

**Der Einfluss von myeloidem PDGFR- α
auf Colitis-Suszeptibilität und
intestinale Homöostase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ronja Marion Dörk

aus Neustadt am Rübenberge

Hamburg, 2022

Diese Dissertation wurde von Dr. med. Carolin Manthey supervidiert und an der I. Medizinischen Klinik, Abteilung für molekulare Immunologie und Gastroenterologie, des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Zeitraum von September 2018 bis März 2022 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Herkel
I. Medizinische Klinik und Poliklinik
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Streit
Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie
Universität Hamburg

Tag der Disputation: 18. Januar 2023

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

- Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Ganzhorn
Institut für Zell- und Systembiologie der Tiere
Universität Hamburg
- Prof. Dr. rer. nat. Tobias Lenz
Institut für Zell- und Systembiologie der Tiere
Universität Hamburg
- Dr. rer. nat. Andrej Fabrizius
Institut für Zell- und Systembiologie der Tiere
Universität Hamburg

ZUSAMMENFASSUNG

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), zu denen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zählen, korrelieren mit einer erhöhten Morbidität in westlichen Ländern, wobei die Inzidenz für CED in Entwicklungsländern zunehmend steigt. Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist ein Zusammenspiel aus genetischer Suszeptibilität und Umwelteinflüssen, die zu einer Mikrobiom-Dysbiose führen können, was letztendlich in einer Fehlregulierung der Immunantwort resultieren und zu einer rezidivierenden oder kontinuierlichen intestinalen Inflammation führen kann. Die multifaktorielle Pathogenese von CED macht es daher dringend notwendig, weitere Pathomechanismen und potenzielle Biomarker für den Krankheits- und Therapieverlauf zu identifizieren.

Wachstumsfaktoren der PDGF (*Platelet-derived growth factor*)-Familie und ihre Rezeptoren sind schon früh in die Differenzierung und Proliferation zahlreicher Zellen in unterschiedlichen Geweben involviert und werden in der adulten intestinalen Mukosa, insbesondere von mononuklearen Zellen wie Makrophagen, exprimiert. Makrophagen fungieren als wichtige Regulatoren der intestinalen Homöostase und sind damit einhergehend an der Toleranzwirkung gegenüber harmlosen Antigenen sowie an der Abwehr potenzieller Pathogene beteiligt. Die Funktion der Makrophagen kann in verschiedenen Situationen immunsuppressiv oder pro-inflammatorisch sein. Das Schlüsselzytokin der Makrophagen, TNF- α , kann hierbei über NF κ B-Signalwege Zellüberleben vermitteln und auf der anderen Seite als Mediator von Apoptose, Nekroptose sowie als Treiber einer gesteigerten Inflammation bei CED fungieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intestinale Expression von PDGFRs, insbesondere von PDGFR- α , in CED-Patient:innen signifikant erhöht ist. Weiterhin hat der Verlust von myeloidem PDGFR- α im Mausmodell zu einer Aggravation der Colitis geführt, charakterisiert durch eine intestinale Hochregulierung von *Tnfa* auf mRNA-Ebene und dem Verlust anti-inflammatorischer MHCII⁺ CD206⁺ Makrophagen. Der Verlust von anti-inflammatorischen MHCII⁺ CD206⁺ Makrophagen hat sich zudem bereits in unbehandelten Mäusen (*steady state*) manifestiert. In diesem Zusammenhang konnte auch eine intestinale Herunterregulierung des *Scavenger*-Rezeptors *Cd163* auf mRNA-Ebene sowie eine verminderte mukosale Integrität in *Knockout* (KO)-Tieren gezeigt werden. Ferner zeigten unbehandelte Mäuse mit myeloider PDGFR- α -Depletion eine Mikrobiom-Dysbiose, gekennzeichnet durch eine erhöhte Abundanz von *Akkermansia* (*Verrucomicrobia*) und einer Verarmung an *Clostridia* (*Firmicutes*) und *Bacteroidia* (*Bacteroidetes*).

In vitro führte der Verlust von myeloidem PDGFR- α , in unpolarierten und anti-inflammatorischen *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs), zu einer verringerten phagozytischen Aktivität. Daneben zeigten anti-inflammatorische BMDMs aus PDGFR- α -

defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-BMDMs eine geringere Hochregulierung von *Stat6* auf mRNA-Ebene. Ferner konnte eine Butyrat-Behandlung von anti-inflammatorischen BMDMs eine Hochregulierung von *Stat6* auf mRNA-Ebene in BMDMs aus Wildtyp-Mäusen induzieren, jedoch nicht in BMDMs aus *Knockout*-Mäusen. Damit einhergehend konnte in BMDMs aus Wildtyp-Mäusen nach Butyrat-Behandlung eine signifikante Hochregulierung von *Pdgfra* gezeigt werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine protektive, zellspezifische Funktion für PDGFR- α in myeloiden Zellen während intestinaler Homöostase und Inflammation hin, wobei der Verlust von PDGFR- α in diesem Zelltyp zu einer konstanten Verarmung an anti-inflammatorischen Makrophagen, einer verminderten mukosalen Integrität und zur Entwicklung eines colitogenen Mikrobioms führte.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) including Crohn's Disease und Ulcerative Colitis are associated with increased morbidity in the western world, and with rising incidence in developing countries. The pathogenesis of IBD combines genetic susceptibility and environmental factors resulting in microbial dysbiosis and uncontrolled intestinal inflammation due to an inappropriate intestinal immune activation. The pathogenesis of IBD is multifactorial and makes it therefore, urgently necessary to identify further pathomechanisms and biomarkers for proper therapy.

The members of the PDGF (platelet-derived growth factor)-family are involved in the early stage of cell differentiation and proliferation in different tissues. In the adult mucosa, PDGFs are expressed particularly by mononuclear cells such as macrophages. Macrophages are important regulators of intestinal homeostasis and are therefore, involved in the tolerance towards harmless antigens as well as the defense against potential pathogens. Here, macrophages can function immunosuppressive or pro-inflammatory. TNF- α , the key cytokine of macrophages, mediates cell survival by NF κ B signaling, but also apoptosis and necroptosis. TNF- α also represents a driver of increased intestinal inflammation in IBD.

This data could show that intestinal PDGFRs, predominantly PDGFR- α , are upregulated in IBD patients. Additionally, the loss of PDGFR- α in myeloid cells led to an aggravation of colitis in mice, characterized by an increased expression of *Tnfa* at mRNA-level as well as the loss of anti-inflammatory MHCII⁺ CD206⁺ macrophages. Of note, the loss of anti-inflammatory MHCII⁺ CD206⁺ macrophages manifested itself already in steady state. Moreover, knockout (KO) mice also showed a downregulation of the scavenger receptor *Cd163* at mRNA level as well as an impaired intestinal mucosal integrity. Furthermore, untreated mice lacking myeloid PDGFR- α showed a dysbiosis of the microbiota, characterized by a higher abundance of *Akkermansia* (*Verrucomicrobia*) and lower frequencies of *Clostridia* (*Firmicutes*) and *Bacteroidia* (*Bacteroidetes*).

Besides this, phagocytic activity was impaired in non-polarized and anti-inflammatory bone marrow-derived macrophages (BMDMs) of mice lacking PDGFR- α in myeloid cells. Additionally, anti-inflammatory WT-BMDMs showed a higher expression of *Stat6* at mRNA level compared to KO-BMDMs. Furthermore, butyrate treatment of anti-inflammatory BMDMs could upregulate expression of *Stat6* at mRNA level in WT-BMDMs, but not in KO-BMDMs. Moreover, butyrate treatment of WT-BMDMs could induce the expression of *Pdgfra* at mRNA level.

Collectively, these results suggest a protective and cell-specific function for myeloid PDGFR- α in intestinal homeostasis and during inflammation. Here, the loss of PDGFR- α in myeloid cells led to a constant depletion of anti-inflammatory

MHCII⁺ CD206⁺ macrophages, an impaired mucosal integrity, and to the development of a colitogenic microbiota.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abbildungsverzeichnis

II. Tabellenverzeichnis

III. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das intestinale Mikrobiom & Darmimmunität	1
1.2. Darmimmunität: Phagozyten.....	5
1.2.1. Intestinale Makrophagen.....	7
1.3. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)	10
1.3.1. Morbus Crohn	12
1.3.2. Colitis ulcerosa	13
1.4. <i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF).....	14
1.4.1. PDGF-Isoformen.....	14
1.4.2. PDGF-Rezeptoren	15
1.4.3. PDGF-Signalwege.....	16
1.4.4. Die Rolle von PDGF/PDGFR in Physiologie und Pathogenese	17
1.5. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Geräte und Instrumente	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.4. Kits.....	24
2.1.5. TaqMan® Sonden.....	24
2.1.6. Antikörper Immunhistochemie.....	25
2.1.7. Antikörper Durchflusszytometrie	25
2.1.8. Software.....	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Durchflusszytometrie.....	26
2.2.2. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	29
2.2.3. RNA-Analyse.....	29
2.2.4. Histologie.....	31
2.2.5. Mikrobiom-Analyse	33
2.2.6. Isolation von Primärzellen	33
2.2.7. Analyse der Phagozytose-Aktivität	38
2.2.8. <i>In vitro</i> Stimulierung von BMDMs mit Natrium-Butyrat	38
2.2.9. Mausmodelle Für CED.....	38

3.	Ergebnisse	42
3.1.	Erhöhte Expression von <i>Pdgfra</i> und <i>Pdgfrβ</i> im entzündeten Colongewebe in Patient:innen mit aktivem M. Crohn und Mäusen mit DSS-Colitis	42
3.2.	Effektive Deletion von PDGFR-α aus myeloiden Leukozyten.....	43
3.3.	Protektive Funktion von myeloidem PDGFR-α in intestinaler Inflammation (DSS-Modell).....	45
3.4.	Protektive Funktion von myeloidem PDGFR-α während bakterieller Infektion.....	51
3.5.	<i>Cohousing</i> führt zu einer Angleichung des Phänotyps von LysM-PDGFR-α ^{+/-} - und LysM-PDGFR-α ^{-/-} -Mäusen während DSS-Colitis	55
3.6.	Myeloides PDGFR-α übt eine modulierende Funktion auf das Mikrobiom aus	57
3.7.	Aggravierte DSS-Colitis in LysM-PDGFR-α ^{-/-} -Mäusen ist Mikrobiota-abhängig.....	59
3.8.	Myeloides PDGFR-α vermittelt mukosale Integrität	61
3.9.	Analyse von BMDMs <i>in vitro</i>	62
3.9.1.	Verringerte Phagozytose-Aktivität in LysM-PDGFR-α ^{-/-} -BMDMs.....	62
3.9.2.	Butyrat unterstützt die Expression von <i>Stat6</i> in anti-inflammatorischen BMDMs über PDGFR-α.....	63
3.9.3.	Butyrat stimuliert die Expression von <i>Pdgfra</i> in PDGFR-α ^{+/-} -BMDMs	64
4.	Diskussion	66
4.1.	Hochregulierung von <i>Pdgfra</i> in intestinaler Inflammation	66
4.2.	Myeloide Deletion von PDGFR-α erhöht die Colitis-Suszeptibilität und moduliert das angeborene Immunsystem	68
4.3.	PDGFR-α vermittelt die anti-inflammatorische Polarisierung von Makrophagen	72
4.4.	Myeloides PDGFR-α vermittelt mukosale Integrität	74
4.5.	Myeloides PDGFR-α alterniert die Komposition des Mikrobioms und beeinflusst dadurch die Colitis-Suszeptibilität.....	77
4.6.	Butyrat unterstützt die anti-inflammatorische Makrophagen-Polarisierung über PDGFR-α und STAT6.....	79
4.7.	Konklusion & Ausblick	79

IV. Literatur

V. Danksagung

VI. Eidesstattliche Versicherung

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Einfluss des Mikrobioms auf das intestinale Immunsystem	3
Abb. 2 Funktionen von intestinalen Makrophagen	7
Abb. 3 Molekulare und metabolische Signatur der Makrophagenaktivierung.....	8
Abb. 4 Die intestinale Mukosa im gesunden Darm und in CED	12
Abb. 5 Schematische Darstellung der PDGF-Liganden und PDGFR-Isoformen und ihrer Bindungsmuster	15
Abb. 6 <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse myeloider LP-Zellen	28
Abb. 7 <i>Gating</i> -Strategie zur Identifikation von BMDMs	29
Abb. 8 Schematische Darstellung der BMDM-Isolation	37
Abb. 9 Hochregulierung von PDGFRs im Colongewebe von CED-Patient:innen und Mäusen mit DSS-Colitis.....	42
Abb. 10 Deletion von PDGFR- α aus myeloiden Zellen mittels konditionellen <i>Knockouts</i>	44
Abb. 11 Charakteristika der DSS-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (<i>separate housing</i>)	46
Abb. 12 Durchflusszytometrische Analyse von LP-Immunzellen aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis (<i>separate housing</i>)	48
Abb. 13 Analyse der Genexpression im Colon von LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis (<i>separate housing</i>)	49
Abb. 14 Serumkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen während DSS-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (<i>separate housing</i>).....	50
Abb. 15 Charakteristika der <i>C. rodentium</i> -induzierten Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (<i>separate housing</i>)	52
Abb. 16 Durchflusszytometrische Analyse von LP-Immunzellen aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während <i>C. rodentium</i> -Colitis (<i>separate housing</i>)	53
Abb. 17 Analyse der Genexpression im Colon von LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während <i>C. rodentium</i> -Colitis (<i>separate housing</i>).....	54
Abb. 18 Serumkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen während <i>C. rodentium</i> -Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (<i>separate housing</i>)	55
Abb. 19 Phänotypsierung von <i>cohouse</i> LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis.....	56
Abb. 20 16S rRNA Analyse des Mikrobioms von LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen	58
Abb. 21 Analyse des Phänotyps von LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (<i>separate housing</i>) in Gnotobioten.....	60
Abb. 22 Charakterisierung des Mukosaepithels in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (<i>separate housing</i>).....	62
Abb. 23 Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose-Aktivität von BMDMs.....	63
Abb. 24 Butyrat-Behandlung von IL-4-polarisierten BMDMs	64
Abb. 25 Butyrat-Behandlung von WT-BMDMs	65

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Geräte- und Instrumentenliste.....	21
Tab. 2 Liste über Verbrauchsmaterialien.....	22
Tab. 3 Chemikalien- und Reagenzienliste	22
Tab. 4 Liste über verwendete Kits	24
Tab. 5 Liste über verwendete TaqMan® Sonden	24
Tab. 6 Antikörperliste für Immunhistochemie.....	25
Tab. 7 Antikörperliste für Durchflusszytometrie	25
Tab. 8 Softwareliste	26
Tab. 9 PCR-Cyclingprogramm für die cDNA-Synthese	30
Tab. 10 PCR-Cyclingprogramm für die qRT-PCR.....	30
Tab. 11 Entwässerungs- und Paraffinierungsprotokoll des pathologischen Instituts	31
Tab. 12 Pipettieransatz für die PDGFR- α PCR.....	34
Tab. 13 Pipettieransatz für die LysM PCR.....	35
Tab. 14 PCR-Programm für die PDGFR- α PCR	35
Tab. 15 PCR-Programm für die LysM PCR.....	35
Tab. 16 DAI-Score	40
Tab. 17 MEICS-Score	41

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	<i>Area</i>
Abb.	Abbildung
A/E	<i>attaching and effacing</i>
Ak	Antikörper
As	Aminosäure
APC	<i>antigen presenting cell</i>
Arg1	<i>Arginase 1</i>
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophage</i>
Bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>Crohn's disease</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD11b	Integrin alpha M (ITGAM)
CD11c	Integrin alpha X (ITGAX)
CD45	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
CD80	B7-1
CD86	B7-2
CD163	<i>high affinity scavenger receptor for the hemoglobin-haptoglobin</i>
CD206	<i>mannose receptor C-type 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmkrankheiten
CH	<i>cohouse</i>
Ct	Zyklusschwelle
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	Natrium-Dextransulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor like</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gravitationsbeschleunigung

GF	<i>germ-free</i>
H	<i>Height</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric-oxide synthase</i>
KBE	Koloniebildende Einheit
KO	<i>Knockout</i>
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C</i>
Ly6G	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
LysM	Lysozym 2
M1	klassisch aktiviert; pro-inflammatorisch
M2	alternativ aktiviert; anti-inflammatorisch
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEICS	<i>murine endoscopic score of colitis severity</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHCII	<i>major histocompatibility complex II</i>
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NF _κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	Stickstoffoxid
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline + 0,05 % Tween20</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleid acid</i>
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	<i>separate housing</i>
SPF	<i>specific pathogen-free</i>
SSC	<i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
Tris	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
UC	<i>ulcerative colitis</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VE-H ₂ O	vollentmineralisiertes Wasser
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

1.1. Das intestinale Mikrobiom & Darmimmunität

Das intestinale Mikrobiom ist nicht nur an Verdauung und metabolischen Prozessen beteiligt, sondern beeinflusst auch die Entwicklung des Immunsystems und damit einhergehend die Wirtsreaktion auf Pathogene. Es beherbergt nahezu 100 Billionen verschiedene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen (Nishida *et al.*, 2018). Ein gesundes Mikrobiom zeichnet sich jedoch weniger durch die Anzahl ihrer Mikroorganismen aus, sondern vielmehr durch eine hohe Diversität, insbesondere an protektiven Bakterien. Der Dünndarm repräsentiert hierbei den längsten Teil des Verdauungstraktes und wird hauptsächlich durch bakterielle Phyla wie *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* und *Proteobacteria* besiedelt (Hayashi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2007). Er dient der Nährstoffaufnahme und ist dazu mit zahlreichen Zotten und Krypten ausgekleidet, sodass eine Oberflächenvergrößerung und damit einhergehend eine effizientere Nährstoffaufnahme und Wasserresorption stattfinden kann. Der Dünndarm lässt sich in Zwölffingerdarm (*Duodenum*), Leerdarm (*Jejunum*) und Krummdarm (*Ileum*) unterteilen und reicht vom Pylorus bis zur Ileozäkalklappe am Übergang zum Dickdarm, der sich wiederum aus Blinddarm (*Caecum*) mit Wurmfortsatz (*Appendix*), aufsteigendem Colon (*Colon ascendens*), Quercolon (*Colon transversum*), absteigendem Colon (*Colon descendens*), Sigma (*Colon sigmoideum*), End-/Mastdarm (*Rectum*) und Anus (*Canalis analis*) zusammensetzt (Irving & Catchpole, 1992; Reed & Wickham, 2009; Kimchi *et al.*, 2012). Generell variiert die Komposition des Mikrobioms im Dünndarm zwischen den Individuen mehr als beispielsweise im Colon und somit im Stuhl. Mikroorganismen sind aufgrund der relativ kurzen Verweildauer (im Durchschnitt 255 Minuten) intestinaler Inhalte im Dünndarm in ihrem Populationswachstum begrenzt (Worsøe *et al.*, 2011). Im Colon hingegen haben Mikroorganismen wegen der verhältnismäßig langen Aufenthaltsdauer (ungefähr 35 Stunden) intestinaler Inhalte mehr Zeit zum proliferieren, da die wesentliche Funktion des Colons dem Transport und der Speicherung des Stuhls dient (Metcalf *et al.*, 1987). Das spiegelt sich auch in der mikrobiellen Dichte und Diversität wider, sodass das Colon das meist besiedelte Körperorgan ist (Savage, 1977). Die mikrobielle Komposition des Colons ähnelt der des Dünndarms, jedoch findet sich innerhalb der Phyla eine deutlich höhere Diversität (Hayashi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Zudem lässt sich im Mikrobiom des Colons ein weiteres Phylum finden, die *Verrucomicrobia*, zu denen beispielsweise die Mucin-degradierende Gattung *Akkermansia* gehört (Geerlings *et al.*, 2018). Die Hauptaufgabe des intestinalen Mikrobioms stellt die Konvertierung von endogenen Substraten und Nährstoffsubstraten wie Kohlenhydraten, Proteinen, sekundären Pflanzenmetaboliten und xenobiotischen Verbindungen dar (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Diese Umwandlungen unterstützen auf der einen Seite das Wachstum von

intestinalen Mikroorganismen, indem sie Energie und Metabolite für anabolische Reaktionen bereitstellen (Vernocchi *et al.*, 2020). Auf der anderen Seite können mikrobielle Metabolite die Darmbarriere stärken und das intestinale Immunsystem modulieren. Hierbei können Gattungen wie *Clostridium* (*Firmicutes*) durch die Produktion der kurzkettigen Fettsäure (*short chain fatty acid*-SCFA) Buttersäure zum Beispiel die Polarisierung von Makrophagen in Richtung anti-inflammatorischer Phänotyp unterstützen. Das Anion der dissoziierten Säure, Butyrat, kann dabei als HDAC (*histone deacetylase*)-Inhibitor fungieren und das Inflammasom so regulieren (Schulthess *et al.*, 2019). Innerhalb der *Firmicutes* sind insbesondere die Familien *Ruminococcaceae* und *Lachnospriaceae* (*Clostridia*) in der Lage, komplexere Polysaccharide mittels Fermentation zu SCFAs, vorwiegend Buttersäure, zu degradieren (Cummings *et al.*, 1987; Frost *et al.*, 2014; Venegas *et al.*, 2019; van der Hee & Wells, 2021). Neben den *Firmicutes* können auch Mitglieder des Phylums *Bacteroidetes* verschiedene komplexe pflanzliche Kohlenhydrate fermentativ zu SCFAs degradieren, wobei hier prädominant Milch- und Propionsäure und damit einhergehend Acetat und Propionat entstehen. Generell werden unverdauliche Polysaccharide wie Stärke oder Cellulose, die über die pflanzliche Nahrung aufgenommen wurden, im ersten Schritt der Kohlenhydrataufspaltung durch Enzyme in Oligo- und Monosaccharide depolymerisiert. Im Anschluss können die degradierten Polysaccharide mittels anaerober Gärung (Fermentation) durch intestinale Mikroorganismen zu SCFAs wie Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure umgewandelt werden. Dabei können auch Intermediärprodukte wie Succinat, Laktat oder kurzkettige Alkohole entstehen, die durch eine erneute Fermentation in die jeweiligen Endprodukte umgewandelt werden können (Salyers *et al.*, 1977; Flint *et al.*, 2012). Die Anionen der dazugehörigen organischen Säuren (Formiat, Acetat, Propionat oder Butyrat) können dann über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie zum Beispiel GPR41/43 (Propionat) oder GPR109A (Butyrat) an intestinale Epithel- oder Immunzellen binden und ihre Funktionen modulieren (vgl. Abb. 1). Hierbei kann beispielsweise die Aktivierung von GPR109A in intestinalen Makrophagen und dendritischen Zellen die Expression von pro-inflammatorischen Genen unterdrücken (Singh *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014).

reduktiver oder einfacher Desaminierung oder Descarboxylierung in Endprodukte wie aromatische oder verzweigte Aminosäuren, Methionin, SCFAs, Amine oder andere Produkte umgewandelt werden (Macfarlane *et al.*, 1986). Gallensäuren, die in der Leber aus Glycin-konjugiertem Cholesterin gebildet werden, stellen zwar keine Hauptenergiequelle im Darm dar, können jedoch kommensale Bakterien mit Glycin oder Taurinhalften versorgen und somit als Kohlen- und Stickstoffquelle dienen (Ridlon *et al.*, 2006). Durch die Expansion der metabolischen Kapazität und der Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts kann das intestinale Mikrobiom die Physiologie des Wirts intensiv beeinflussen. Somit ist die Symbiose zwischen Wirt und kommensalen Mikroorganismen für ein gesundes Immunsystem essenziell.

