intestinal inflammation." Am J Gastroenterol **109**(2): 279-287.

Pizarro, A., K. Hayer, N. F. Lahens and J. B. Hogenesch (2013). "CircaDB: a database of mammalian circadian gene expression profiles." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D1009-1013.

Poritz, L. S., K. I. Garver, C. Green, L. Fitzpatrick, F. Ruggiero and W. A. Koltun (2007). "Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis." J Surg Res **140**(1): 12-19.

Portal-Nunez, S., U. T. Shankavaram, M. Rao, N. Datrice, S. Atay, M. Aparicio, K. A. Camphausen, P. M. Fernandez-Salguero, H. Chang, P. Lin, D. S. Schrupp, S. Garantzotis, F. Cuttitta and E. Zudaire (2012). "Aryl hydrocarbon receptor-induced adrenomedullin mediates cigarette smoke carcinogenicity in humans and mice." Cancer Res **72**(22): 5790-5800.

Preuss, F., Y. Tang, A. D. Laposky, D. Arble, A. Keshavarzian and F. W. Turek (2008). "Adverse effects of chronic circadian desynchronization in animals in a "challenging" environment." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(6): R2034-2040.

Pullan, R. D., G. A. Thomas, M. Rhodes, R. G. Newcombe, G. T. Williams, A. Allen and J. Rhodes (1994). "Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis." Gut **35**(3): 353-359.

Qiu, J. M., S. A. Roberts and C. S. Potten (1994). "Cell migration in the small and large bowel shows a strong circadian rhythm." Epithelial Cell Biol **3**(4): 137-148.

Quintero, J. E., S. J. Kuhlman and D. G. McMahon (2003). "The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light." J Neurosci **23**(22): 8070-8076.

Rakoff-Nahoum, S., 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): 229-241.

Ralph, M. R., R. G. Foster, F. C. Davis and M. Menaker (1990). "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period." Science **247**(4945): 975-978.

Rath, E., E. Berger, A. Messlik, T. Nunes, B. Liu, S. C. Kim, N. Hoogenraad, M. Sans, R. B. Sartor and D. Haller (2012). "Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation." Gut **61**(9): 1269-1278.

Refinetti, R. (2010). "The circadian rhythm of body temperature." Front Biosci (Landmark Ed) **15**: 564-594.

Richardson, K. C., L. Jarett and E. H. Finke (1960). "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy." Stain Technol **35**: 313-323.

Rogler, G. and S. Vavricka (2015). "Exposome in IBD: recent insights in environmental factors that influence the onset and course of IBD." Inflamm Bowel Dis **21**(2): 400-408.

Russell, P. and P. Nurse (1987). "Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog." Cell **49**(4): 559-567.

Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A. C. Feller and I. Horak (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." Cell **75**(2): 253-261.

Saito, H., T. Terada, J. Shimakura, T. Katsura and K. Inui (2008). "Regulatory mechanism governing the diurnal rhythm of intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter 1 (PEPT1)." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(2): G395-402.

Salim, S. Y. and J. D. Soderholm (2011). "Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **17**(1): 362-381.

Salzman, N. H., D. Ghosh, K. M. Huttner, Y. Paterson and C. L. Bevins (2003). "Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin." Nature **422**(6931): 522-526.

Saper, C. B., T. E. Scammell and J. Lu (2005). "Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms." Nature **437**(7063): 1257-1263.

Schaal, S. K., K.; Kunsch, S. (2016). Der Mensch in Zahlen, Springer.

Scheer, F. A., M. F. Hilton, C. S. Mantzoros and S. A. Shea (2009). "Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4453-4458.

Schernhammer, E. S., D. Feskanich, G. Liang and J. Han (2013). "Rotating night-shift work and lung cancer risk among female nurses in the United States." Am J Epidemiol **178**(9): 1434-1441.

Schernhammer, E. S., F. Laden, F. E. Speizer, W. C. Willett, D. J. Hunter, I. Kawachi and G. A. Colditz (2001). "Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study." J Natl Cancer Inst **93**(20): 1563-1568.

Scheving, L. E., E. R. Burns, J. E. Pauly and T. H. Tsai (1978). "Circadian variation in cell division of the mouse alimentary tract, bone marrow and corneal epithelium." Anat Rec **191**(4): 479-486.

Schmitz, S. (2011). Der Experimentator: Zellkultur, Spektrum.

Schroder, J. M. (1999). "Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements." Cell Mol Life Sci **56**(1-2): 32-46.