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut-associated lymphoid tissue*-GALT) hat aufgrund der großen Oberfläche der Darmschleimhaut (Mukosa) eine besondere Bedeutung für das Immunsystem. Das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (*mucosa-associated lymphoid tissue*-MALT) beherbergt 70 – 80% aller Immunzellen und kann den Darm so vor dem Eindringen krankheitserregender Substanzen und Mikroorganismen schützen (Weiner, 2000; Cesta, 2006; Vighi *et al.*, 2008). Die Morphologie des GALT setzt sich aus organisierten lymphatischen Strukturen wie mukosalen Lymphfollikeln und den Peyer-Plaques sowie aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen zusammen, die in der *Lamina Propria* (LP) der Mukosa und zwischen Epithelzellen lokalisiert sind (Mowat & Agace, 2014; Mörbke *et al.*, 2021). Die mechanische Barrierefunktion des Darmepithels bildet somit die erste Instanz der Abwehr von Pathogenen. Teil des Darmepithels sind unter anderem Goblet-Zellen, die durch ihre Schleimproduktion eine Mucinschicht bilden können, die zum einen das Epithel vor direktem Kontakt mit potenziellen Pathogenen schützt und zum anderen eine Nährstoffquelle für Mucin-degradierende kommensale Bakterien und Probiotika bieten (Chang *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2011). Neben den Goblet-Zellen können auch sogenannte Paneth-Zellen antimikrobielle Proteine und Peptide wie zum Beispiel Lysozyme und Defensine sezernieren, wodurch sie die lokale Immunabwehr unterstützen (Zaslouff, 2002; Wehkamp *et al.*, 2005; Duerkop *et al.*, 2009). Wenn Pathogene die erste Barriere durchbrochen haben, können diese über die zweite Instanz, den zellulären Teil der angeborenen Immunantwort, abgewehrt werden. Hierbei initiiert der Erstkontakt eines invasiven Bakteriums mit seinem Wirt die Aktivierung von multiplen Signaltransduktionen. Dies kann durch die Erkennung des Bakteriums selbst oder als zelluläre Antwort auf den mikrobiell induzierten Stress geschehen (Mogensen, 2009). Die entscheidenden Moleküle in diesem Prozess sind membrangebundene Oberflächenrezeptoren sowie zytosolische Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*-PRRs), die Pathogen-assoziierte Muster (*pathogen-associated molecular patterns*-PAMPs) oder Zellschaden-assoziierte Muster (*damage-associated*

molecular patterns-DAMPs), die durch Bakterien entstehen, erkennen (Janeway, 1989; Matzinger, 2002; Akira *et al.*, 2006). Der zelluläre Teil der angeborenen Immunantwort setzt sich aus Monozyten/Makrophagen (Ginhoux & Jung, 2014), Granulozyten (Lin & Loré, 2017), dendritischen Zellen (Song *et al.*, 2018) und natürlichen Killerzellen (Vivier *et al.*, 2008) zusammen. Diese Zellen können Pathogene phagozytieren (internalisieren & lysieren) (Uribe-Querol & Rosales, 2020), sie direkt töten und/oder Zytokine oder Chemokine sezernieren (Liu & Cao, 2016). Zytokine und Chemokine sind Botenstoffe, die zur dritten Instanz der Pathogenabwehr (humorale Antwort) gehören und Zellen der adaptiven Immunantwort aktivieren können (Turner *et al.*, 2014). Antigenpräsentierende Zellen (APZ) können hierbei nach Erstkontakt von der aktiven Inflammationsseite in sekundäre lymphatische Organe migrieren und naiven B- und T-Zellen das Antigen präsentieren. Zugleich können Zellen der adaptiven Immunantwort in regionären Lymphknoten durch APZ stimuliert werden, um so eine spezifische Pathogenabwehr auszulösen. Hierbei können B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren, wohingegen T-Zellen Zytokine freisetzen (den Haan *et al.*, 2014). Angeborene und adaptive Immunität gehen demzufolge miteinander einher. Die humoralen Bestandteile der angeborenen Immunantwort implizieren generell verschiedene Plasmaproteine, die in der Gewebsflüssigkeit zirkulieren. Hierzu gehören auch Interleukine, körpereigene Botenstoffe, die den Zytokinen zugeordnet werden, und das Komplementsystem. Letzteres besteht aus einer Gruppe von ca. 30 Plasmaproteinen, zu denen unter anderem Proteasen zählen, die an Mikroorganismen binden und so ihre Zellwände schädigen können oder Anaphylatoxine, die durch ihre vasodilatative Wirkung die Inflammation aktiv unterstützen können (Walport, 2001). Einige Fragmente des Komplementsystems können zudem als Chemokine wirken, die dann wiederum weitere Phagozyten zum Infektionsgeschehen locken (Dunkelberger & Song, 2010).

1.2. Darmimmunität: Phagozyten

Die intestinalen mononuklearen Phagozyten können durch ihre verschiedenen Fähigkeiten zur Aufrechterhaltung der Darm-Homöostase in zahlreiche Untergruppen eingeteilt werden, beispielsweise anhand ihrer Fähigkeit zur Verstärkung oder Abschwächung von T-Zell-Antworten oder der Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker wie CD11b, CD11c, Ly6C, Ly6G oder F4/80 (Varol *et al.*, 2010). Zu den Hauptgruppen der phagozytischen Zellen zählen Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und dendritische Zellen (Nagl *et al.*, 2002; Silva & Correia-Neves, 2012). Diese Zellen gehören der myeloiden Linie an und damit einhergehend zum angeborenen Immunsystem. Die wichtigste Zellpopulation in der Phagozyten-Familie bilden die Makrophagen, die sowohl für die intestinale Homöostase als auch während inflammatorischer Prozesse essenziell sind. Bei der intestinalen Homöostase spielt die Phagozytose (internalisieren und abtöten) von apoptotischen oder gealterten Zellen, die

zum Beispiel beim Gewebeumbau entstehen, aber auch die Säuberung und das Recycling von Erythrozyten durch Makrophagen, eine wichtige Rolle (Kreider *et al.*, 2007). Hierbei können Makrophagen beispielsweise endogene Alarmsignale von nekrotischen Zellen über sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLRs), den Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) (über das Adaptormolekül *myeloid differentiation primary-response gene 88* (MyD88)) und PRRs detektieren (Chen *et al.*, 2007). Granulozyten, zu denen neutrophile, eosinophile und basophile Zellen zählen, bilden die nächste Hauptgruppe der Phagozyten. Innerhalb dieser Gruppe zeigen Neutrophile die stärkste phagozytische Aktivität. Diese Zellen besitzen zudem eine kurze Lebensspanne und finden sich unter Normalbedingungen im zirkulierenden Blut, jedoch nicht im gesunden Gewebe, wieder (Mayadas *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2018). Neutrophile Granulozyten können beispielsweise durch die Ausschüttung des Stresshormons Adrenalin aus dem Nebennierenmark aktiviert werden (Dhabhar *et al.*, 2012; Ince *et al.*, 2019). Dendritische Zellen, die sich in konventionelle (*classical*) dendritische Zellen (cDCs) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) unterteilen lassen, bilden die letzte Hauptgruppe der Phagozyten (Naik *et al.*, 2007). Im Allgemeinen besteht die Hauptaufgabe von dendritischen Zellen in der Antigenpräsentation und damit einhergehend in der Aktivierung von naiven T-Zellen. Hierbei können cDCs Mikroorganismen binden und internalisieren, um so Antigene zu prozessieren, die sie anschließend naiven T-Zellen präsentieren können, um diese letztlich damit zu aktivieren und somit die adaptive Immunantwort induzieren zu können (Sichien *et al.*, 2017). Daneben können cDCs auch Zytokine sezernieren, die andere Abwehrzellen rekrutieren, jedoch sind es vorwiegend pDCs, deren Hauptaufgabe die Produktion von Zytokinen, insbesondere Typ-I-Interferonen, ist (Cella *et al.*, 1999; Theofilopoulos *et al.*, 2005; Villadangos & Young, 2008). Dendritische Zellen können ähnlich wie Makrophagen und Granulozyten, auch Pathogene phagozytieren (Nagl *et al.*, 2002). Generell wird der Vorgang der Phagozytose durch die Erkennung von PAMPs über PRRs induziert und in der Regel sind es Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die in ersten Kontakt mit den invasiven Mikroorganismen kommen (Kantari *et al.*, 2008; Silva, 2010; Silva & Correia-Neves, 2012). Das gebundene Pathogen wird dabei zuerst von der Plasmamembran des Phagozyten umschlossen, um anschließend in ein großes, membranumschlossenes Vesikel (Phagosom) aufgenommen werden zu können. Nach der Phagosom-Aufnahme kann dieses wiederum mit einem oder mehreren Lysosomen fusionieren. Das dabei gebildete Phagolysosom kann daraufhin, durch die Freisetzung von lysosomalen Inhaltsstoffen, mit dem Abbau des Pathogens beginnen (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Zu den wichtigsten PRRs gehören der Mannoserezeptor (ein C-Typ-Lektin) und die *Scavenger*-Rezeptoren (trimere integrale Membran-Glykoproteine). Sie werden prädominant von Makrophagen exprimiert. Der Mannoserezeptor (MR) kann verschiedene mannolysierte Liganden, die auf Pilzen, Viren und Bakterien vorkommen, erkennen (Fraser & Ezekowitz, 1999) und der *Scavenger*-Rezeptor (SR) kann

verschiedene modifizierte Lipoproteine, Lipide sowie Zelldetritus binden (Platt *et al.*, 1999). Makrophagen sowie ihre MRs und SRs spielen somit bei der Immunabwehr von Mikroorganismen eine entscheidende Rolle.

1.2.1. Intestinale Makrophagen

Intestinale Makrophagen bilden den größten Makrophagen-Pool im menschlichen Körper und sind die häufigsten mononuklearen Phagozyten in der LP (Wang *et al.*, 2019). Als Wachposten in der Gewebemöostase sowie Pathogenerkennung und -eliminierung spielen sie eine entscheidende Rolle. Zu ihren wichtigsten Eigenschaften gehört die Modellierung der Wirt-Mikrobiom-Symbiose, die Steuerung von inflammatorischen Prozessen, die Interaktion mit T-Zellen und die Förderung der Wundheilung (vgl. Abb. 2).

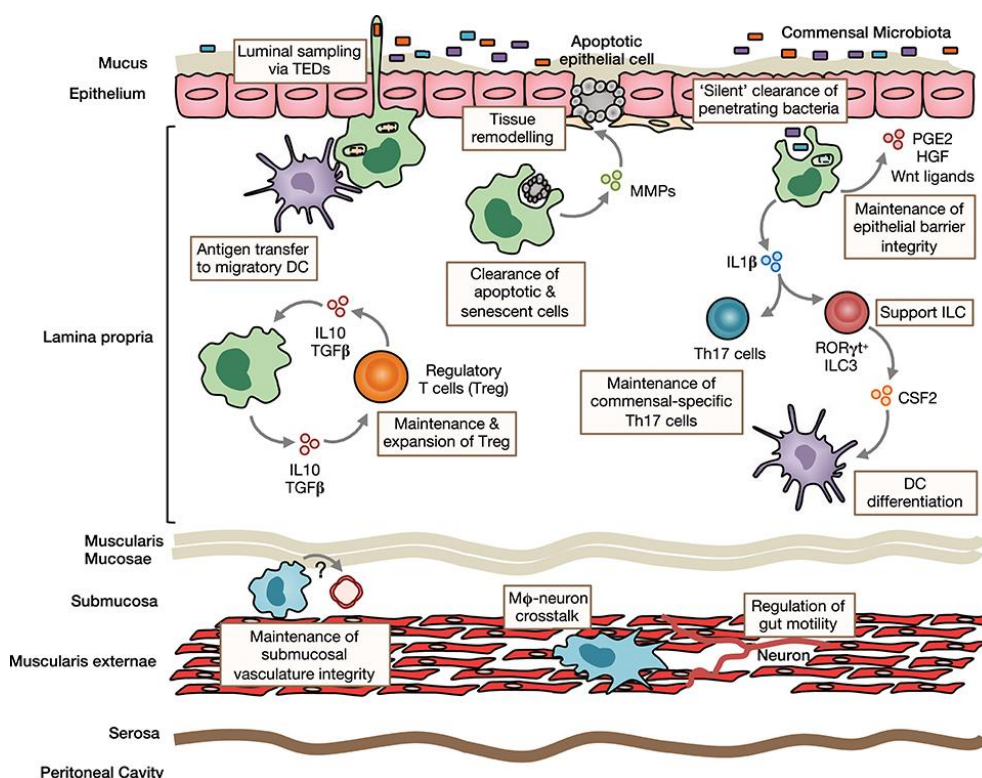


Abb. 2 | Funktionen von intestinalen Makrophagen. Intestinale LP-Makrophagen gehören zu den am stärksten phagozytisch aktiven Zellen und sind für die Beseitigung von zerstörten, apoptotischen und gealterten Epithelzellen verantwortlich. Durch die Expression von Metalloproteinasen, die für den Gewebeumbau verantwortlich sind, sowie von Faktoren, die die epitheliale Stammzellerneuerung stimulieren, wie zum Beispiel Prostaglandin E2 (PGE2) und verschiedenen anderen Wachstumsfaktoren, kann die Barriereintegrität des Epithels gestärkt werden. LP-Makrophagen sind durch ihre Position unmittelbar unter der Epithelschicht und ihre bakterizide Aktivität prädestiniert, um Bakterien, die die epitheliale Barriere durchbrechen, einzufangen und zu zerstören. Makrophagen können bereits akquirierte Antigene für die T-Zell-Antigen-Präsentation an bereits migrierte dendritische Zellen (DCs) transferieren. Durch die Produktion von immunoregulatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-10 und TGF-β (*transforming growth factor beta*), ermöglichen sie die sekundäre Expansion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in die LP. In ähnlicher Weise können sie durch die Produktion von IL-1β, die durch die mikrobielle Exposition induziert wird, Th17-Zellen und ILC3s (*innate lymphoid cell 3*) unterstützen. Makrophagen sind auch in tieferen Schichten der Darmwand lokalisiert, inklusive der Submukosa und der *Muskularis externae*. Makrophagen der Submukosa können die Integrität der submukosalen Vaskulargefäße unterstützen und muskuläre Makrophagen können in bidirektionale Interaktionen mit sympathischen Neuronen des gesamten Nervensystems involviert sein (Bain & Schridde, 2018).

Das intestinale Immunsystem muss aufgrund der hohen Abundanz von Mikroorganismen konstant die Balance zwischen kommensalen Bakterien und potenziellen Pathogenen

sicherstellen, um unnötige Immunreaktionen gegen nicht-offensive Bakterien zu vermeiden. Makrophagen besitzen hierbei die besondere Fähigkeit, zwischen harmlosen Antigenen und potenziellen Pathogenen diskriminieren zu können (Smith *et al.*, 2011). Sowohl Nährstoffe als auch das Mikrobiom selbst besitzen zudem die Fähigkeit, das Profil von intestinalen Makrophagen modifizieren zu können, indem sie ihre Funktionen zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase *primen* (Kang *et al.*, 2020). Intestinale Makrophagen unterscheiden sich in ihren Funktionen und ihrem Phänotyp von anderen Makrophagen-Populationen im Körper intensiv, da sie kontinuierlich auf inflammatorische Stimuli reagieren müssen (Bain & Schridde, 2018). Dies involviert beispielsweise die Abwesenheit von pro-inflammatorischen Zytokinen, weshalb angenommen wird, dass residente Makrophagen im Darm unter Normalbedingungen einen anti-inflammatorischen Phänotyp besitzen (Denning *et al.*, 2007; Platt *et al.*, 2010). Dieser anti-inflammatorische Phänotyp lässt sich durch ein bestimmtes Zytokinprofil sowie spezieller Marker als auch durch seinen Metabolismus selbst charakterisieren und unterscheidet sich dadurch von einem pro-inflammatorischen Phänotyp (vgl. Abb. 3).

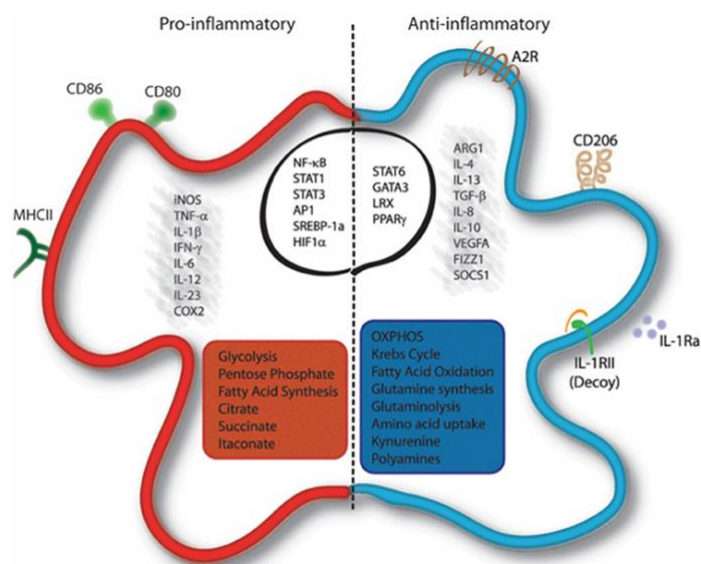


Abb. 3 | Molekulare und metabolische Signatur der Makrophagenaktivierung. Pro-inflammatorische Stimuli induzieren die Aktivierung spezifischer Signalwege durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), STAT1/3 (*signal transducers and activators of transcription 1/3*), AP-1 (*activating protein 1*), SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein 1*) und HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*), die wiederum die Expression von Markern wie iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), COX-2 (*cyclooxygenase-2*), CD80/86 und MHCII (*major histocompatibility complex class II*) triggern und die Freisetzung von IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12 und IL-23 induzieren. Zellen durchleben eine metabolische Umprogrammierung in Richtung Glykolyse, Pentose-Phosphat-Signalweg und Fettsäure Synthese. Dies wird mit einer Störung des Krebszyklus, der Entstehung von ROS (*reactive oxygen species*) und dem Efflux von Citrat, der der Synthese von NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) und PGE2 (*prostaglandin E2*) fördert, sowie Succinat, das HIF-1 α stabilisiert, assoziiert. Anti-inflammatorische Makrophagen werden durch die Expressionen von ARG1 (*arginase 1*), IL-10, IL-4, IL-13, IL-18, IL-1Ra und VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) charakterisiert. Ihr Profil wird hauptsächlich durch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie STAT6, GATA3 (*GATA-binding factor 3*), PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) und LRX (*leucine-rich repeat extension*) kontrolliert. Auf metabolischer Ebene zeigen diese Makrophagen einen erhöhten OXPHOS (*oxidative phosphorylation*) Metabolismus, eine verstärkte Fettsäure-Oxidation und Glutaminolyse sowie einen erhöhten Tryptophan-Katabolismus mit Freisetzung von Kynurenin und Polyaminsynthese (Viola *et al.*, 2019).

Generell lassen sich Makrophagen anhand ihres immunologischen Funktionsspektrums, basierend auf verschiedenen homöostatischen Aktivitäten, in drei Gruppen unterteilen: Wirtsabwehr, Wundheilung und Immunregulierung (Kreider *et al.*, 2007). Die Wirtsabwehr wird vorwiegend durch eine Makrophagenpopulation gesteuert, die durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ (freigesetzt u. a. durch andere Makrophagen, NK- oder Th1-Zellen) oder durch Wechselwirkungen mit Mikroorganismen selbst, beziehungsweise ihrer Metabolite, aktiviert wird und dadurch eine verstärkte mikrobizide und tumorizide Wirkung zeigt (Kawakami *et al.*, 1996; O'Shea & Murray, 2008; Chiaranunt *et al.*, 2021). Dieser pro-inflammatorische Phänotyp kann sich unter anderem durch eine verstärkte Produktion von TNF- α charakterisieren lassen (Gillett *et al.*, 2010; Delprat *et al.*, 2020). Pro-inflammatorische Zytokine und antimikrobielle reaktive Sauerstoff (*reactive oxygen species*-ROS)- und Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*-RNS) stellen einen wichtigen Teil der Wirtsabwehr dar, können auf der anderen Seite im Wirt selbst auch erhebliche Schäden verursachen (Iovine *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2014; Herb & Schramm, 2021). Die Makrophagenpopulation, die in Wundheilungsprozesse involviert ist, also die Proliferation von Zellen und die Gewebeneubildung stimulieren kann, lässt sich durch ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- β (*transforming growth factor beta*), EGFs (*epidermal growth factors*), VEGFs (*vascular endothelial growth factors*) und PDGFs (*platelet-derived growth factors*) charakterisieren (Mosser & Edwards, 2008; Wynn & Vannella, 2016). Die Anwesenheit dieser Zellpopulation ist für alle Phasen der Wundheilung essenziell. Ähnlich wie bei Makrophagen der Wirtsabwehr, können Wundheilungs-Makrophagen durch angeborene oder adaptive Signale aktiviert werden (Anthony *et al.*, 2007; Kim & Nair, 2019). Eines der ersten Signale, das beispielsweise durch basophile Granulozyten während Gewebeverletzungen freigesetzt wird, ist IL-4 (Loke *et al.*, 2007). In Ergänzung dazu können basophile Granulozyten nach Kontakt mit Chitin, einem strukturellen Polymer, das sich in Pilzen und Parasiten finden lässt, auch IL-4 produzieren (Reese *et al.*, 2007). Hierbei kann IL-4 die Arginase-Aktivität in Makrophagen stimulieren, die dazu führt, dass Arginin zu Ornithin, einem Vorläufermolekül von Polyaminen und Kollagen, umgewandelt wird, die die Bildung einer extrazellulären Matrix unterstützt (Kreider *et al.*, 2007). IL-4 kann zudem auch von Zellen der adaptiven Immunantwort, den Th2-Zellen, sezerniert werden. Dieser Signalweg wird hauptsächlich durch Störungen an der mukosalen Oberfläche induziert (Reese *et al.*, 2007). Demzufolge konvertiert der Kontakt mit IL-4 naive Makrophagen in eine Population, die dazu programmiert ist, Wundheilungsprozesse zu unterstützen. Makrophagen, die beispielsweise *in vitro* mit IL-4 behandelt wurden, produzieren kaum pro-inflammatorische Zytokine und scheitern zudem in der Antigenpräsentation (Edwards *et al.*, 2006). Immunregulatorische Makrophagen (Mregs) lassen sich durch eine verstärkte Produktion von IL-10 und TGF- β charakterisieren (Fadok *et al.*, 1998;

Huang *et al.*, 2006) und sind somit auch dem anti-inflammatorischen Phänotyp zuzuordnen (Manjili *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Wundheilungs-Makrophagen verstärken Mregs nicht die Produktion einer extrazellulären Matrix und exprimieren wie pro-inflammatorische Makrophagen zum Teil auch größere Mengen an den co-stimulierenden Molekülen CD80 und CD86, wodurch sie die Fähigkeit besitzen, T-Zellen Antigene zu präsentieren (Edwards *et al.*, 2006). Mregs können zudem durch Signale der angeborenen und adaptiven Immunantwort sowie durch Glukokortikoide, die als Reaktion auf Stress über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde- (*hypothalamic-pituitary-adrenal*-HPA)-Achse ausgeschüttet werden können, aktiviert werden (Desgeorges *et al.*, 2019). Infolge der Aktivierung über die HPA-Achse kann so beispielsweise die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 durch Makrophagen gesenkt werden (Yawalkar *et al.*, 2000; Quatrini & Ugolini, 2021). Daneben können Mregs auch als Wirt für Parasiten, Bakterien und Viren fungieren. Pathogene können dabei an wirtseigenes Immunglobulin G (IgG) binden oder Immunkomplexe bilden, was ihnen über den Fc Rezeptor für IgG (FcγR) den Eintritt in die Makrophagen ermöglicht. Die damit verbundene Aktivierung einer *downstream* Signalkaskade induziert die Aktivierung von Mregs und erlaubt intrazelluläres Wachstum (Miles *et al.*, 2005). Insgesamt besteht die Hauptaufgabe von intestinalen Makrophagen jedoch nicht in der Rolle als Effektorzelle, sondern vielmehr fungieren diese als eine Art Hausmeister, die die interstitielle Umgebung von irrelevantem Zellmaterial säubern und somit die intestinale Homöostase aufrechterhalten (Mosser & Edwards, 2008).

1.3. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Eine Fehlregulierung des angeborenen Immunsystems und damit einhergehende intestinale Dysbiose wird unter anderem mit der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) assoziiert (Carding *et al.*, 2015). Die Prävalenzen für CED steigen hierbei global an. In der westlichen Welt, auch in Deutschland, stellen CED daher ein großes Problem dar (Burisch *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2017). CED können die Lebensqualität der Patient:innen beeinflussen, jedoch nicht ihre Lebenslänge. Hierbei differenzieren Mortalitätsraten der Normalbevölkerung nicht von denen der CED-Patient:innen. Daneben scheinen auch die Prävalenzen zwischen Geschlechtern und Schüben in jungen Erwachsenen ähnlich zu sein. Die höchsten Inzidenzen wurden bisher in Nordeuropa (12 - 19/ 100000 Einwohner/ Jahr) und Nordamerika (5 - 29/ 100000 Einwohner/ Jahr) verzeichnet. Somit sind schätzungsweise 1,4 Millionen Amerikaner:innen und 2,2 Millionen Europäer:innen von CED betroffen (Loftus, 2004; Ananthakrishnan, 2015). Weiterhin scheinen Prävalenzen auch von der ethnischen Zugehörigkeit abzuhängen, denn Kaukasier:innen und Afroamerikaner:innen sind im Vergleich zu Lateinamerikaner:innen und Asiat:innen deutlich häufiger von CED betroffen (Nguyen *et al.*, 2006).

CED werden durch eine chronische Inflammation des Gastrointestinaltraktes charakterisiert und implizieren klinische Krankheitsbilder wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Entzündung der intestinalen Mukosa bereitet den Patient:innen schubweise abdominale Schmerzen, Diarrhö, blutigen Stuhl und kann damit einhergehend auch in einem Gewichtsverlust resultieren. Die mukosale Inflammation wird dabei durch den Influx von pro-inflammatorischen Effektorzellen wie Neutrophilen und Makrophagen verursacht, die durch die Produktion von Zytokinen, proteolytischen Enzymen und freien Radikalen eine Entzündungsreaktion hervorrufen und in einer Ulzeration resultieren können (Guan & Zhang, 2017; Guan, 2019). Die Pathogenese der CED ist komplex und involviert genetische Faktoren, Umweltaspekte und Veränderungen in der immunologischen Konstitution (Zhang & Li, 2014). Daneben spielt die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion (Qiu *et al.*, 2022).

Die niedrigen Inzidenzen in Asien und Afrika im Vergleich zu Europa und Nordamerika reflektieren sowohl genetische Faktoren als auch Umweltaspekte. Hierbei scheint die Hygienehypothese von entscheidender Bedeutung zu sein, da das Fehlen einer frühen mikrobiellen Exposition aufgrund strenger Hygiene mit erhöhten Inzidenzen zahlreicher Autoimmunerkrankungen einherzugehen scheint (Gent *et al.*, 1994). Weiterhin spielen Ernährung, die mikrobielle Komposition des Darms und auch das Rauchen wichtige Rollen in der Suszeptibilität und Pathogenese von CED (Lakatos *et al.*, 2007; Matricon *et al.*, 2010). Es wurde bereits gezeigt, dass die Komposition des Mikrobioms in CED-Patient:innen gegenüber gesunden Menschen alterniert: verminderte Biodiversität, Zunahme an Pathobionten und mukolytischer sowie Sulfat-reduzierender Bakterien und Abnahme an Probiotanten sowie SCFA-produzierender Bakterien (Nishida *et al.*, 2018). Diese intestinale Dysbiose wird mit unterschiedlichen pro-inflammatorischen Veränderungen bei CED-Patient:innen assoziiert (Liu *et al.*, 2021). Einerseits wird die Dysbiose des Mikrobioms durch epitheliale Schäden, die aus einer gestörten Mukusproduktion und defekten Reparaturmechanismen resultieren, charakterisiert (vgl. Abb. 4), andererseits durch eine krankhafte Entzündungsreaktion, die durch kommensale Antigene und *Lamina propria* infiltrierende Immunzellen wie beispielsweise T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten verursacht wird (Guan, 2019). Diese aktivierten Effektorzellen produzieren dabei große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-1 β , IFN- γ und Zytokine des IL-23/TH17-Signalwegs) (Choy *et al.*, 2017). Zusätzlich scheint der genetische Hintergrund neben dem Mikrobiom und der ethnischen Zugehörigkeit eine starke Komponente in der Entwicklung von CED zu sein. So zeigen monozygote Zwillinge eine signifikant höhere Übereinstimmungsrate für M. Crohn (50 - 58 % gegen 0 - 12 %) und Colitis ulcerosa (6 - 14 % gegen 0 - 5 %) im Vergleich zu heterozygoten Zwillingen

(Binder, 1998). Populationsbasierte Studien zeigen zudem, dass 5 - 10 % der Patient:innen einen Verwandten ersten Grades mit CED besitzen (Binder & Orholm, 1996). Daneben werden Polymorphismen der Gene *Nod2* (Hugot *et al.*, 2001), *Atg1611* (Hampe *et al.*, 2007), *Irgm* (Parkes *et al.*, 2007), *Il23r* (Nguyen *et al.*, 2006), *Il12b*, *Stat3* und *Nkx2-3* mit M. Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert (Franke *et al.*, 2008).

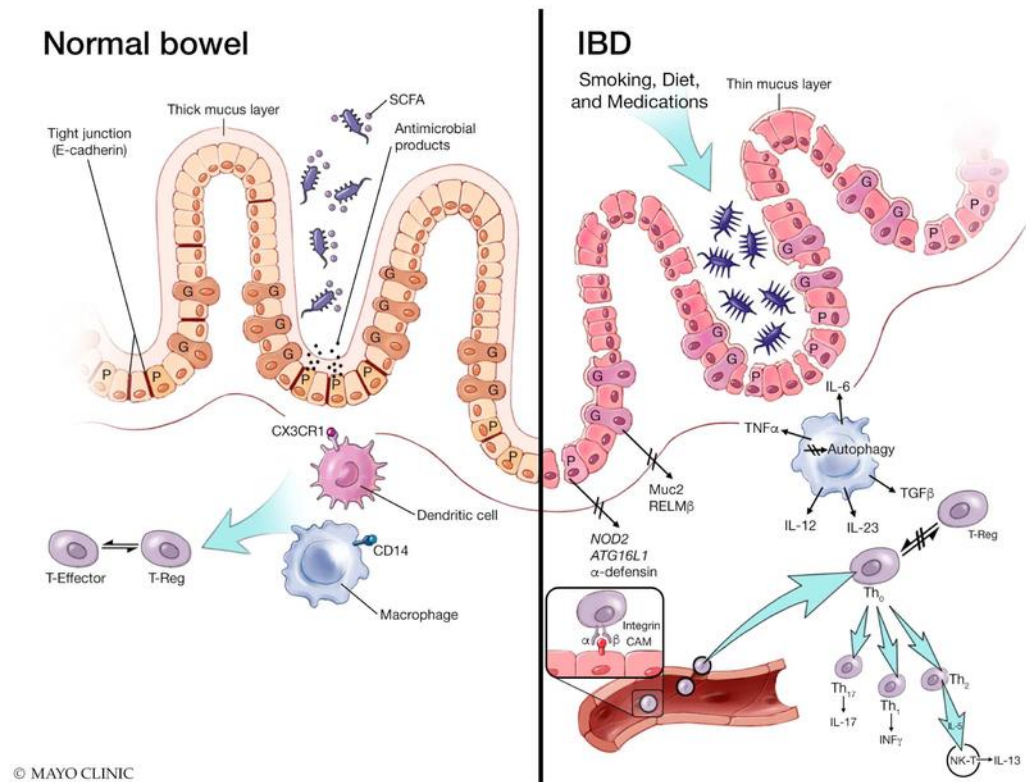


Abb. 4 | Die intestinale Mukosa im gesunden Darm und in CED. Die Exposition von verschiedenen Umwelteinflüssen kann in CED-Patient:innen (rechts) zur Entwicklung einer mikrobiellen Dysbiose führen und damit einhergehend zu einer verringerten Abundanz an Bakterien, die SCFAs produzieren und zu einer erhöhten Abundanz an Proteobakterien. Es folgt die Disruption von Mechanismen, die die intestinale Barriereintegrität aufrechterhalten: Herunterregulierung von epithelalem Cadherin (E-cadherin) in *tight junctions*, Reduktion der Mucinschicht, fehlerhafte Goblet-Zell-Funktion, dysfunktionale Paneth-Zell-assoziierte Mechanismen inklusive der Sezernierung antimikrobieller Produkte und *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (Nod2)* sowie *autophagy-related 16-like 1 (Atg1611)* Gen-assoziierte Funktionen. Auf der Ebene der angeborenen Immunantwort zeigt sich bei CED eine Abnahme an intestinalen Makrophagen, eine verringerte Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und Autophagie. Trotz mukosaler Leukozyten-Infiltrierung mittels *integrin cellular adhesion molecule (CAM)*, wie sie auch in der gesunden Mukosa auftritt (links), kann das Gleichgewicht an Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen in der CED-Mukosa nicht aufrechterhalten werden, sodass es zu einer unkontrollierten Aktivierung von T-Zellen kommt, die anschließend in den entzündeten Darm migrieren (Ramos & Papadakis, 2019).

1.3.1. Morbus Crohn

Morbus Crohn umfasst üblicherweise mehrere Entzündungsherde, die den gesamten Gastrointestinaltrakt (Mund bis Anus) betreffen können. Die histologischen Untersuchungen dieser Patient:innen zeigen in der Regel eine transmurale Inflammation, die sich durch sogenannte *skip* Läsionen charakterisieren lassen (Stange *et al.*, 2006; Cheifetz, 2013). Dieses markante Kennzeichen ist jedoch nur bei einigen wenigen Patient:innen präsent (Stange *et al.*, 2006). Die am häufigsten betroffene Region umfasst das Ileocolon gefolgt von Colon und Dünndarm. Die Leitsymptome von M. Crohn setzen

sich aus abdominalem Schmerz (86 %), Diarrhö (78 %) und blutigem Stuhl (49 %) zusammen, wobei jüngere Patient:innen mit Unterernährung, Kleinwüchsigkeit, verspäteter Pubertät, Fatigue oder manchmal sogar der Fistelkrankheit fehldiagnostiziert werden können (Stange *et al.*, 2006). Fisteln treten bei M. Crohn-Patient:innen häufig in gastrointestinalen Regionen auf, die von Ulzerationen betroffen sind oder teilweise in anderen Organen sowie in Hautnähe (Gecse *et al.*, 2013). Aus diesem Grund haben Patient:innen mit M. Crohn ein erhöhtes Risiko für Strikturen oder Obstruktionen im Dünndarm oder Colon, die über eine Darmperforation zur Peritonitis führen können (Griffiths, 2004; Vernier-Massouille *et al.*, 2008).

1.3.2. Colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa kann ebenso Symptome wie Diarrhö, abdominale Krämpfe und blutigen Stuhl hervorrufen. Aufgrund der hohen Präsenz von blutigem Stuhl kann es passieren, dass Colitis ulcerosa auch als früher M. Crohn diagnostiziert wird. Entzündungsreaktionen im Darm von Patient:innen mit Colitis ulcerosa beschränken sich im Gegensatz zu Patient:innen mit M. Crohn auf das Colon, begrenzt durch die mukosale Schicht und ohne *skip* Läsionen (Danese & Fiocchi, 2011). Nichtsdestotrotz können die Patient:innen auch eine Gastritis oder distale Colitis entwickeln. Außerhalb des Gastrointestinaltraktes kann sich Colitis ulcerosa durch einen markanten Gewichtsverlust, Unterernährung und einem verspäteten Pubertätseintritt manifestieren, wobei diese Begleitsymptome für gewöhnlich selten beobachtet werden (Collins & Rhodes, 2006). Anämie und Hypoalbuminämie treten meist sowohl bei Patient:innen mit Colitis ulcerosa als auch mit M. Crohn auf. Andere inflammatorische Marker wie die Sedimentationsrate und das C-reaktive Protein können bei C. ulcerosa-Patient:innen im Normalbereich sein, wohingegen diese Parameter bei Patient:innen mit M. Crohn meistens erhöht sind (Griffiths, 2004; Van Limbergen *et al.*, 2008; Sauer & Kugathasan, 2010).

Für die CED-Pathogenese sind zudem zahlreiche Wachstumshormone und -faktoren wegen ihrer trophischen Effekte auf Epithelzellen von zentraler Bedeutung (Theiss *et al.*, 2004). Wachstumsfaktoren können in diesem Kontext mukosale Integrität sowie die Erneuerung und Reparatur von Epithelzellen vermitteln (Playford & Ghosh, 2008). Daneben können Wachstumsfaktoren die Wundheilung von mesenchymalen Geweben verbessern und über intestinale Immunzellen inflammatorische Prozesse modulieren (Theiss *et al.*, 2004; Playford & Ghosh, 2008). Damit einhergehend scheinen Mitglieder der EGF-, FGF (*fibroblast growth factor*)-, HGF (*hepatocyte growth factor*)-, PDGF- und VEGF-Familien eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED zu spielen (Beck & Podolsky, 1999).

1.4. *Platelet-derived growth factor* (PDGF)

Der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) wurde in den 70iger Jahren erstmals als ein von Thrombozyten abstammender Faktor beschrieben, der die Proliferation von mesenchymalen Zellen stimuliert (Ross *et al.*, 1974). Zahlreiche Studien von PDGFs/PDGFRs im Mausmodell konnten seitdem weitere wichtige Funktionen als parakrine Wachstumsfaktoren in Signaltransduktion, Physiologie und Pathophysiologie identifizieren. Zusammen mit VEGFs bilden PDGFs aufgrund ihrer konservierten PDGF/VEGF-Homologie-Domäne die PVF-Familie (Salven *et al.*, 1998).