- Schroder, J. M. (1999). "Epithelial peptide antibiotics." Biochem Pharmacol **57**(2): 121-134.
- Schwerk, J., M. Koster, H. Hauser, M. Rohde, M. Fulde, M. W. Hornef and T. May (2013). "Generation of mouse small intestinal epithelial cell lines that allow the analysis of specific innate immune functions." PLoS One **8**(8): e72700.
- Segawa, K., S. Nakazawa, Y. Tsukamoto, Y. Kurita, H. Goto, A. Fukui and K. Takano (1987). "Peptic ulcer is prevalent among shift workers." Dig Dis Sci **32**(5): 449-453.
- Silver, A. C., A. Arjona, W. E. Walker and E. Fikrig (2012). "The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity." Immunity **36**(2): 251-261.
- Silver, R., J. LeSauter, P. A. Tresco and M. N. Lehman (1996). "A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms." Nature **382**(6594): 810-813.
- Siomi, H. and M. C. Siomi (2009). "On the road to reading the RNA-interference code." Nature **457**(7228): 396-404.
- Sonnenberg, A. (1990). "Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees." Gut **31**(9): 1037-1040.
- Stevens, R. and J. Hansen (2013). "Letter to the editor, re: night-shift work and risk of breast cancer (Kamdar et al., doi:10.1007/s10549-013-2433-1)." Breast Cancer Res Treat **139**(1): 291-294.
- Stevens, R. G., J. Hansen, E. S. Schernhammer and S. Davis (2013). "Response to Ijaz S, et al. "Night-shift work and breast cancer--a systematic review and meta-analysis"." Scand J Work Environ Health **39**(6): 631-632.
- Stevenson, N. R., F. Ferrigni, K. Parnicky, S. Day and J. S. Fierstein (1975). "Effect of changes in feeding schedule on the diurnal rhythms and daily activity levels of intestinal brush border enzymes and transport systems." Biochim Biophys Acta **406**(1): 131-145.
- Stevenson, N. R., H. S. Sitren and S. Furuya (1980). "Circadian rhythmicity in several small intestinal functions is independent of use of the intestine." Am J Physiol **238**(3): G203-207.
- Stokkan, K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki and M. Menaker (2001). "Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding." Science **291**(5503): 490-493.
- Storch, K. F., O. Lipan, I. Leykin, N. Viswanathan, F. C. Davis, W. H. Wong and C. J. Weitz (2002). "Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart." Nature **417**(6884): 78-83.
- Strober, W., I. J. Fuss and R. S. Blumberg (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." Annu Rev Immunol **20**: 495-549.

Sujino, M., K. H. Masumoto, S. Yamaguchi, G. T. van der Horst, H. Okamura and S. T. Inouye (2003). "Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice." Curr Biol **13**(8): 664-668.

Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel and H. Lochs (2002). "Mucosal flora in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **122**(1): 44-54.

Takano, A., M. Uchiyama, N. Kajimura, K. Mishima, Y. Inoue, Y. Kamei, T. Kitajima, K. Shibui, M. Katoh, T. Watanabe, Y. Hashimoto, T. Nakajima, Y. Ozeki, T. Hori, N. Yamada, R. Toyoshima, N. Ozaki, M. Okawa, K. Nagai, K. Takahashi, Y. Isojima, T. Yamauchi and T. Ebisawa (2004). "A missense variation in human casein kinase I epsilon gene that induces functional alteration and shows an inverse association with circadian rhythm sleep disorders." Neuropsychopharmacology **29**(10): 1901-1909.

Tang, Y., F. Preuss, F. W. Turek, S. Jakate and A. Keshavarzian (2009). "Sleep deprivation worsens inflammation and delays recovery in a mouse model of colitis." Sleep Med **10**(6): 597-603.

Tanimura, N., N. Kusunose, N. Matsunaga, S. Koyanagi and S. Ohdo (2011). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner." Toxicology **290**(2-3): 203-207.

Thaiss, C. A., D. Zeevi, M. Levy, G. Zilberman-Schapira, J. Suez, A. C. Tengeler, L. Abramson, M. N. Katz, T. Korem, N. Zmora, Y. Kuperman, I. Biton, S. Gilad, A. Harmelin, H. Shapiro, Z. Halpern, E. Segal and E. Elinav (2014). "Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis." Cell **159**(3): 514-529.

Toh, K. L., C. R. Jones, Y. He, E. J. Eide, W. A. Hinz, D. M. Virshup, L. J. Ptacek and Y. H. Fu (2001). "An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome." Science **291**(5506): 1040-1043.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Tsang, A. H., J. L. Barclay and H. Oster (2014). "Interactions between endocrine and circadian systems." J Mol Endocrinol **52**(1): R1-16.

Turek, F. W., C. Joshu, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, D. R. Jensen, R. H. Eckel, J. S. Takahashi and J. Bass (2005). "Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice." Science **308**(5724): 1043-1045.