1.4.1. PDGF-Isoformen

Es sind bisher vier PDGF-Monomere bekannt (PDGF-A, -B, -C und -D), die untereinander, über Disulfidbrücken, fünf kationische homo- und heterologe Biopolymere (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC und -DD) bilden können (vgl. Abb. 5). Die klassischen PDGFs setzen sich aus A- und B-Polypeptidketten zusammen. Diese bestehen aus zirka 100 Aminosäuren (As), die eine ungefähre Übereinstimmung von 60 % in ihrer As-Sequenz aufweisen (Weller *et al.*, 1991; Heldin & Westermark, 1999). Die PDGF-Polypeptidketten teilen zudem acht konservierte Cystein-Reste, wobei zwei dieser Reste (der zweite und der vierte) kovalente Bindungen (zwischen den zwei A- und B-Untereinheiten der PDGF-Dimere) eingehen und die anderen sechs Reste intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Haniu *et al.*, 1993; Haniu *et al.*, 1994). Mutationen in diesen intramolekularen Disulfidbrücken können die biologische Aktivität von PDGFs jedoch nicht verändern (Andersson *et al.*, 1992; Kenney *et al.*, 1994), da diese trotz Mutation weiterhin als Dimere erscheinen (Prestrelski *et al.*, 1994). Die A- und B-Ketten der PDGFs entstehen durch proteolytische Prozessierung am NH₂-Terminus beider Monomere und am COOH-Terminus der B-Kette aus Vorläufermolekülen (Westermark & Institutet, 1992). Die Freisetzung der aktiven Formen (PDGF-AA, -AB und -BB) erfolgt mittels Exozytose und kann durch externe Stimuli wie beispielsweise einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (Kourembanas *et al.*, 1997), Thrombin (Daniel *et al.*, 1986) oder die Stimulation mit anderen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen (Betsholtz *et al.*, 1986) verstärkt werden.

Neben den klassischen PDGFs ergänzen seit einigen Jahren PDGF-C und PDGF-D die PVF-Familie als Gruppe der neu entdeckten Liganden. Hierbei besteht PDGF-C aus 345 As und PDGF-D aus 370 As (Li & Eriksson, 2003). Die beiden Isoformen teilen eine ungefähre Homologie von 45 % in ihrer As-Sequenz und besitzen jeweils eine CUB-Domäne (=complement C1r/C1s, Uegf und Bmp1), die am N-Terminus beider Ketten lokalisiert ist (Bork & Beckmann, 1993). Die Freisetzung von PDGF-C und -D erfolgt inaktiv, über die Proteolyse der CUB-Domäne mittels extrazellulärer Proteasen (Larochelle *et al.*, 2001; Gilbertson *et al.*, 2001). Sowohl die neuartige CUB-Domänen-Struktur als auch die Notwendigkeit einer proteolytischen Spaltung durch extrazelluläre Proteasen

verdeutlichen die einzigartigen Unterschiede der neuen PDGFs gegenüber den klassischen.

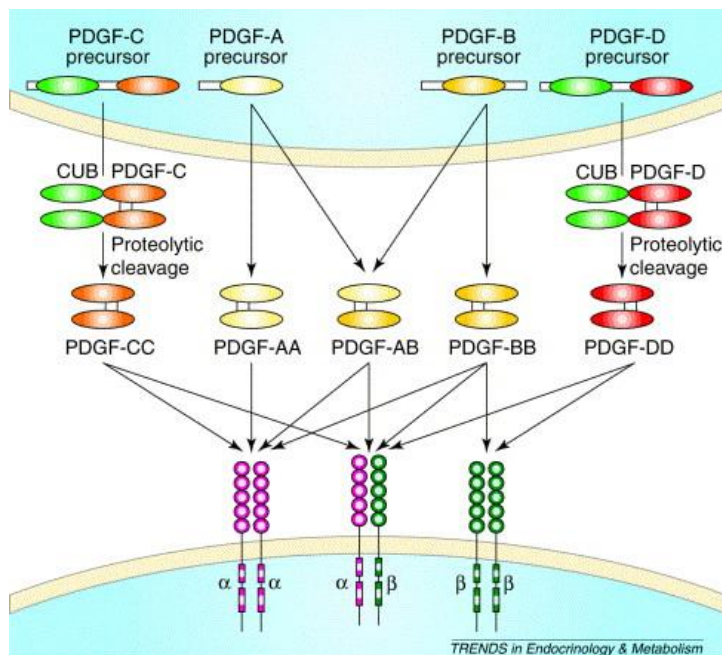


Abb. 5 | Schematische Darstellung der PDGF-Liganden und PDGFR-Isoformen und ihrer Bindungsmuster. A- und B-Ketten können aus Vorläufermolekülen durch proteolytische Spaltung generiert werden. PDGF-C und -D besitzen eine CUB-Domäne, die nach der Sezernierung übrigbleibt. Die extrazelluläre proteolytische Abspaltung der CUB-Domäne von den PDGF-Dimeren ist Voraussetzung, um den Rezeptor zu binden. Hierbei können die verschiedenen Isoformen an die dimerisierten α - und β -Rezeptoren binden. Der extrazelluläre Teil besitzt fünf Ig-ähnliche Domänen. PDGF-Liganden können an die drei äußeren Ig-ähnlichen Domänen binden, während die vierte Domäne in direkte Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen involviert ist. Die intrazellulären Rezeptorteile beinhalten die Tyrosinkinase (Mariani *et al.*, 2002).

1.4.2. PDGF-Rezeptoren

PDGFs vermitteln ihre Effekte auf Zielzellen über die Aktivierung von strukturell verwandten Tyrosinkinase-Rezeptoren (vgl. Abb. 5). Die α - und β -Rezeptoren besitzen eine molekulare Größe von zirka 170 und 180 kDa und bestehen aus jeweils fünf extrazellulären immunglobulinartigen (Ig) Domänen am N-Terminus sowie einer zytosolischen Tyrosinkinase-Domäne am C-Terminus (Yarden *et al.*, 1986; Matsui *et al.*, 1989). Die Strukturen der beiden Rezeptoren ähneln der des *colony stimulating factor-1* (CSF-1) (Coussens *et al.*, 1986) und des *stem cell factor* (SCF) Rezeptors (Xu & Clark, 1996). Da PDGF-Isoformen aus je zwei Polypeptidketten bestehen, können diese simultan beide Rezeptoren binden und dadurch dimerisieren (Bishayee *et al.*, 1989; Heldin *et al.*, 1989; Seifert *et al.*, 1989). Die PDGF-Rezeptoren können als homo- oder heterodimere Rezeptorkomplexe vorliegen, wobei die Bindungsmuster ihrer Liganden sich unterscheiden. Der α -Rezeptor kann alle bisher bekannten PDGF-Liganden mit Ausnahme von PDGF-DD binden, wohingegen der heterodimere $\alpha\beta$ -Rezeptor PDGF-BB, -AB und -CC binden kann (Hammacher *et al.*, 1988; Kanakaraj *et al.*, 1991; Seifert *et al.*, 1989; Gilbertson *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002). Zudem gibt es Hinweise auf eine Aktivierung von $\alpha\beta$ -PDGFR durch PDGF-DD (Larochelle *et al.*, 2001). Der β -Rezeptor kann durch die

Bindung von PDGF-BB und -DD aktiviert werden (Seifert *et al.*, 1989; Bergsten *et al.*, 2001). Die ligandenbindenden Domänen der PDGFRs sind auf den äußersten drei Ig-artigen Domänen lokalisiert (Heidaran *et al.*, 1990). Über eine veränderte Position der beiden Rezeptorteile zueinander wird eine Aktivierung der Tyrosinkinase möglich, wobei sich der Rezeptorkomplex durch diese direkte Rezeptor-Rezeptor-Interaktion der jeweiligen Ig-Domäne 4 zusätzlich stabilisiert (Lokker *et al.*, 1997; Omura *et al.*, 1997; Shulman *et al.*, 1997). Für die Bindung der Liganden scheint die Ig-Domäne 2 von größter Bedeutung zu sein (Miyazawa *et al.*, 1998).

1.4.3. PDGF-Signalwege

Die Stimulierung von PDGFRs durch PDGFs und die damit verbundene Induktion der Homo- und Heterodimerisierung resultiert in der Autophosphorylierung des Rezeptors, die wiederum eine Signaltransduktion induziert. In Abwesenheit der Liganden werden die Rezeptoren durch drei verschiedene Mechanismen, die einen Aktivierungsloop, eine Juxtamembran-Domäne und den C-Terminus involvieren, autoinhibiert und inaktiviert (Chiara *et al.*, 2004). Direkt nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt die Rezeptor-Dimerisierung, wobei sich seine Konformation ändert. Dadurch entfallen autoinhibitorische Prozesse und die Auto- und Kreuzphosphorylierung bestimmter Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptor-Domäne erfolgt (Kazlauskas & Cooper, 1989). Diese Autophosphorylierungsseiten (PDGFR- α besitzt 10 und PDGFR- β besitzt 11), die außerhalb der Kinase-Domäne liegen, fungieren nach Phosphorylierung als Andockstellen für Signaltransduktionsmoleküle, die eine SH2 (*Src homology 2*)-Domäne enthalten (Pawson & Scott, 1997), und induzieren durch ihre Aktivierung verschiedene *downstream* Signaltransduktionswege, die wiederum in spezifischen zellulären Antworten resultieren können (Heldin & Lennartsson, 2013).

Bis heute ist eine große Anzahl an SH2-Domäne-Proteinen bekannt, die sowohl PDGFR- α als auch PDGFR- β binden können. Einige dieser Moleküle sind selbst Enzyme wie Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI 3-kinase), Phospholipase C (PLC)- γ , die Src-Familie der Tyrosinkinase, die Tyrosinphosphatase SHP-2 und ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Ras (*rat sarcoma*). Andere Moleküle wie Grb2/7 (*growth factor receptor-bound protein 2/7*), Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*), Shc (*SHC-transforming protein*) und Crk besitzen keine enzymatische Aktivität, fungieren jedoch als Adaptorproteine, durch welche die Rezeptoren mit katalytischen *downstream* Molekülen verbunden werden. Weiterhin können auch Mitglieder der STAT-Familie an PDGFRs binden. Diese Transkriptionsfaktoren dimerisieren nach Phosphorylierung an Tyrosin und translokalisieren anschließend in den Nukleus, wo sie die Transkription spezifischer Gene beeinflussen (Heldin & Westermark, 1999). Jedes SH2-Domäne-Molekül, das an PDGFR bindet, kann hierbei eine Signaltransduktionskaskade induzieren (Heldin *et al.*, 1998).

Die sieben Mitglieder der STAT-Familie (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a und -b und STAT6) können an die PDGF-stimulierten, aktivierten PDGFRs binden, um anschließend am Tyrosin phosphoryliert zu werden (Patel *et al.*, 1996; Vignais *et al.*, 1996; Valgeirsdóttir *et al.*, 1998). Nach erfolgter Phosphorylierung dimerisieren und translokalisieren STATs in den Nukleus, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren können. STAT-Moleküle sind beispielsweise für die *downstream* Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren von wichtiger Bedeutung. Daneben vermitteln sie viele Aspekte der zellulären Immunität, Proliferation, Apoptose und Differenzierung (Darnell, 1997). Hierbei kann etwa der STAT6-Signalweg die Entwicklung von Typ 2 T-Helfer-Zellen beeinflussen und somit die Th2-Immunantwort induzieren (Walford & Doherty, 2013). Dies involviert vor allem die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 (Goenka & Kaplan, 2011). Die Aktivierung des STAT6-Signalwegs ist deshalb auch für die Aktivierung von anti-inflammatorischen Makrophagen notwendig (Czimmerer *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019).

1.4.4. Die Rolle von PDGF/PDGFR in Physiologie und Pathogenese

Die Mitglieder der Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie sind schon früh meist auf para- und autokrinem Weg an der Differenzierung und Proliferation in unterschiedlichen Geweben beteiligt. Hierbei fungieren sie als wichtige Mitogene für Fibroblasten, glatte Muskelzellen und andere Zellen, die hauptsächlich mesenchymalen Ursprungs sind (Ross & Vogel, 1978; Antoniades, 1981; Piché & Graves, 1989). PDGFs können von zahlreichen verschiedenen Zelltypen gebildet werden (Heldin & Westermark, 1999; Li & Eriksson, 2003). Bei den klassischen PDGFs sind es vorrangig Fibroblasten (Paulsson *et al.*, 1988), vaskuläre Endothelzellen (DiCorleto & Bowen Pope, 1983), Neuronen (Yeh *et al.*, 1991; Sasahara *et al.*, 1991) und Makrophagen (Shimokado *et al.*, 1985), die eine verstärkte PDGF-Expression zeigen (Ross *et al.*, 1986). Die Gewebe-Expressionen der neueren PDGFs sind noch nicht vollständig untersucht, jedoch scheint die Expression von PDGF-D im Vergleich zu PDGF-C allgemein niedriger und restriktiver zu sein. Weiterhin zeigt sich in allen Geweben, die PDGF-C und -D exprimieren, zudem eine Co-Expression mit den klassischen PDGFs (Li & Eriksson, 2003).

Generell scheinen PDGFR- β /PDGF-B vermehrt im Gefäßsystem wirksam zu sein, wohingegen PDGFR- α /PDGF-A ein breiteres Spektrum physiologischer Prozesse umfassen wie beispielsweise die Gastrulation und Organentwicklung. Die Bedeutsamkeit von PDGFs und ihren Rezeptoren während der embryonalen Entwicklung wird durch verschiedene KO-Mäuse deutlich: So zeigen PDGFR- β /PDGF-B-KO-Mäuse schwere Defekte in den Nieren (Levéen *et al.*, 1994; Soriano, 1994) und der Herzdifferenzierung (Boström *et al.*, 1996; Lindahl *et al.*, 1997), wohingegen PDGFR- α /PDGF-A-KO-Mäuse primär Defizite in der Differenzierung des Lungengewebes sowie craniale und myotome Fehlbildungen aufweisen (Soriano, 1997). Im zentralen Nervensystem scheinen

PDGFRs/PDGFs neuroprotektive Funktionen zu besitzen, da hier beispielsweise gezeigt wurde, dass PDGFs im Kontext von oxidativem Stress neuroprotektiv wirken können und somit in die Signaltransduktion involvert sind (Zheng *et al.*, 2010). Neuroprotektive und neurotrophe Effekte von PDGFs wurden zusätzlich in dopaminergen Neuronen-Kulturen von Ratten beschrieben (Othberg *et al.*, 1995; Pietz *et al.*, 1996). Im vaskulären System scheinen PDGFs einen angiogenen Effekt zu haben (Li *et al.*, 2003; Risau *et al.*, 1992; Bategay *et al.*, 1994). Hier konnte gezeigt werden, dass PDGF-AB in mikrovaskulären Herzzellen die Aktivierung von VEGFR2/VEGF induziert und dadurch eine wichtige Rolle in der kardialen Angiogenese spielt (Edelberg *et al.*, 1998). PDGF-B wird zudem verstärkt von Kapillarzellen produziert und scheint daher generell eine wichtige Rolle in der Perizyten-Rekrutierung zu spielen, und dadurch die Integrität von Blutgefäßstrukturen zu fördern (Sundberg *et al.*, 1993; Lindahl *et al.*, 1997; Hellström *et al.*, 1999). In der Homöostase von Geweben scheinen PDGFRs/PDGFs eine überaus wichtige Funktion zu haben, da diese durch ihre Fähigkeit, Interaktionen zwischen konnektiven Gewebezellen und Molekülen der extrazellulären Matrix zu stimulieren, den interstitiellen Flüssigkeitsdruck aufrechterhalten (Rönstrand *et al.*, 1999). Wundheilungsprozesse in Geweben benötigen grundsätzlich die Reepithelisierung, Angiogenese und Ablagerung der extrazellulären Matrix. Sowohl durch die Stimulation der Mitogenität und Chemotaxis von Fibroblasten und glatten Muskelzellen als auch die Stimulation der Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen sind PDGFs in zahlreichen Zelltypen in den Prozess der Wundheilung involviert (Heldin & Westermark, 1999). Hierbei können PDGFs die Produktion von extrazellulären Matrixmolekülen wie Fibronektin (Blatti *et al.*, 1988), Kollagen (Clark *et al.*, 1989; Reyhani *et al.*, 2017), Proteoglykan (Schonherr *et al.*, 1991) und Hyaluronsäure (Heldin *et al.*, 1989) stimulieren. Daneben können PDGFs auch die Produktion von weiteren PDGFs und anderen Wachstumsfaktoren in Makrophagen stimulieren, die dann eine wichtige Rolle in verschiedenen Phasen der Wundheilung spielen. In diesem Zusammenhang konnten Pierce und Kollegen zeigen, dass die direkte Applikation von PDGF-BB auf Schnittwunden die wundheilende Kraft, im Vergleich zu Kontrollwunden, um 150 - 170 % erhöhen und die Zeit der Wundheilung so verringern konnte (Pierce *et al.*, 1988; Pierce *et al.*, 1989). Damit einhergehend konnte auch gezeigt werden, dass Wunden, die mit PDGFs behandelt wurden, zusätzlich eine Zunahme an granulationsgewebe-reichen Fibroblasten und Glykoaminoglykanen gezeigt haben sowie eine erhöhte Reepithelisierungsrate und Neovaskularisation (Pierce *et al.*, 1991; Pierce *et al.*, 1991). Insgesamt scheinen PDGFs wichtige Funktionen in der Embryogenese sowie der Gewebs- und Organentwicklung zu besitzen. Daneben scheinen sie eine signifikante Rolle in der Formation konnektiver Gewebe als auch in Wundheilungsprozessen zu spielen.

Neben den zahlreichen physiologischen Eigenschaften der PDGFs, wird eine Überexpression dieser Wachstumsfaktoren jedoch auch mit vielen pathologischen Prozessen wie zum Beispiel der Arteriosklerose (Tennant & McGeachie, 1991) und Tumorgenese (Heldin *et al.*, 2018) assoziiert. Hierbei scheint besonders die autokrine Aktivierung von PDGF-Signalwegen in die Gliom- (Hermanson *et al.*, 1992; Guha *et al.*, 1995) und Sarkombildung (Chang *et al.*, 2018, Brahmi *et al.*, 2021) sowie die Entstehung von Leukämie (Foss *et al.*, 2001) involviert zu sein. Die parakrine Aktivierung hingegen, wird vermehrt in Karzinomen des Epithels beobachtet, wo es die Rekrutierung von Bindegewebszellen stimulieren und somit das Tumorwachstum, die Angiogenese, Invasion und Metastasenbildung fördern kann (Pontén *et al.*, 1994; Lederle *et al.*, 2006). Zudem können PDGFs pathologische Antworten des Mesenchyms in vaskulären Erkrankungen wie Restenose (Levitzki, 2005), pulmonaler Hypertension (Perros *et al.*, 2008) und Fibrose steuern (pulmonale Fibrose, Leberzirrhose, Sklerodermie, Glomerulosklerose, kardiale Fibrose) (Klinkhammer *et al.*, 2018).

1.5. Zielsetzung

PDGFRs/PDGFs werden während inflammatorischer Prozesse hochreguliert und sind für die Wundheilung von essenzieller Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb die Rolle von PDGFR- α in intestinaler Entzündung im Hinblick auf die CED-Pathogenese untersucht werden. Die Analyse von PDGFR- β wird nicht primär als Ziel gesetzt, da dieser Rezeptor prädominant an physiologischen Prozessen im Gefäßsystem beteiligt ist. Es wurde zudem gezeigt, dass PDGF-A in der frühen Entwicklung eine wichtige Rolle in der intestinalen Villus-Genese einnehmen kann. Hierbei konnte in PDGF-KO-Mäusen eine deutlich verringerte Anzahl an intestinalen Villi sowie eine gestörte Krypten-Architektur gezeigt werden (Karlsson *et al.*, 2000). PDGF-A wird normalerweise im intestinalen Epithel gebildet und fördert dort die Proliferation von PDGFR- α -positiven Mesenchymzellen, die wiederum Villus-Cluster bilden, um die Faltung des Epithels zu bewirken. Ist dieses Clustering gestört, kann es zu einer fehlerhaften Villus-Proliferation kommen. Ergänzend dazu konnte gezeigt werden, dass die PDGFR-Kinase ebenfalls eine Rolle in der Vermittlung von bakterieller Adhärenz an das Darmepithel spielt (Manthey *et al.*, 2014).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Funktion von PDGFR- α in Makrophagen, da diese sowohl bei der intestinalen Homöostase als auch während inflammatorischer Prozesse im Rahmen der angeborenen Immunantwort und Wundheilung von essenzieller Bedeutung sind. Deshalb sollen die Auswirkungen einer Deletion von PDGFR- α in myeloiden Zellen für den Verlauf einer intestinalen Inflammation und der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase untersucht werden, da PDGFRs/PDGFs hier von entscheidender Bedeutung sein könnten. Hierzu soll zunächst der Krankheitsverlauf einer chemisch-induzierten Colitis im konditionellen Mausmodell

untersucht werden und im Anschluss der Krankheitsverlauf einer bakteriell-induzierten Colitis. Dabei sollen auf Genebene verschiedene Makrophagen-Marker sowie Expressionsmuster pro- und anti-inflammatorischer Zytokine analysiert werden. Ergänzend dazu sollen auch Zytokinkonzentrationen im Serum der Mäuse bestimmt werden. Zusätzlich sollen die Frequenzen verschiedener myeloider Zellpopulationen im Hinblick auf die Makrophagen-Polarisierung durchflusszytometrisch ausgewertet werden. Da das Mikrobiom in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle einnimmt, soll außerdem das intestinale Mikrobiom untersucht werden.

Zusammenfassend soll mit dieser Arbeit die Rolle von PDGFR- α in intestinaler Homöostase und Inflammation besser verstanden werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann anschließend eine Aussage über die Bedeutung des PDGFR- α /PDGF-A-Signalwegs für eine mögliche Therapie von CED getroffen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. Geräte und Instrumente

Tab. 1 | Geräte- und Instrumenteliste.

Gerät	Hersteller
BD LSR II Fortessa™	BD Biosciences, USA
Biowizard Xtra Line Clean Bench	Kojair®, Finnland
Centrifuge 5424R	Eppendorf AG, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Deutschland
ChemiDoc XRS+ System	BioRAD Laboratories, USA
CO ₂ Incubator KM-CC17RU2	Panasonic Industry Europe GmbH, Deutschland
Cooled Incubator MIR-154-PE	Panasonic Industry Europe GmbH, Deutschland
Horizontale Gelkammer	Hartenstein, Deutschland
Koloskop SCB Xenon 175	Karl Storz, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Deutschland
Infinite® F50 microplate reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Microscope DM IL LED	Leica, Deutschland
Microtome Blades C53	Feather, Japan
Microtome HM 550	Thermo Scientific™, USA
Microwave HMT882L	Bosch, Deutschland
Multipette® E3	Eppendorf AG, Deutschland
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, USA
peqSTAR Thermocycler 732-3242	Peqlab, Deutschland
PLE-N Präzisionswaage	Kern und Sohn GmbH, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRAD Laboratories, USA
ProfiLab pH/mV-Meter pH 597	WTW, Deutschland
Research plus pipettes	Eppendorf AG, Deutschland
OP Besteck	Fine Science Tools, Inc., USA
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific™, USA
Thermomixer Comfort	Biometra®, Germany
Tuberoller RS-TR5	Phoenix Instrument, Deutschland
Via™ 7 System	Applied Biosystems™, USA
Tissue Cool Plate COP 20	MEDITE, Deutschland
Vortex-Mixer PV-1	Grant Instruments, UK

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tab. 2 | Liste über Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Cellstar Suspensions Kulturschale 12- und 24-Vertiefung Flachboden	Greiner Bio-One, Deutschland
Gewebe/Kulturschale 5 cm	Greiner Bio-One, Deutschland
Glaswaren	Schott, Deutschland
Histologie Kassetten	Sarstedt, Deutschland
96-Loch Microplatte für PCR	Greiner Bio-One, Deutschland
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, USA
Multiply®-µStrip Pro 8-strip	Sarstedt, Deutschland
Nitril Nextgen® Handschuhe	Meditrade, deutschland
Nunc Maxisorp Flachboden 96-Loch-Platten	eBioscience, USA
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl und 10 µl	Sarstedt, Deutschland
Parafilm M	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
5 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	BD Biosciences, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml und 5 ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Spritzen 1 ml und 5 ml	Braun, Deutschland
Sterican Kanülen 0,45x12 mm	Braun, Deutschland
Zellsiebe 70 µm und 100 µm	Greiner Bio-One, Deutschland

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3 | Chemikalien- und Reagenzienliste.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Alcian-Blue Staining Solution	Sigma-Aldrich, Deutschland
10x Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences, USA
Antibiotika/Antimykotika-Lsg. (100x)	Gibco™, USA
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Antibody Diluent	Dako (Aglient), USA
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Collagenase Typ I (C0130) ≥ 125 CDU/mg	Sigma-Aldrich, Deutschland
Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen™, USA
Distilled Water RNase/Nuklease free	Macherey-Nagel, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dextran Sulfate Sodium (DSS)	mpbio, USA

DNase I, RNase-free (1 U/μl)	Thermo Scientific™, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat >99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Entellan® neu	Sigma-Aldrich, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ethanol vergällt ≥99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Fetal Bovine Serum, heat inactivated	Gibco™, USA
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran 4kDa	Sigma-Aldrich, Deutschland
Formaldehyde solution for molecular biology	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gentamicin (10mg/ml)	Gibco™, USA
Glycerol ReagentPlus® ≥99% GC	Sigma-Aldrich, Deutschland
Goat Serum (Normal)	Dako (Aglient), USA
Hank's Balanced Salt solution	Gibco™, USA
Hemalum solution acid cc. to Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Hoechst 33258	Invitrogen™, USA
HEPES	Thermo Scientific™, USA
Hydrogenperoxide 30% EMSURE®	Merck KGaA, Deutschland
Isoflran Baxter	Baxter, USA
Ketasol®	Vetpharm, Schweiz
LB-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako (Aglient), USA
LPS from <i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland
MacConkey Agar for microbiology	Sigma-Aldrich, Deutschland
M-CSF (Animal free), rec. murine	PeproTech, Inc., USA
MEM Alpha Medium (1x)	Gibco™, USA
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe GmbH, Deutschland
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Sigma-Aldrich, Deutschland
PE Annexin V	BD Biosciences, USA
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100x)	Thermo Scientific™, USA
Percoll	GE Healthcare Life Sciences, UK
Potassium bicarbonate	Sigma-Aldrich, Deutschland
Protein Block Serum-Free	Dako (Aglient), USA
Proteinase K, recombinant PCR Grade	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Recombinant mouse IFN-gamma (carrier-free)	BioLegend, Inc., USA

RNase A (17,500 U)	Qiagen, Deutschland
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
RPMI medium 1640 (1x) + GlutaMAX™	Gibco™, USA
Sodium bicarbonate	Thermo Scientific™, USA
Sodium butyrate	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sodium chloride > 99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Sulfuric acid 1 mol/l - 2N Maßlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
TaqMan™ Fast Advanced PCR Mastermix	Applied Biosystems™, USA
TaqMan™ Universal Advanced PCR Mastermix	Applied Biosystems™, USA
Tri-sodium citrate dehydrate for analysis EMSURE®	Merck KGaA, Deutschland
Trizma®hydrochloride	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypan Blue solution 0,4% for microscopy	Sigma-Aldrich, Deutschland
TrypsinLE Reagents	Thermo Scientific™, USA
Tween®20 for molecular biology	AppliChem GmbH, Deutschland
UltraComp eBeads	Invitrogen™, USA
Xylasin®	Vetpharm, Schweiz
Xylol z.A.	ChemSolute® (Th. Geyer), Deutschland

2.1.4. Kits

Tab. 4 | Liste über verwendete Kits.

Kit	Hersteller
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems™, USA
Mouse IL-1b DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Mouse IL-10 DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Mouse TNF DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
NucleoSpin® RNA Mini Kit	Macherey-Nagel, Deutschland
QIAamp Fast Stool Mini Kit	Qiagen, Deutschland
pHrodo™ Green <i>E.coli</i> BioParticles™	Thermo Scientific™, USA

2.1.5. TaqMan® Sonden

Tab. 5 | Liste über verwendete TaqMan® Sonden.

Gen	Kodiertes Protein	Sondennummer
<i>Pdgfrβ</i>	Platelet-derived growth factor receptor β	Hs01019589_m1
<i>Pdgfra</i>	Platelet-derived growth factor receptor α	Hs00998018_m1
<i>Pdgfra</i>	Platelet-derived growth factor receptor α	Mm00440701_m1

<i>Cd86</i>	Cluster of Differentiation 86	Mm00444540_m1
<i>Nos2</i>	Nitric Oxide Synthase 2	Mm00440502_m1
<i>Tnfa</i>	Tumor Necrosis Factor α	Mm00443258_m1
<i>Il1b</i>	IL-1b	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	IL-6	Mm00446190_m1
<i>Ccl2</i>	MCP1	Mm00441242_m1
<i>Mrc1</i>	Mannose Receptor C-Type 1; CD206	Mm01329359_m1
<i>Cd163</i>	High Affinity Scavenger Receptor for the Hemoglobin-Haptoglobin Complex; CD163	Mm00474091_m1
<i>Arg1</i>	Arginase 1	Mm00487650_m1
<i>Chil3</i>	Chitinase-like 3 (Ym1)	Mm00657889_mH
<i>Il10</i>	IL-10	Mm01288386_m1
<i>Ccl22</i>	CC-Chemokine Ligand 22	Mm00436439_m1
<i>Stat6</i>	Signal transducer and activator of transcription 6	Mm01160477_m1
<i>Hprt</i>	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	Mm03024075_m1
<i>Hprt</i>	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	Hs02800695_m1

Alle TaqMan® Sonden wurden von Thermo Scientific™, USA bezogen.

2.1.6. Antikörper Immunhistochemie

Tab. 6 | Antikörperliste für Immunhistochemie.

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
CD45 (ab10558)	Rabbit	1:1000	Abcam, USA

2.1.7. Antikörper Durchflusszytometrie

Tab. 7 | Antikörperliste für Durchflusszytometrie.

Antikörper	Klon	Ursprung	Konzentration Antikörper	Verdünnung
CD80-BUV395	16-10A1	American Hamster	0.2 mg/ml	1:800
Ly6G-BV421	1A8	Rat	0.2 mg/ml	1:800
CD45(#2)-BV786	104	Mouse	0.2 mg/ml	1:800
F4/80-AF488	BM8	Rat	0.5 mg/ml	1:600
Ly6C-PerCP/Cy5.5	HK1.4	Rat	0.2 mg/ml	1:800
I-A/I-E MHCII-APC	AF6-120.1	Rat	0.2 mg/ml	1:800
CD206-PE	C068C2	Rat	0.2 mg/ml	1:800
CD11b-PE-Cy7	M1/70	Rat	0.2 mg/ml	1:800

CD11c-APC-Cy7	N418	American Hamster	0.2 mg/ml	1:400
Zombie Aqua				1:100

Der CD80-BUV395 Antikörper wurde vom Hersteller BD Biosciences bezogen. Alle anderen Antikörper und der Zombie Aqua (*Live/Dead*-Marker) wurden von der Firma BioLegend bezogen.

2.1.8. Software

Tab. 8 | Softwareliste.

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS	Adobe Systems, USA
BD FACSDiva™ Software	BD Biosciences, USA
FlowJo Software	Tree Star, Inc., USA
GraphPad Prism 8	GraphPad, USA
Image Lab	BioRAD Laboratories, USA
ImageJ	ImageJ, USA
Magellan™	Tecan Trading AG, Schweiz
QuantityOne Software	BioRAD Laboratories, USA
ViiA™ 7 System	Applied Biosystems™, USA

2.2. METHODEN

2.2.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die individuelle Messung physischer und chemischer Charakteristika von Partikeln mittels Durchquerung einer Laserlichtquelle. Hierbei werden zuvor vereinzelt Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an verschiedenen Lasern vorbeigeleitet und anhand der durch die Zelle erzeugten Streuung des Lichts kann auf die Größe und Granularität der betreffenden Zelle geschlossen werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) beschreibt hier die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist vom Volumen der Zelle abhängig. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) beschreibt die Lichtbrechung im rechten Winkel. Diese Lichtbrechung wird von der Granularität, der Größe und Struktur ihres Nukleus sowie der Vesikel in einer Zelle beeinflusst (Büscher, 2019). Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (vgl. 2.1.7) können Zellen zudem anhand ihrer Oberflächenproteine spezifisch charakterisiert werden. Hierbei werden die Fluorochrome der Antikörper durch die Laser angeregt und das spezifisch emittierte Fluoreszenzsignal detektiert. Aus der Kombination dieser Informationen können somit nicht nur Hauptpopulationen von Zellen analysiert werden, sondern auch ihre Subpopulationen (Herzenberg *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden myeloide Zellpopulationen der murinen *Lamina Propria*

an unterschiedlichen Colitis-Zeitpunkten untersucht, mit Augenmerk auf verschiedene Subpopulation von Makrophagen.

2.2.1.1. Färbung von Oberflächenmarkern

Die extrazelluläre Färbung von Oberflächenproteinen myeloider Zellen erfolgte unmittelbar nach der Isolation von *Lamina Propria* (LP)-Zellen aus dem murinen Colonssegment. Die Zellen wurden dazu mit 300 µl PBS/ 2,5 % FCS gewaschen und für 5 min bei 450x g zentrifugiert. Um zwischen toten und vitalen Zellen differenzieren zu können, wurden diese in 100 µl Zombie Aqua (*Live/Dead*-Marker) resuspendiert und 15 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Dieser Farbstoff dringt in Zellen ohne intakte Zellmembran ein und bindet dort freie Amine, wodurch vitale Zellen als ungefärbt detektiert werden können. Vor Beginn der extrazellulären Färbung wurden die Domänen des FcγIII/II Rezeptors (CD16/CD32) geblockt, um unspezifische Bindungen und somit falsch-positive Ergebnisse zu minimieren sowie sicherzustellen, dass nur spezifische Antigenbindungen detektiert werden. Alle Proben wurden dafür 10 min bei 4 °C mit Fc-Block inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper-Mix für weitere 20 min bei 4 °C inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 300 µl PBS/ 2,5 % FCS und eine Zentrifugation für 5 min bei 450x g. Alle Proben wurden im Anschluss an die Färbung 10 min bei RT und Dunkelheit in 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellen in 300 µl PBS/ 2,5 % FCS resuspendiert und bis zu Messung bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt. Die fixierten Proben wurden am Folgetag am Fortessa LSR II gemessen und anschließend mit Hilfe der Software FlowJo 10 ausgewertet. Um die spektrale Überlappung einzelner Fluorochrome mit Hilfe der Auswertsoftware rechnerisch korrigieren zu können, wurden während der Messung zusätzlich Kompensationskontrollen mitgemessen. Hierfür wurden OneComp eBeads™ mit 1 µl des jeweiligen Antikörpers versetzt, 20 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert, gewaschen, zentrifugiert und in 300 µl PBS resuspendiert. Als Kompensationskontrolle des *live/dead* Markers wurden übriggebliebene Zellen für 30 min bei 55 °C abgetötet und anschließend mit einigen vitalen Zellen vermischt und wie zuvor beschrieben, mit Zombie Aqua gefärbt.

2.2.1.2. Gating-Strategie

Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen wurden jeweils zwei unterschiedliche Parameter (FSC, SSC, Oberflächenmarker) auf einer zweidimensionalen Achse gegeneinander aufgetragen. Durch die immer feiner werdende Selektion bestimmter Charakteristika einzelner Zellpopulationen konnten so verschiedene Subpopulationen identifiziert werden (vgl. Abb. 6).

Für die Analyse verschiedener myeloider LP-Populationen wurden zunächst Dubletten durch die Kombination von FSC-H (H = Höhe) und FSC-A (A = Fläche) ausgeschlossen. Anschließend wurden mittels SSC und Zombie Aqua vitale Zellen ausgewählt sowie über die Kombination von SSC-A und CD45⁺ Leukozyten. In der Leukozyten Population wurden Neutrophile (Ly6G⁺ CD11b⁺) mittels Ly6G und CD11b exkludiert, sodass im nächsten *Gate* durch Kombination von CD11c und CD11b dendritische Zellen (CD11c⁺ CD11b⁺) ausgeschlossen werden konnten. In der CD11b⁺ CD11c⁻ Population wurde im Anschluss zwischen Monozyten und Makrophagen mittels Ly6C und F4/80 differenziert. Hier wurden Ly6C⁺ F4/80⁻ Zellen als Monozyten definiert und Makrophagen als Ly6C⁻ F4/80⁺. Innerhalb der Makrophagen Population wurden intermediäre F4/80⁺ Zellen als infiltrierende und hohe F4/80⁺ Zellen als residente Makrophagen charakterisiert. Innerhalb der infiltrierenden und residenten Makrophagenpopulationen wurden jeweils anschließend, durch die Kombination von MHCII und CD206, anti-inflammatorische Makrophagen identifiziert (MHCII⁺ CD206⁺). Innerhalb der MHCII⁺ Populationen wurden mittels MHCII und CD80 zusätzlich pro-inflammatorische Makrophagen definiert.

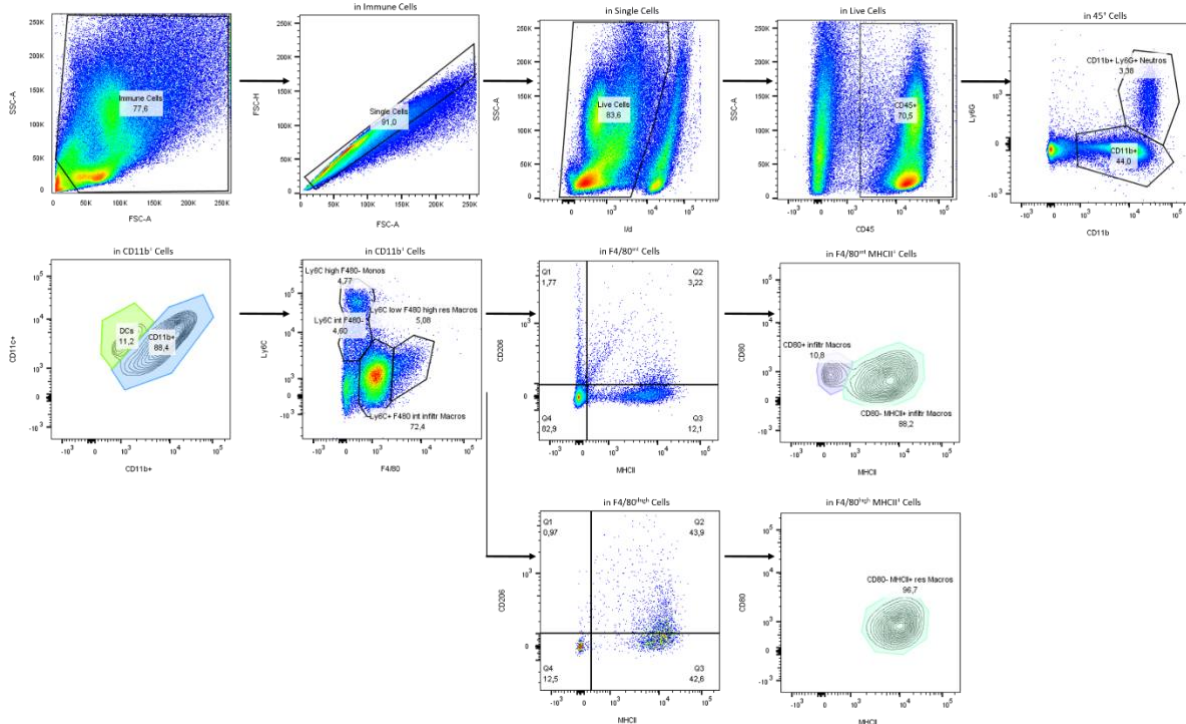


Abb. 6 | Gating-Strategie zur Analyse myeloider LP-Zellen. Dubletten wurden durch Kombination von FSC-H und FCS-A exkludiert. Im Anschluss wurden erst vitale LP-Zellen (Zombie-) und danach Leukozyten (CD45⁺) für die weitere Analyse ausgewählt. In der Leukozyten-Population wurden Neutrophile (CD11b⁺ Ly6G⁺) identifiziert und ausgeschlossen sowie darauffolgend Dendritische Zellen (CD11b⁺ CD11c⁺) im CD11b⁺ Gate. Für die Analyse verschiedener Makrophagen-Populationen wurden durch Kombination von Ly6C und F4/80 zunächst Monozyten (CD11b⁺ Ly6C^{hoch}) und dann infiltrierende (F4/80^{int}) von residenten (F4/80^{hoch}) Makrophagen getrennt. Innerhalb der jeweiligen Makrophagen-Populationen wurden dann MHCII⁺ CD206⁺ von MHCII⁺ Zellen getrennt, um anschließend CD80⁺ MHCII⁺ zu identifizieren zu können.

Für die durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose-Aktivität wurden wie zuvor beschrieben, erst Dubletten mittels FSC-H und FSC-A ausgeschlossen. Anschließend wurde im Vorfeld einmalig die exakte Position von BMDMs (*bone marrow-derived*

macrophages) im *Gate* mittels F4/80 verifiziert (vgl. Abb. 7) und dann *E. coli*⁺ BMDMs mittels Kombination von SSC-A und FITC identifiziert (vgl. Abb. 23).