Ueda, H. R., W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi and S. Hashimoto (2002). "A transcription factor response element for gene expression during circadian night." Nature **418**(6897): 534-539.

van der Flier, L. G. and H. Clevers (2009). "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium." Annu Rev Physiol **71**: 241-260.

van der Horst, G. T., M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, A. Verkerk, A. P. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers and A. Yasui (1999). "Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms." Nature **398**(6728): 627-630.

Van der Sluis, M., B. A. De Koning, A. C. De Bruijn, A. Velcich, J. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, H. A. Buller, J. Dekker, I. Van Seuningen, I. B. Renes and A. W. Einerhand (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." Gastroenterology **131**(1): 117-129.

van der Veen, D. R., N. L. Minh, P. Gos, M. Arneric, M. P. Gerkema and U. Schibler (2006). "Impact of behavior on central and peripheral circadian clocks in the common vole *Microtus arvalis*, a mammal with ultradian rhythms." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3393-3398.

van Es, J. H., P. Jay, A. Gregorieff, M. E. van Gijn, S. Jonkheer, P. Hatzis, A. Thiele, M. van den Born, H. Begthel, T. Brabletz, M. M. Taketo and H. Clevers (2005). "Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts." Nat Cell Biol **7**(4): 381-386.

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe and G. Kroemer (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714.

Viennois, E., F. Chen, H. Laroui, M. T. Baker and D. Merlin (2013). "Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA." BMC Res Notes **6**: 360.

Vitaterna, M. H., C. P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E. M. Fruechte, K. Hitomi, R. J. Thresher, T. Ishikawa, J. Miyazaki, J. S. Takahashi and A. Sancar (1999). "Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 12114-12119.

Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

Wang, F., K. L. Yeung, W. C. Chan, C. C. Kwok, S. L. Leung, C. Wu, E. Y. Chan, I. T. Yu, X. R. Yang and L. A. Tse (2013). "A meta-analysis on dose-response relationship between night shift work and the risk of breast cancer." Ann Oncol **24**(11): 2724-2732.

Wehkamp, J., N. H. Salzman, E. Porter, S. Nuding, M. Weichenthal, R. E. Petras, B. Shen, E. Schaeffeler, M. Schwab, R. Linzmeier, R. W. Feathers, H. Chu, H. Lima, Jr., K. Fellermann, T. Ganz, E. F. Stange and C. L. Bevins (2005). "Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18129-18134.

Wehkamp, J. and E. F. Stange (2010). "Paneth's disease." J Crohns Colitis **4**(5): 523-531.

Wehkamp, J., G. Wang, I. Kubler, S. Nuding, A. Gregorieff, A. Schnabel, R. J. Kays, K. Fellermann, O. Burk, M. Schwab, H. Clevers, C. L. Bevins and E. F. Stange (2007). "The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4." J Immunol **179**(5): 3109-3118.

Welsch, U. (2014). Lehrbuch Histologie, Urban & Fischer.

Welz, P. S., A. Wullaert, K. Vlantis, V. Kondylis, V. Fernandez-Majada, M. Ermolaeva, P. Kirsch, A. Sterner-Kock, G. van Loo and M. Pasparakis (2011). "FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation." Nature **477**(7364): 330-334.

Wilz, M. and G. Heldmaier (2000). "Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*." J Comp Physiol B **170**(7): 511-521.

Winey, M., J. B. Meehl, E. T. O'Toole and T. H. Giddings, Jr. (2014). "Conventional transmission electron microscopy." Mol Biol Cell **25**(3): 319-323.

Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann and M. F. Neurath (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**(3): 541-546.

Xu, Y., Q. S. Padiath, R. E. Shapiro, C. R. Jones, S. C. Wu, N. Saigoh, K. Saigoh, L. J. Ptacek and Y. H. Fu (2005). "Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome." Nature **434**(7033): 640-644.

Yan, Y., V. Kolachala, G. Dalmaso, H. Nguyen, H. Laroui, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2009). "Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis." PLoS One **4**(6): e6073.

Yang, Q., N. A. Bermingham, M. J. Finegold and H. Y. Zoghbi (2001). "Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine." Science **294**(5549): 2155-2158.

Yu, X., D. Rollins, K. A. Ruhn, J. J. Stubblefield, C. B. Green, M. Kashiwada, P. B. Rothman, J. S. Takahashi and L. V. Hooper (2013). "TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock." Science **342**(6159): 727-730.

Zhang, Z. and Z. Liu (2016). "Paneth cells: the hub for sensing and regulating intestinal flora." Sci China Life Sci **59**(5): 463-467.

Zheng, B., U. Albrecht, K. Kaasik, M. Sage, W. Lu, S. Vaishnav, Q. Li, Z. S. Sun, G. Eichele, A. Bradley and C. C. Lee (2001). "Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock." Cell **105**(5): 683-694.