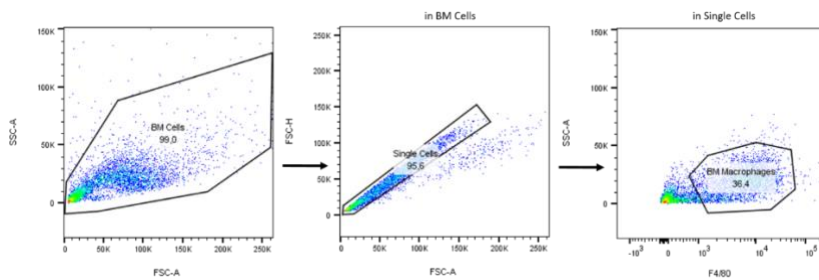


Abb. 7 | Gating-Strategie zur Identifikation von BMDMs. Dubletten wurden durch die Kombination von FSC-H und FSC-A ausgeschlossen und F4/80⁺ BM-Zellen in der Einzelzellensuspension verifiziert.

2.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bietet eine robuste und sensitive Methode, um Antigen-Konzentrationen in unbekanntenen Proben zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Sandwich*-ELISA eingesetzt. Bei dieser ELISA-Methode wird das zu messende Protein durch zwei Antikörper eingeschlossen. Darauf folgt die Detektion mittels Peroxidase-gekoppelter Antikörper, die die Umsetzung einer Farbvorstufe katalysiert, wobei sich der Farbumschlag proportional zur Konzentration der Peroxidase verhält. Die Konzentration der Peroxidase spiegelt hierbei die Menge des zu bestimmenden Antigens wider. Mit Hilfe einer Standardkurve kann am Ende die Antigen-Konzentration berechnet werden. (Engvall, 2010). Die murinen Zytokin-ELISAs (Duoset Kit) wurden von der Firma R&D Systems bezogen und nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Maus-Seren der Kontrollen wurden 1:20 mit Medium verdünnt und die der DSS- oder *Citrobacter*-Versuche jeweils 1:40. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei 450 nm am *Microplate reader* (Tecan) gemessen.

2.2.3. RNA-Analyse

2.2.3.1. RNA-Isolation und -Messung

Die RNA-Extraktion aus den bei der Organentnahme bereits weggefrorenen Colonsegmenten (20 - 30 mg) erfolgte mit dem Nucleospin® RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangabe. Die RNA wurde nach erfolgter Isolation in 40 µl RNase/Nuklease-freiem Wasser (Macherey-Nagel) eluiert. Die Konzentration und Qualität der extrahierten RNA wurde durch die Messung des Eluats am NanoDrop ermittelt. Der Reinheitsgrad der RNA wird hierbei über das Wellenlängenverhältnis $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}) und $\lambda = 280 \text{ nm}$ (OD_{280}) bestimmt. Liegt der Quotient $OD_{260/280}$ bei 2,0, so liegt die RNA in reiner Form und nicht degradiert vor.

2.2.3.2. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription der RNA in cDNA (complementary DNA) erfolgte mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* der Firma Applied Biosystems nach

Herstellerangabe. Es wurden jeweils 2 µg der aus den Colosegmenten isolierten RNA oder 500 ng aus BMDM isolierter RNA als Matrizen-RNA eingesetzt und in einem 20 µl Ansatz nach dem unten aufgeführten PCR-Programm umgeschrieben.

Tab. 9 | PCR-Cyclingprogramm für die cDNA-Synthese.

Schritt	Temperatur °C	Zeit (min)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

Die transkribierte cDNA wurde anschließend 1:5 mit RNase/Nuklease-freiem Wasser (Macherey-Nagel) verdünnt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.3.3. Quantitative *real-time* PCR

Um die ursprüngliche Transkriptionsrate der Gene im Colon der Versuchstiere zu bestimmen, wurde die zuvor aus der extrahierten RNA hergestellte cDNA mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) in Echtzeit amplifiziert. Die Methode basiert auf dem Prinzip der normalen Polymerase-Kettenreaktion, die jedoch durch den Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffes eine Quantifizierung der amplifizierten DNA in Echtzeit ermöglicht. Hierbei misst ein UV-Licht CCD-Sensor während der Amplifikation das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert während der Amplifikation mit der doppelsträngigen DNA, wobei seine Fluoreszenz positiv mit dem PCR-Produkt korreliert. Die Quantifizierung erfolgt stets in der exponentiellen Phase der PCR (Bustin *et al.*, 2009). Für die qRT-PCR wurden TaqMan® Sonden der Firma Thermo Fisher mit einer FAM™ Farbstoffmarkierung am 5'-Ende, einem *Minor Groove Binder* (MGB) und einem nicht fluoreszierenden *Quencher* (NFQ) am 3'-Ende eingesetzt. Pro Ansatz wurden 0,5 µl cDNA, 0,5 µl Sonde, 4 µl RNase/Nuklease-freies Wasser und 5 µl *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) eingesetzt. Pro biologischem Replikat wurden drei technische Replikate gemessen. Alle Proben wurden in 96-Loch-Platten pipettiert, zentrifugiert und mit folgendem PCR-Programm gemessen:

Tab. 10 | PCR-Cyclingprogramm für die qRT-PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zyklen
Initiale Initiierung	2 min	50	40
Initiierung	10 min	95	
Denaturierung	15 s	95	
<i>Annealing</i> und Elongation	60 s	60	

Für die Quantifizierung der cDNA und damit einhergehenden Evaluierung der relativen Genexpression wurde die Differenz des Zyklusschwellenwertes (*Ct-cycle threshold*) der jeweiligen Sonde und des *Housekeepers* errechnet. *Housekeeping* Gene werden unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert, wodurch sie als Kontrollgen eingesetzt werden können. Für die Normalisierung (ΔCt) der Ziel-mRNA wurde das *Housekeeping* Gen *Hprt* verwendet (Kozera & Rapacz, 2013). Die relative Expression des Zielgens jeder Probe wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{1}{2^{\Delta Ct}}$$

2.2.4. Histologie

2.2.4.1. Probenvorbereitung

Für die Analyse paraffin-basierter Colonssegmente wurden die entnommenen Gewebeproben über Nacht bei 4 °C in 4 %iger Formalin-Lösung (Roti®-Histofix, Carl Roth, Deutschland) fixiert und im Anschluss im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) nach folgendem Protokoll entwässert und in Paraffin eingebettet:

Tab. 11 | Entwässerungs- und Paraffinierungsprotokoll des pathologischen Instituts.

	Formalin	Ethanol						Xylol		Paraffin				
		80%		96%		100%		I	II	A	B	C	D	
Zeit (min)	60	30	40	30	40	30	40	50	40	60	20	30	40	60

Für alle histologischen Färbungen wurden 4 µm dicke Schnitte mit Hilfe des Mikrotoms angefertigt und auf Superfrost Objektträger überführt. Vor den Färbungen wurden alle Schnitte mit einer dreiteiligen Xylolreihe (je Xylolbad 4 min) entparaffiniert und einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 %) für je 4 min rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte 4 min in VE-Wasser inkubiert und dann jeweils nach spezifischen Protokollen gefärbt. Nach den Färbungen wurden die Schnitte mit einer absteigenden Ethanolreihe (50 % für 30 s, 70 % für 1 min, 90 % für 1 min und 2x 100 % für je 2 min) und einer dreiteiligen Xylolreihe (je Xylolbad 4 min) dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

2.2.4.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung visualisiert verschiedene Gewebestrukturen durch die Kombination von zwei verschiedenen Färbungen. Hämatoxylin färbt hierbei basophile Strukturen und damit einhergehend die Zellkerne an, wohingegen Eosin Strukturen wie Zellplasmaproteine, Kollagen und Mitochondrien einfärbt. Die Schnitte wurden hierzu nach der Rehydrierung 10 min in einem Hämatoxylin-Bad inkubiert und anschließend

12 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte 1 min in einem Eosin-Bad inkubiert, mit VE-Wasser gewaschen und wie unter 2.2.4.1 beschrieben weiter behandelt.

2.2.4.3. Alcianblau-Hämatoxylin Färbung

Die Mucinschicht der Colonssegmente wurde mit Hilfe von Alcianblau (1 % Alcianblau in 3 % Essigsäure, pH 2,5) gefärbt. Hierbei werden saure Glykosaminoglykane/Mucopolysaccharide durch das kationische Alcianblau visualisiert. Zusätzlich wurden mit Hämatoxylin die Zellkerne gegengefärbt. Dafür wurden die Schnitte nach der Rehydrierung für 5 min in einem Alcianblau-Bad inkubiert und anschließend 3 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Darauffolgend wurden die Colonssegmente mit VE-Wasser gewaschen und für 10 min in einem Hämatoxylin-Bad inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 12 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, mit VE-Wasser gewaschen und wie unter 2.2.4.1 beschrieben, weiter behandelt.

2.2.4.4. Immunhistochemie

Um Leukozyten in paraffinierten Schnitten zu visualisieren, wurde das Typ I Transmembranprotein PTPRC (*Protein tyrosine phosphatase receptor type C*; CD45) angefärbt. Um die Strukturen der Proteine freizulegen, wurden die entparaffinierten Schnitte vor den Färbungen 20 min in einem Citratpuffer (10 mM Trisodiumcitrat-Dihydrat; 0,05 % Tween20, pH 6) in der Mikrowelle gekocht und mit PBS-T (1x PBS; 0,05 % Tween20) gewaschen. Darauffolgend wurden die Schnitte 10 min in einer 3 %igen, Methanol-basierten Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS-T gewaschen, die Colonssegmente mit einem Dako Pen umrundet, mit Protein-blockierender Lösung bedeckt und für 60 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Colonssegmente wurden danach dreimal mit PBS-T gewaschen, mit dem Primärantikörper bedeckt und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal mit PBS-T gewaschen und mit einem HRP *Rabbit/Mouse*-Antikörper für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS-T wurden die Colonssegmente mit einem Serumblock (2 % Ziegen Serum in PBS) für 10 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Schnitte wurden danach wieder mit PBS-T gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Dako Envision labeled polymer HRP-conjugate anti-rabbit) für 30-60 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-T wurden die Colonssegmente mit DAB Substrat benetzt, bis eine bräunliche Färbung entstanden ist (max. 90 sek). Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit VE-Wasser gewaschen und die Kerne im Hämatoxylin-Bad und mit Leitungswasser für je 1 min gegengefärbt/gebläut. Nach kurzer Inkubation in VE-Wasser wurden die Schnitte wie unter 2.2.4.1 beschrieben weiter behandelt.

2.2.5. Mikrobiom-Analyse

Die mikrobielle Komposition der Versuchstiere wurde anhand einer 16S-ribosomalen RNA-Sequenzierung analysiert. Hierzu wurden Stuhlproben von 8 bis 12 Wochen alten Mäusen gesammelt und die genomische DNA mittels QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, USA) extrahiert. Die Isolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die Sequenzierung und Probenauswertung erfolgte im Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie des UKE durch das Labor von Prof. Dr. Nicole Fischer.

Das Illumina-Prinzip basiert auf der Immobilisierung von DNA-Fragmenten durch sogenannte *Flow-Cells*. Eine detaillierte Beschreibung des Protokolls *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* wurde von der Firma Illumina veröffentlicht und ist ihrer Website zu entnehmen. Mit Hilfe des *Shannon diversity index* wurde die Alpha-Diversität kalkuliert, wobei die Diversität des Mikrobioms mit diesem Wert positiv korreliert. Mit Hilfe der Beta-Diversität wurde die phylogenetische Distanz zwischen einzelnen Proben beschrieben. Hierbei wurde eine gewichtete Analyse durchgeführt, wodurch nur die Qualität der einzelnen Taxa und nicht ihre Quantität berücksichtigt wurde. Zusätzlich wurden mittels SILVA-Datenbank die verschiedenen Taxonomieebenen auf Grundlage einer 95 %igen Übereinstimmung erstellt (Klindworth *et al.*, 2013).

2.2.6. Isolation von Primärzellen

2.2.6.1. Versuchstiere

Tierversuche wurden gemäß der *European Community Council Directive* (86/609/EEC) durchgeführt und durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der freien Hansestadt Hamburg (G17/96) genehmigt. Die Mäuse wurden in der Tierversuchseinrichtung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter speziellen pathogen-freien (SPF) Bedingungen gezüchtet und gehalten. Alle Tiere wurden in Gruppen von jeweils vier Tieren pro Käfig mit einem 12:12 h Hell:Dunkel-Rhythmus und Standardfutter *ad libitum* gehalten.

Die PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäuse (B6.Cg-*Pdgfra*^{tm8Sor}/Ei J) wurden durch Dr. Philippe Soriano der Firma Jackson Laboratories, USA generiert und mittels Embryonaltransfer in die Zuchtbarriere der Forschungstierhaltung des UKE transferiert. Durch das Einbringen von gezielten Mutationen (*loxP* Sequenzen) zwischen Exon 1 und Exon 4 des PDGFR- α -kodierenden Gens in Chromosom 5, Allel 8, ist es möglich mit Hilfe des Cre-Lox-Systems das Zielgen mittels Cre Recombinase herauszuschneiden und damit einhergehend einen *Knockout* in einer bestimmten Zellgruppe zu generieren. Für den konditionellen *Knockout* in myeloiden Zellen (Deletion in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten) wurden die PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäuse mit LysM (*lysozyme M*)-Mäusen (B6.129P2-*Lyz2*^{tm1(cre)Jfo}) verpaart, sodass in der F1-Generation heterozygote LysM-PDGFR- $\alpha^{+/-}$ -Mäuse generiert wurden, die nach erneuter Verpaarung untereinander in der

F2-Generation homozygote LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse hervorgerbracht haben, welche als *knockout* (KO) Versuchstiere für alle Experimente dieser Arbeit verwendet wurden. Für die LysM-Mäuse wurde das Cre-Recombinase Gen gezielt in Chromosom 10, 65.34 cM inseriert (Shi *et al.*, 2018a). Die zur Zucht benötigten LysM-Mäuse wurden freundlicherweise von der AG Huber am UKE zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit gnotobiotische Mäuse (C57BL/6J) verwendet, die ebenfalls von der AG Huber am UKE zur Verfügung gestellt wurden. Alle Gnotobioten wurden in einem separaten Tierhaltungsraum des UKE unter sterilen Bedingungen gehalten. Um ein steriles Umfeld während der Experimente zu gewährleisten, wurden Einmal-Kittel, sterile Handschuhe, Kopfhäuben und ein Mundschutz verwendet. Alle Gegenstände und Materialien wurden vor Benutzung autoklaviert. Die Gnotobioten wurden in einem Alter von 4 Wochen mit Mikrobiom der Spendertiere oral gavagiert.

Für die *in vivo* Studien wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse im Alter von 8 - 12 Wochen verwendet. Während der DSS- und *Citrobacter rodentium* Experimente wurden die Tiere täglich überwacht und durch sogenannte *scoring sheets* bewertet. Bei Anzeichen von starkem Leiden wurden die Tiere umgehend aus dem Versuch ausgeschlossen und euthanasiert, um ein unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden.

2.2.6.2. Genotypisierung

Alle Mäuse wurden vor Versuchsbeginn mittels Ohrbiopsie genotypisiert und zusätzlich nach Versuchsende mittels Schwanzbiopsie reagentypisiert. Hierzu wurden die Biopsien in 80 μ l Proteinase K Puffer (Tris base; EDTA; Natriumchlorid; 10 % SDS Lösung; VE-Wasser; pH 8) und 3 μ l Proteinase K gelöst und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung für 20 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Auf die verdauten Biopsien wurden anschließend 300 μ l RNase Puffer (Tris base; EDTA; VE-Wasser, 0,2 mg/ml RNase; pH 8) gegeben, um Störungen während der DNA-Analyse durch frei gewordene RNA zu eliminieren. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt:

Tab. 12 | Pipettieransatz für die PDGFR- α PCR.

Reagenz	Menge (μ l)
10x Mastermix	1,5
DreamTaq DNA Polymerase	0,15
dNTPs	0,9
Primer 1	0,2
Primer 2	0,2
Primer 3	0,2

Midori green	0,3
VE-Wasser	11,55

Tab. 13 | Pipettieransatz für die LysM PCR.

Reagenz	Menge (µl)
10x Mastermix	1,5
DreamTaq DNA Polymerase	0,15
dNTPs	0,3
Primer 1	0,5
Primer 2	0,5
Midori green	0,3
VE-Wasser	10,75

Die PCR-Programme sind nachfolgend aufgeführt:

Tab. 14 | PCR-Programm für die PDGFR-α PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung initial	94 °C	3'	
Denaturierung	94 °C	30''	x30 zyklisch
Hybridisierung	61 °C	30''	
Polymerisation	72 °C	30''	
Polymerisation final	72 °C	3'	
Kühlung	8 °C	∞	

Tab. 15 | PCR-Programm für die LysM PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung initial	94 °C	3'	
Denaturierung	94 °C	30''	x35 zyklisch
Hybridisierung	63 °C	30''	
Polymerisation	72 °C	30''	
Polymerisation final	72 °C	3'	
Kühlung	8 °C	∞	

Die PCR-Protokolle richten sich nach dem Gerät und Angaben des Herstellers (Applied Biosystems, USA).

2.2.6.3. Organentnahme

Die Versuchstiere wurden vor der Organentnahme zuerst mittels CO₂/O₂ betäubt und anschließend mit CO₂ euthanasiert. Alle Mäuse wurden danach mit Ethanol desinfiziert,

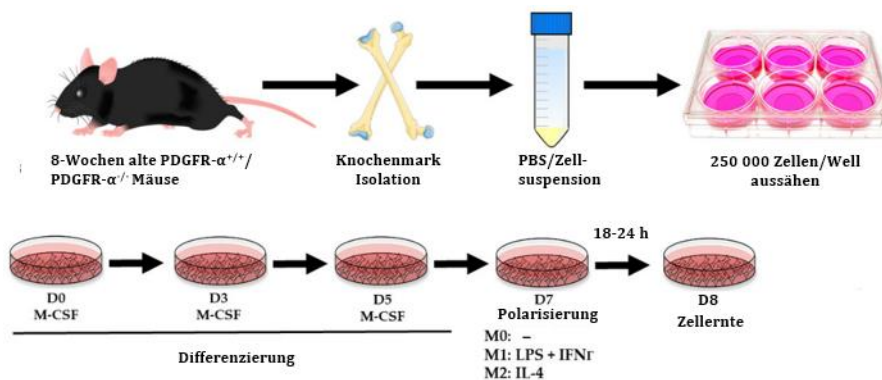
der Thorax umgehend geöffnet und das Diaphragma durchtrennt, sodass der Tod, der durch Kollabieren der Lunge sichergestellt werden konnte. Unmittelbar danach erfolgte die Blutentnahme aus der *Vena cava*. Die Blutproben wurden anschließend für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Darauffolgend wurde das Abdomen der Mäuse distal geöffnet und das Colon vorsichtig herauspräpariert. Für histologische und molekularbiologische Analysen wurden 2 cm des distalen Colosegmentes abgeschnitten. Für die Histologie wurde 1 cm des distalen Stückes verwendet. Für RNA- und Protein-Analysen jeweils 0,5 cm des proximalen Stückes, wobei der erste Abschnitt für RNA-Analysen und der zweite für Protein-Analysen verwendet wurde. Das restliche Colosegment wurde für durchflusszytometrische Analysen verwendet. Die Gewebe für molekularbiologische Analysen wurden während der Organentnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei - 80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Die frischen Gewebeproben wurden in RPMI 1640 Medium auf Eis gelagert und die Segmente für Histologie in Formalin fixiert.

2.2.6.4. Isolation von *Lamina Propria* Zellen

Mononukleare *Lamina Propria* (LP)-Zellen wurden nach Weigmann *et al.* (2007) aus dem murinen Colongewebe isoliert. Dafür wurden die entnommenen Colosegmente longitudinal geöffnet, Fäkalien entfernt und anschließend mit eiskalten PBS gespült. Das Colon wurde darauffolgend in kleine Stücke geschnitten, in 10 ml frische DTT-Lösung (1 mM DTT; 10 % FCS; HBSS; HEPES-Bicarbonat; VE-Wasser) überführt und für 20 min bei 37 °C geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden die Colonstücke in eine Petrischale überführt, weiter zerkleinert und in 6 ml Collagenase Lösung (60 U/ml Collagenase; 417 U/ml DNase; RPMI 1640; 10 % FCS; HGPG; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂) für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Der DTT-Überstand wurde verworfen, da nur Immunzellen aus der *Lamina Propria* für die Analysen berücksichtigt wurden. Nach dem Collagenase-Verdau wurde die gesamte Suspension mit einem Spritzenstempel durch ein 70 µm großes Zellsieb gerieben, mit PBS/2,5 % FCS gespült, auf 30 ml aufgefüllt und für 10 min bei 450x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml 40 %igem Percoll resuspendiert. Die Resuspension wurde danach vorsichtig auf 4 ml 67 %igem Percoll geschichtet und für 20 min bei 450x g (Bremskraft und Beschleunigung auf minimaler Stufe) zentrifugiert. Die Percoll-Lösungen wurde zuvor aus einer 90 %igen Percoll-Suspension angesetzt (100 % Percoll und 10x PBS 90:10). Über den Dichtegradienten wurden die aufgereinigten LP-Zellen der Interphase entnommen und in 30 ml PBS/2,5 % FCS gewaschen. Die Zellen wurden erneut bei RT und 450x g zentrifugiert und in 300 µl PBS/2,5 % FCS resuspendiert.

2.2.6.5. Isolation und Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Makrophagen

Für die Gewinnung von *bone marrow derived macrophages* (BMDMs) wurden die Versuchstiere mittels intraperitoneal verabreichter Ketamin/Xylazin-Narkose (1 ml DPBS; 0,8 ml Xylazin; 1 ml Ketamin) betäubt und anschließend durch cervikale Dislokation getötet. Die Hinterläufe der Mäuse wurden danach mit Ethanol benetzt, das Fell um die Hüftgelenke umlaufend aufgeschnitten, mit einer Pinzette bis zum Fußgelenk heruntergezogen und entfernt. Im Anschluss wurden die Muskeln am Hinterlauf angeschnitten und das Hüftgelenk vorsichtig ausgekugelt. Umliegendes Muskelgewebe und Sehnen wurden sorgfältig mit einem Skalpell entfernt, das Fußgelenk ausgekugelt und Femur und Tibia in 5 ml kaltem PBS aufgefangen. Die Hinterläufe wurden nachfolgend in 70 %igem Ethanol desinfiziert, in PBS gewaschen und Femur und Tibia voneinander getrennt. Die Knochenmarksinhalte wurden mit sterilem PBS durch ein 100 µm großes Zellsieb gespült und in 5 ml kaltem PBS aufgefangen. Ein Aliquot wurde zur Zellzahlbestimmung abgenommen, um die Suspension auf eine finale Konzentration von 5×10^9 Zellen/ml einzustellen. Anschließend wurden 250000 Zellen pro Vertiefung in einer 12-Loch-Platte in 2 ml BMDM-Medium (MEM alpha Medium; 10 % FCS; 1 %; 1 % Gibco® Antimicotic-Antibiotic; 10 ng/ml M-CSF) ausgesät und 7 – 9 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (vgl. Abb. 8). Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen dabei mit PBS gewaschen. M-CSF wurde immer frisch supplementiert. Der Differenzierungsgrad der Makrophagen wurde täglich mikroskopisch überprüft, sodass gewährleistet werden konnte, dass nur ausdifferenzierte Makrophagen in den Versuchen verwendet wurden.



Angelehnt an Anisiewicz *et al.*, *Cancers* (2020)

Abb. 8 | Schematische Darstellung der BMDM-Isolation. 8-Wochen alte Mäuse wurden mittels Narkose betäubt und anschließend durch cervikale Dislokation getötet. Femur und Tibia wurden aus den Hinterläufen präpariert, Knochenmarkszellen isoliert und in PBS suspendiert. 250000 Zellen wurden pro Well in Medium ausgesät. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen dabei mit PBS gewaschen. BMDMs wurden mit Hilfe von M-CSF differenziert und an Tag 7 polarisiert (angelehnt an Anisiewicz *et al.*, 2020).

2.2.7. Analyse der Phagozytose-Aktivität

Für die Bestimmung der Phagozytose-Aktivität wurden ausdifferenzierte Makrophagen aus PDGFR- $\alpha^{+/-}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen über Nacht entweder mit M-CSF (unbehandelte Kontrolle), IFN- γ /LPS (pro-inflammatorischer Phänotyp) oder IL-4 (anti-inflammatorischer Phänotyp) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Überstände abgenommen und bei -20 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Makrophagen wurden danach für 1,5 h mit FITC-konjugierten *E. coli* Bakterien (Thermo Fisher, USA) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um die adhärennten Makrophagen von dem Boden der 12-Loch-Platte zu lösen, wurden diese für 15 min mit Trypsin behandelt, durch auf- und ab pipettieren abgelöst und in mit 2 ml PBS/2,5 % FCS befüllte FACS-Röhrchen überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 400x g) wurden die Makrophagen in 300 μ l PBS/ 2,5 % FCS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.8. *In vitro* Stimulierung von BMDMs mit Natrium-Butyrat

Ausdifferenzierte BMDMs aus PDGFR- $\alpha^{+/-}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen wurden über Nacht entweder mit M-CSF (unbehandelte Kontrolle) oder IL-4 (anti-inflammatorischer Phänotyp) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die BMDMs wurden danach über Nacht mit 1 mM Natrium-Butyrat (Sigma-Aldrich, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die mRNA der Makrophagen mittels RNeasy Mini Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert und mittels cDNA High-Capacity Reverse Transkription Kit (Thermo Fisher, USA) umgeschrieben. Im Anschluss wurde die cDNA mittels qRT-PCR analysiert (vgl. 2.2.3).

2.2.9. Mausmodelle Für CED

2.2.9.1. *Citrobacter rodentium*-induzierte Colitis

Die Infektion mit *Citrobacter rodentium* bietet ein robustes Modell, um die bakterielle Pathogenese und damit einhergehend die mukosale Immunologie und die Rolle des Mikrobioms in intestinaler Inflammation zu studieren (Crepin *et al.*, 2016). *C. rodentium* ist ein Mitglied der der *Attaching and effacing* (A/E)-Familie bakterieller Pathogene, die sich durch starke Adhärenz an Wirtsepithelzellen und die damit verbundene Zerstörung der intestinalen Mikrovilli charakterisieren (Bouladoux *et al.*, 2017).

Citrobacter rodentium (ICC180, Nalidixinsäure- und Kanamycin-Resistenz; (Wiles *et al.*, 2006)) wurde für die Anzucht in 5 ml LB Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden mit jeweils 200 μ l Vorkultur pro 5 ml LB Medium vier neue Ansätze angeimpft und für 2,5 h bei 37 °C geschüttelt, um die log Phase der Bakterien zu erreichen. Alle Ansätze wurden danach *gepooled*, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert und in 5 ml PBS resuspendiert.

Anschließend wurde die OD₆₀₀ gemessen ($1,0 \pm 10^9$ KBE, Blank: PBS). Dafür wurde eine serielle Verdünnungsreihe angesetzt und Mehrfachmessungen durchgeführt, um eine genaue Konzentration zu bestimmen. Der Ansatz wurde danach entsprechend der Inokulationsdosis verdünnt und die Mäuse umgehend mit $1-2 \cdot 10^9$ KBE in 200 µl oral gavagiert. Der restliche Ansatz wurde seriell verdünnt, auf MacConkey Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die KBE ausgezählt und entsprechend der Verdünnung hochgerechnet, um die Infektionsdosis noch einmal zu bestätigen. Als Infektionskontrolle wurden Kontrollmäuse mit PBS (Verdünnungsmedium) oral gavagiert. Nach 7 Tagen wurden Stuhlproben der Versuchstiere gesammelt, um den Titer der infizierten Tiere zu bestimmen. Hierzu wurde der Stuhl gewogen und in 1 ml PBS resuspendiert und homogenisiert. Im Anschluss wurde eine serielle Verdünnung in PBS auf MacConkey ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die KBE wurden wieder bestimmt und auf die Verdünnung hochgerechnet, um letztlich den Bakterientiter zu bestimmen. Um die Identität von *Citrobacter rodentium* in den Kolonien zu bestätigen, wurde eine Einzelkolonie der Ausstriche gepickt und mit Hilfe der PCR auf das EspB-Gen getestet. Im Agarose-Gel bildet dieses PCR-Produkt eine 95 bp große Bande.

2.2.9.2. FITC-Dextran

Die Permeabilität der Darmbarriere wird durch die Integrität zellulärer Plasmamembranen und *tight junctions* sowie durch Epithelzell-vermittelte Prozesse wie Sekretion und Absorption reguliert. Kleine Moleküle und Elektrolyte passieren *tight junctions* entlang dem Konzentrationsgradienten ohne Aufwendung von Energie (passiver Transport) (Sun *et al.*, 1998). Pathologische Zustände, die beispielsweise durch Toxine oder im Rahmen inflammatorischer Prozesse entstehen, können die intestinale Barriereintegrität nachteilig beeinflussen beziehungsweise so schwächen, dass die Translokation luminaler Bakterien und ihrer Metabolite zunimmt und damit eine Vielzahl von Erkrankungen katalysiert, die auf einer gestörten Kommunikation zwischen Mikrobiom, Wirt und Umwelt basieren (Wang *et al.*, 2015).

Die intestinale Permeabilität wurde mit Hilfe von Flourescein-Isothiocyanat konjugiertem Dextran (FITC-Dextran, 4 kDa), welches nach oraler Administration den Gastrointestinaltrakt durchquert und durch passiven Transport das intestinale Epithel durchwandert, analysiert. Hierzu wurden die Mäuse mit 150 µl einer 50 mg/ml FITC-Dextran-DPBS-Lösung oral gavagiert. Blutproben wurden aus dem Schwanz zu den Zeitpunkten 0 (Basalwert) und 4 h entnommen und das Serum spektralphotometrisch bei einer Emission von 520 nm analysiert. Als Standardreihe diente eine serielle Verdünnung von FITC-Dextran. PBS wurde als Negativkontrolle verwendet, um Hintergrundstörungen zu minimieren.

2.2.9.3. Natrium-Dextransulfat (DSS) induzierte Colitis

Das am weitesten verbreitete Maus-Modell für Colitis beinhaltet die Applikation von Natrium-Dextransulfat (*dextran sodium sulfate*-DSS). DSS ist ein chemisches Colitogen mit antikoagulanten Eigenschaften, um die intestinale Epithelschicht und damit einhergehend die Barrierefunktion zu schädigen. Der genaue Mechanismus, wie DSS eine intestinale Inflammation induziert, ist noch unklar. Es wird jedoch vermutet, dass diese das Ergebnis der Epithelschädigung und damit einhergehend der Permeabilität pro-inflammatorischer Inhalte wie zum Beispiel Bakterien und bakterieller Metabolite ist (Chassaing *et al.*, 2015; Okayasu *et al.*, 1990).

Um eine akute Inflammation zu induzieren, wurde den Mäusen 2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage verabreicht. Ab Tag 7 wurde wieder auf reguläres Trinkwasser umgestellt. Während der Experimente wurden die Mäuse täglich beobachtet und gewogen. Anhand von *scoring sheets* wurde der Zustand der Mäuse bewertet. Als Abbruchkriterien für den Tierversuch wurde ein Gewichtsverlust von > 20 % festgelegt und/oder ein stark verändertes Allgemeinverhalten.

2.2.9.4. Disease Activity Index (DAI)-Score

Um die Schwere der Colitis beurteilen zu können, wurde zusätzlich zur normalen täglichen Überwachung der *Disease Activity Index (DAI)-Score*, angelehnt an Hidalgo-Cantabrana *et al.* (2016), während der DSS-Experimente ermittelt (vgl. Tab. 16). Hierbei wurde die Gewichtsabnahme, die Konsistenz des Stuhls und der rektale Blutverlust bewertet und summiert. Die Tiere konnten somit Werte von 0 (gesund) bis 12 (schwerer Krankheitsverlauf) erreichen.

Tab. 16 | DAI-Score.

Punkte	Gewichtsabnahme	Stuhlkonsistenz	Rektale Blutung
0	< 1	Fest	Keine
1	1 - 5		
2	5 - 10	Weich	Leicht
3	10 - 15		
4	15 - 20	Diarrhö	Stark

2.2.9.5. Endoskopie

Um den Phänotyp der Mäuse so exakt wie möglich beschreiben zu können, wurden die Versuchstiere vor (Tag 0) und während der DSS-Colitis an Tag 6 und 8 endoskopierte (Storz Endoskop). Diese Zeitpunkte wurden ausgewählt, weil sich die maximale Schwere des Krankheitsverlaufs bei KO-Mäusen an Tag 7 manifestiert hat und so makroskopische Veränderungen bestmöglich beurteilt werden konnten. Als Basalwert wurde Tag 0

festgesetzt. Die Tiere wurden während der Endoskopie mit Isofluran narkotisiert. Vor Beginn der Endoskopie wurde zudem der Anus befeuchtet, um den Eingriff so minimalinvasiv wie möglich für die Tiere zu gestalten. Um die Sichtbarkeit und damit einhergehend das *Scoring* verbessern zu können, wurde der Darm während der Endoskopie durch Kohlenstoffdioxid-Insufflation dilatiert. Unter Zurückziehen des Endoskops wurde ein Video zur Dokumentation und ggf. zur Nachbewertung gedreht. Während des Eingriffs wurden die Mäuse mittels MEICS-Score (*murine endoscopic score of colitis severity*) bewertet (vgl. Tab. 17). Der MEICS-Score beinhaltet die Bewertung von Gefäßmuster, Stuhlkonsistenz, Dicke der Colonmukosa, Oberflächengranularität und das Vorhandensein von Fibrinbelägen (Becker *et al.*, 2005).

Tab. 17 | MEICS-Score.

Punkte	Gefäßmuster	Stuhlkonsistenz	Dicke Colonmukosa	Fibrin	Granularität
3	Blutungen	Flüssig	Intransparent	Extrem	Extrem
2	Nicht sichtbar	Ungeformt	Stark	Stark	Stark
1	Verstrichen	Leicht geformt	Moderat	Moderat	Moderat
0	Normal	Fest	Transparent	Keine	Keine

2.2.10. Patientenmaterial

Es wurden Gewebeproben (mindestens vier aus verschiedenen Colonabschnitten) von insgesamt 23 Patient:innen mit M. Crohn (jeweils in aktiver Erkrankung oder unter Remission) und 14 Patient:innen mit Colitis ulcerosa sowie 10 Kontrollen untersucht. Kontrollen setzen sich aus Patient:innen zusammen, bei denen der Verdacht einer Darmerkrankung bestand, jedoch nicht bestätigt werden konnte, beziehungsweise Patient:innen die zur Tumorstudie untersucht wurden (Untersuchungen genehmigt durch das Ethikvotum PV4444 bei der Ethikkommission Hamburg und durchgeführt durch Dr. med. Carolin Manthey). Das mittlere Alter der CED-Patient:innen lag zwischen 37 und 48 Jahren. Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Analyse verwahrt. Nach RNA-Isolation erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression mittels qRT-PCR (vgl. 2.2.3.3).

2.2.11. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 8. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM-*standard error of the mean*) dargestellt. Für die Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test und für Vergleiche von multiplen Gruppen der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test verwendet. Signifikante Unterschiede wurden anerkannt, wenn $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) war.

3. ERGEBNISSE

3.1. Erhöhte Expression von *Pdgfra* und *Pdgfrβ* im entzündeten Colongewebe in Patient:innen mit aktivem M. Crohn und Mäusen mit DSS-Colitis

Um die Grundlage für eine tierexperimentell-translazionale Studie zu schaffen, wurden zu Beginn dieser Arbeit Gewebeproben aus verschiedenen Abschnitten des Colons von Patient:innen mit M. Crohn, Colitis ulcerosa sowie Kontrollen entnommen und die relativen Expressionen von *Pdgfra* und *Pdgfrβ* auf mRNA-Ebene untersucht. Als *Housekeeping* Gen wurde *Hprt* verwendet.

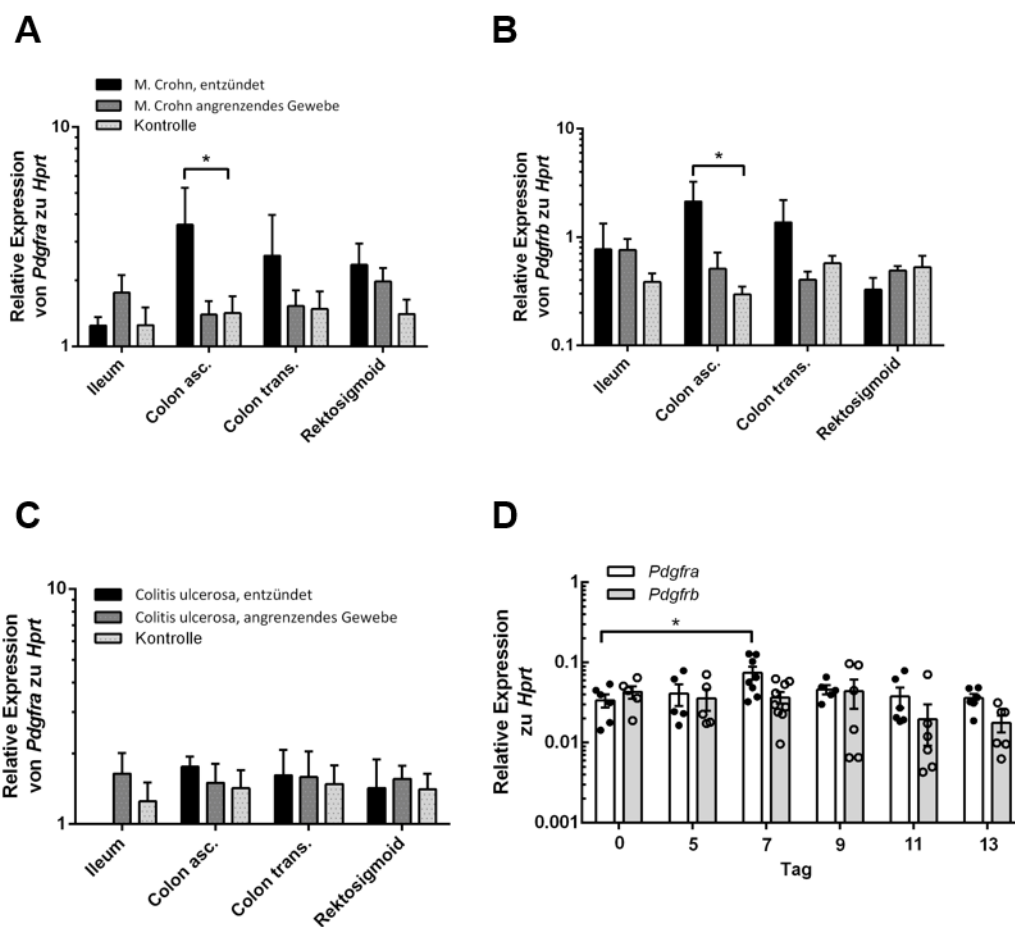


Abb. 9 | Hochregulierung von PDGFRs im Colongewebe von CED-Patient:innen und Mäusen mit DSS-Colitis. Relative Expressionen (*gepoolte* Daten; normalisiert auf *Hprt*; bestimmt mittels qRT-PCR; dargestellt als Mittelwert \pm SEM) von **A** *Pdgfra* und **B** *Pdgfrβ* wurden in Gewebeproben aus verschiedenen Darmabschnitten von Patient:innen mit M. Crohn im Vergleich zu Kontrollen, **C** Relative Expression von *Pdgfra* in Gewebeproben aus den verschiedenen Darmabschnitten von Patient:innen mit C. ulcerosa im Vergleich zu Kontrollen und **D** C57BL/6J Mäuse wurden mit 2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage behandelt und die relativen Expressionen von *Pdgfra* und *Pdgfrβ* an Tag 0 (n=6), 5 (n=5), 7 (n=8), 9 (n=6), 11 (n=6) und 13 (n=6) bestimmt, *p<0,05.

In Patient:innen mit aktivem M. Crohn zeigt sich durchschnittlich eine 2,5-fach höhere relative Expression von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene ($p = 0,0095$) im aufsteigenden Colon (*Colon ascendens*) im Vergleich zu Kontrollen (vgl. Abb. 9A). Die relative Expression von *Pdgfrβ* auf mRNA-Ebene ist im *Colon ascendens* in Patient:innen mit aktivem M. Crohn im Mittel 1,1-fach höher ($p = 0,0048$) als in Kontrollen (vgl. Abb. 9B). Die Expressionen von

Pdgfr α und *Pdgfr β* auf mRNA-Ebene im angrenzenden Gewebe (*Colon ascendens*) im Vergleich zu Kontrollen in M. Crohn-Patient:innen unterscheiden sich nicht signifikant. Weiterhin ergeben sich weder im *Ileum* (Krummdarm/distaler Abschnitt des Dünndarms) noch in anderen Abschnitten des Dickdarms (*Colon transversum* & Rektosigmoid) Unterschiede in den Expressionen von *Pdgfr α* und *Pdgfr β* auf mRNA-Ebene. Ferner können keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression von *Pdgfr α* auf mRNA-Ebene in Colitis ulcerosa-Patient:innen (aktiv) im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden (vgl. Abb. 9C). Ergänzend zu den humanen Daten zeigen C57BL/6J-Mäuse im Verlauf einer DSS-induzierten Colitis (2,5 % für 7 Tage) an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle (Tag 0) eine signifikante Hochregulierung von *Pdgfr α* ($p = 0,0293$) (vgl. Abb. 9D).