Zheng, B., D. W. Larkin, U. Albrecht, Z. S. Sun, M. Sage, G. Eichele, C. C. Lee and A. Bradley (1999). "The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock." Nature **400**(6740): 169-173.



## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Arten und Vorkommen von intestinalen Epithelzellen im Darmepithel. ....	8
Abbildung 1.2: Signaltransduktion des TNFR1. ....	14
Abbildung 1.3: Die molekulare Uhr in Säugetieren. ....	18
Abbildung 2.1: Effizienz der Gen-Abschaltung von IEC-1 Zellen mit <i>Per1/Per2</i> siRNA. ....	41
Abbildung 3.1: Charakterisierung des Darmepithels naiver WT und <i>Per1/2</i> Mäuse. ....	44
Abbildung 3.2: Analyse von sekretorischen Becherzellen im Kolon von WT und <i>Per1/2</i> Mäusen. ....	45
Abbildung 3.3: Analyse von sekretorischen Paneth Zellen im Ileum von WT und <i>Per1/2</i> Mäusen. ....	46
Abbildung 3.4: Analyse der <i>in vivo</i> Zellteilung von IEZ des Ileums und Kolons in unbehandelten WT und <i>Per1/2</i> Mäusen. ....	47
Abbildung 3.5: Charakterisierung des Zellzyklus in WT und <i>Per1/2</i> Mäusen. ....	48
Abbildung 3.6: Analyse des Zelltods von IEZ des Ileums und Kolons in unbehandelten WT und <i>Per1/2</i> Mäusen. ....	49
Abbildung 3.7: Analyse der tiefen Kryptenregion des Ileums von unbehandelten WT und <i>Per1/2</i> Tieren mittels Elektronenmikroskopie. ....	50
Abbildung 3.8: Analyse des Zelltods in WT und <i>Per1/2</i> Mäusen. ....	51
Abbildung 3.9: Analyse der Apoptoseinduktion in Kontroll und <i>Per1/Per2</i> transfizierten IEC-1 Zellen. ....	52
Abbildung 3.10: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und <i>Per1/2</i> Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (1). ....	53
Abbildung 3.11: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und <i>Per1/2</i> Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (2). ....	54
Abbildung 3.12: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und <i>Per1/2</i> Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (3). ....	55
Abbildung 3.13: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und <i>Per1/2</i> Mäusen gegenüber experimenteller DSS Kolitis (4). ....	56

Abbildung 3.14: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller Kolitis (1). .....	57
Abbildung 3.15: Charakterisierung der Suszeptibilität von WT und Per1/2 Mäusen gegenüber experimenteller Kolitis (2). .....	58
Abbildung 3.16: Analyse von Zelltod und Proliferation in extern desynchronisierten WT Mäusen. ....	60
Abbildung 4.1: Postulierter Mechanismus von zirkadianer Disruption hinsichtlich Homöostase und Zelltod von IEZ. ....	73
Tabelle 2.1: Kriterien zur Ermittlung des <i>Disease Activity Index</i> (DAI). ....	28
Tabelle 2.2: Kriterien zur Ermittlung des <i>murine endoscopic index of colitis severity</i> (MEICS). ....	29
Tabelle 2.3: Genotypisierungprotokolle für Per1 und Per2. ....	37
Tabelle 2.4: Verwendete Primerpaare für die qPCR. ....	39

### **III Danksagung**

Viele Menschen waren direkt und indirekt an dieser Arbeit beteiligt, und alle aufzuzählen würde den Rahmen sprengen. Ich möchte daher hier nur einige exemplarisch nennen und an den Rest denken.

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Christian Sina, der mir vor vielen Jahren Orientierung und eine Aufgabe gab, sowie dem ganzen Team der damaligen Molekularen Gastroenterologie/heutigen Ernährungsmedizin (ohne Titel und Reihenfolge): Ann-Kathrin Brethack, Heidi Schlichting, Stefanie Derer, Torsten Schröder, Florian Bär, Sebastian Jendrek, Annika Sünderhauf, Petra Langenstrassen. Es war eine tolle und produktive Zeit mit Euch, die mich auch in meiner persönlichen Entwicklung geprägt hat und an die ich gerne zurückdenke.

Vielen Dank auch an meine neue Heimat, das Team vom Institut für Anatomie, für Kooperationen, Hilfsbereitschaft, Unterstützung (auch ohne Titel und Reihenfolge): Kathrin Kalies, Mario Pieper, Peter König, Hristo Örün, Marie-Luise Leppin, Daniela Rieck. Insbesondere bei Prof. Dr. Jürgen Westermann möchte ich mich herzlich bedanken – ohne Dich gäbe es diese Arbeit nicht.

Danke Steffi, dass wir die Höhen und Tiefen des Lebens gemeinsam meistern, und danke Ruby und Henry, dass Ihr dieses Leben bereichert.