3.2. Effektive Deletion von PDGFR- α aus myeloiden Leukozyten

In der frühen Entwicklung spielt PDGF-A eine wichtige Rolle in der Villus-Genese des Darms. PDGF-A KO-Mäuse weisen hierbei eine deutlich reduzierte Anzahl an intestinalen Villi sowie eine gestörte Krypten-Architektur auf (Karlsson *et al.*, 2000). PDGF-A wird normalerweise im intestinalen Epithel gebildet und kann dadurch die Proliferation von PDGFR- α positiven mesenchymalen Zellen fördern, die wiederum Villus-Cluster bilden, um die Faltung des Epithels zu bewirken. Ist dieses Clustering gestört, kommt es zu einer fehlerhaften Villusproliferation. Eine ubiquitäre Inaktivierung von PDGFR- α würde demnach eine frühe postnatale Letalität implizieren (Hoch & Soriano, 2003). In der adulten intestinalen Mukosa sind es vor allem mononukleare Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen, die PDGFs und ihre Rezeptoren exprimieren (Heldin & Westermark, 1999). Makrophagen werden zudem als wichtige Regulatoren der intestinalen Homöostase angesehen, da sie an der Toleranzwirkung gegenüber harmlosen Antigenen sowie an der Abwehr potenzieller Pathogene beteiligt sind und damit einhergehend auch eine bedeutsame Funktion in CED einnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine konditionelle Deletionsstrategie in Immunzellen der myeloiden Blutzelllinie (Deletion in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten) mittels Cre-Lox-System angewendet, um einerseits die oben genannte postnatale Letalität zu umgehen, andererseits, um die spezifische Funktion von PDGFR- α in Makrophagen untersuchen zu können. Hierzu wurden PDGFR- α -gefloxt (*PDGFR- α ^{+/+}*) Mäuse mit *LysM-Cre/+* Mäusen verpaart, sodass PDGFR- α in myeloiden Zellen spezifisch deletiert wurde (*LysM-PDGFR- α ^{-/-}*) (vgl. Abb. 10A). Bei der Cre-Lox-Strategie werden die Exons 2 bis 4 der PDGFR- α -Gensequenz von loxP-Stellen flankiert, die dann zellspezifisch von der Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden können (vgl. Abb. 10B).

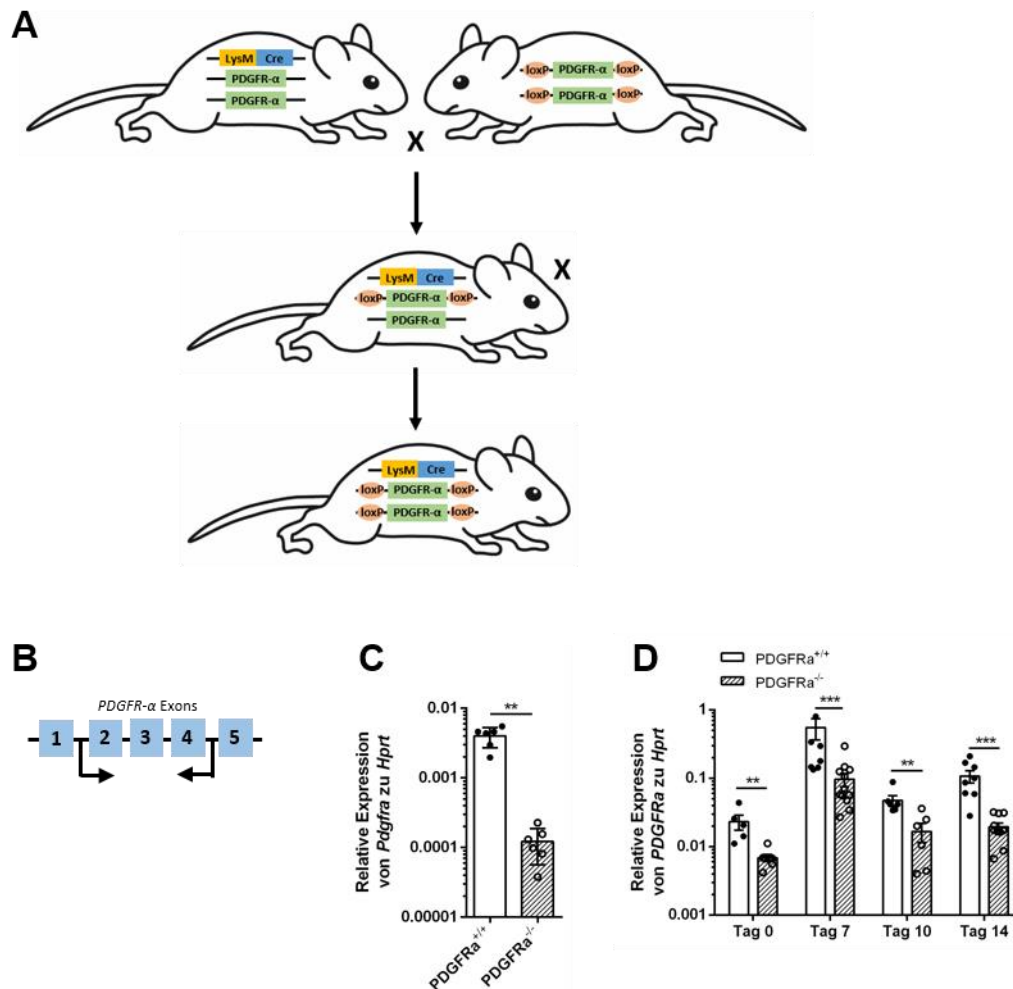


Abb. 10 | Deletion von PDGFR- α aus myeloiden Zellen mittels konditionellen *Knockouts*. PDGFR- α wurde mittels Cre-Lox-System in murinen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen deletiert, **A** Schematische Darstellung des Cre-Lox-Systems zur Generierung eines homozygoten konditionellen PDGFR- α -KO in myeloiden Zellen mittels LysM-Cre **B** Die Exons 2 bis 4 der PDGFR- α -Gensequenz sind durch loxP-Stellen flankiert, sodass die Cre-Rekombinase an diesen Stellen das Zielgen ausschneiden kann, **C** Relative Expression von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene in BMDMs aus 8-Wochen alten LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ Geschwistertieren (n=6) und **D** Relative Expression von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene im Colon von 8-Wochen alten LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ Geschwistertieren an Tag 0 (n=5), 7 (n=7-11), 10 (n=6) und 14 (n=8) der DSS-Colitis (bestimmt mittels qRT-PCR; normalisiert auf *Hprt*; dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **p<0,01 und ***p<0,001.

Die erfolgreiche Deletion von PDGFR- α in myeloiden Zellen wurde mit Hilfe der qRT-PCR in BMDMs überprüft. Hierbei zeigen BMDMs aus LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine signifikant niedrigere Expression (p = 0,0022) von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 10C). Zusätzlich wurde die Expression von *Pdgfra* im gesamten Colon mittels qRT-PCR überprüft, um, zum einen den *Knockout* in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zu verifizieren. Zum anderen, um myeloide Zellen als Zielzellen zu identifizieren. Hierbei zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren (LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$) eine signifikant niedrigere Expression (p = 0,0003, p = 0,0087, p = 0,0002) von *Pdgfra* zu allen Zeitpunkten der DSS-induzierten Colitis als auch im *steady state* (p = 0,0051) (vgl. Abb. 10D).

3.3. Protektive Funktion von myeloidem PDGFR- α in intestinaler Inflammation (DSS-Modell)

Die CED-Pathogenese resultiert aus einem Zusammenspiel von genetischer Suszeptibilität, Umwelteinflüssen und dem Mikrobiom. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Dysbiose der intestinalen mikrobiellen Komposition zur Pathogenese von CED beitragen kann (Frank *et al.*, 2007; Sartor & Wu, 2017). Die DSS-Colitis gilt hierbei als etabliertes Modell zur Untersuchung einer CED-artigen Entzündung im Mauscolon. Es handelt sich dabei um eine chemisch ausgelöste Colitis, deren Maximum der Entzündung im distalen Colon liegt. Die histologischen Veränderungen ähneln denen der Patient:innen mit CED (Neutrophilen-Infiltrierung der Mukosa, Kryptitis und Kryptenabszesse). Um einen Einfluss des Mikrobioms im Hinblick auf die Funktion von PDGFR- α in intestinaler Inflammation in den Experimenten minimieren zu können, wurden 4-Wochen alte LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere nach ihren Genotypen getrennt (SH = *separate housing*), um einen Mikrobiom-Austausch durch Koprophagie zu vermeiden. Eine akute Colitis wurde anschließend in 8-Wochen alten SH Mäusen mit 2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage induziert. Ab Tag 7 wurden die Versuchstiere wieder mit Wasser *ad libitum* gehalten. Die Organentnahmen erfolgten an drei verschiedenen Zeitpunkten der DSS-Colitis (Tag 0 (Kontrolle), Tag 7, Tag 10 und Tag 14), um sowohl die Funktion von PDGFR- α während akuter Inflammation als auch in der Resolutionsphase analysieren zu können (vgl. Abb. 11A). Als Kontrollen dienen hier unbehandelte Tiere. Der Verlust von PDGFR- α in myeloiden Zellen führt zu einer Aggravation der DSS-Colitis in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen. So zeigen SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse ab Tag 3 der DSS-Colitis einen signifikant höheren Gewichtsverlust gegenüber LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen, die erst ab dem 5. Tag eine Gewichtsreduktion aufweisen. Zudem verlieren LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse bis Tag 8 der DSS-Colitis insgesamt ungefähr 20 % ihres Ausgangsgewichts, wohingegen LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäuse bis Tag 10 der DSS-Colitis nur ungefähr 15 % ihres Ausgangsgewichts verlieren (vgl. Abb. 11B). Komplementär zum Gewichtsverlauf zeigen sich auch signifikante Unterschiede im Krankheitsverlauf. Hier zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen von Tag 4 bis 11 der DSS-Colitis einen signifikant höheren *Disease Activity Index (DAI)-Score* (vgl. Abb. 11C). Damit einhergehend bestätigt die endoskopische Untersuchung der Tiere eine signifikant stärkere intestinale Inflammation in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen an Tag 6 ($p = 0,0001$) und Tag 8 ($p = 0,00119$) der DSS-Colitis. Daneben zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse bereits im *steady state* (Tag 0) einen signifikant höheren Endoskopie-Score ($p = 0,0108$) im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen (vgl. Abb. 11D). Weiterhin zeigt sich im Verlauf der Experimente eine deutlich höhere Mortalität ab Tag 5 der DSS-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen. So überleben insgesamt nur 25 % der LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse bis zum Versuchsende (vgl. Abb. 11E).

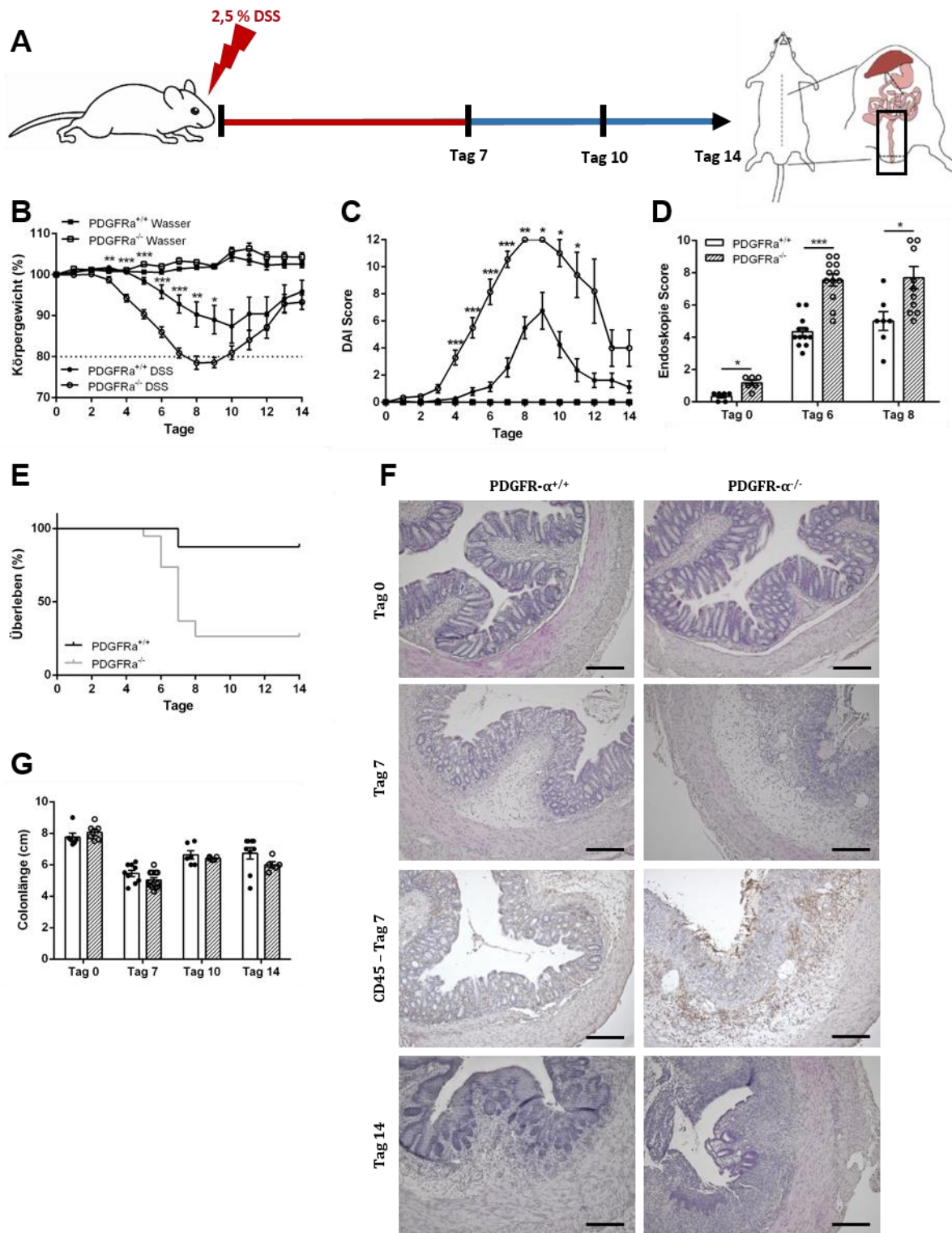


Abb. 11 | Charakteristika der DSS-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (*separate housing*). DSS-Colitis (2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage) wurde in 8-Wochen alten LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertieren (*separate Housing*) induziert (*gepoolte* Daten aus drei Experimenten; Tag 0 (n=5-6), 7 (n=9-12), 10 (n=6) und 14 (n=8-12) (dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs, **B** Gewichtsverlauf über einen Zeitraum von 14 Tagen, **C** Disease Activity Index-Score über einen Zeitraum von 14 Tagen, **D** Endoskopie-Scores an Tag 0 (n=6), 6 (n=12) und 8 (n=7-10), **E** Prozentuale Überlebenskurve **F** Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Tag 0, 7 und 14 und immunhistochemische Färbung von CD45⁺ Zellen an Tag 7 von repräsentativen Colonsegmenten (Skalierung: 100 μ m), **G** Colonlänge an Tag 0, 7, 10 und 14, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

Auch die histologische Untersuchung der Colonsegmente an Tag 7 und 14 der DSS-Colitis mittels HE-Färbung zeigt eine deutlich stärkere Inflammation in *LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$* -Mäusen, charakterisiert durch eine erhöhte submukosale Leukozyten-Infiltrierung (Tag 7), die Verdickung des Colons und den Verlust der Krypten-Struktur. Im *steady state* zeigen sich keine histologischen Unterschiede zwischen den Genotypen (vgl. Abb. 11F). Am Tag der Organentnahme wurde zudem die Länge der Colonsegmente bestimmt, da dies als ein zusätzlicher Indikator für die Schwere der Colitis fungiert (Kim *et al.*, 2012). Hier zeigen sich keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Colonlänge vor (7,9/8 cm) und während DSS-Colitis an Tag 7 (5,4/5 cm), 10 (6,9/6,8 cm) und 14 (6,9/6,2 cm), jedoch verringert sich die Colonlänge in beiden Genotypen im Colitis-Verlauf ähnlich stark im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 11G).

Makrophagen nehmen als vielseitige Zellen eine zentrale Rolle in Inflammation, Wundheilung sowie der Homöostase und dem Gewebeumbau ein. Die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen resultiert in einem anti-inflammatorischen Phänotyp, wobei die bakterizide Aktivität beibehalten wird (Smythies *et al.*, 2005). Die exakten Mechanismen der Differenzierung sind bisher noch unklar, jedoch induzieren Zytokine wie TGF- β und IL-10 zumindest einige Eigenschaften dieser intestinalen Makrophagen (Platt & Mowat, 2008). Um Makrophagen und ihre Subpopulationen näher zu phänotypisieren, wurden *Lamina Propria* (LP)-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei manifestiert sich ein Verlust von anti-inflammatorischen Zellen und eine Akkumulation von pro-inflammatorischen Zellen in *LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$* -Mäusen. So zeigen *LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$* -Mäuse sowohl an Tag 7 ($p = 0,0002$) und Tag 10 ($p = 0,0022$) der DSS-Colitis als auch bereits im *steady state* ($p = 0,0079$) signifikant höhere Frequenzen an Leukozyten, charakterisiert als CD45⁺ Zellen (vgl. Abb. 12A). Weiterhin manifestiert sich eine signifikant verringerte Anzahl an Neutrophilen, definiert als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen (Daley *et al.*, 2008), im *steady state* in *LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$* -Mäusen, jedoch nicht während aktiver Colitis (vgl. Abb. 12B). *LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$* -Mäuse zeigen zudem signifikant höhere Frequenzen an Monozyten, definiert als CD11b⁺ Ly6C^{hoch} Zellen (Geissmann *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2019), an Tag 0 ($p = 0,0476$) und an Tag 7 ($p = 0,0124$) der DSS-Colitis. Während der Resolution hingegen, können keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Monozyten-Anzahl nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12C). Daneben zeigen sich unabhängig vom Colitis-Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede in den Gesamtfrequenzen an infiltrierenden Makrophagen (F4/80^{int} Zellen) (vgl. Abb. 12D). Auch die Frequenz von pro-inflammatorischen Makrophagen, definiert als F4/80^{int} MHCII⁺ CD80⁺ Zellen (Nathan, 1983; Orecchioni *et al.*, 2019), vor und während der DSS-Colitis ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen *LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$* - und *LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$* -Mäusen. Es zeichnet sich dennoch ein Trend ($p = 0,0823$) an Tag 10 der DSS-Colitis ab. So deutet sich hier eine leicht erhöhte Frequenz an infiltrierenden

CD80⁺ Makrophagen in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen an (vgl. Abb. 12E). Darüber hinaus weisen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse signifikant niedrigere Frequenzen an infiltrierenden und residenten MHCII⁺ CD206⁺ Makrophagen im *steady state* ($p = 0,0079$) und während aktiver Colitis an Tag 7 ($p = 0,0426/p = 0,0031$) auf (vgl. Abb. 12F & H). Diese Makrophagen können dem anti-inflammatorischen Phänotyp zugeordnet werden (Stein *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2021). In der Gesamtfrequenz an Gewebe-residenten Makrophagen, definiert als F4/80^{hoch} Zellen, können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden, jedoch zeigt sich im Colitis-Verlauf an Tag 7 und 10 ein leichter Abfall der Frequenzen dieses Zelltyps in allen Tieren (vgl. Abb. 12G). Ferner zeichnet sich auch an Tag 10 der DSS-Colitis ein Trend ($p = 0,0931$) im Hinblick auf dendritische Zellen, definiert als CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen (Pulendran *et al.*, 1997; Shortman & Liu, 2002), ab. So zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse zu diesem Zeitpunkt eine leicht verringerte Anzahl dieses Zelltyps, jedoch nicht während aktiver Colitis und auch nicht im *steady state* (vgl. Abb. 12I).

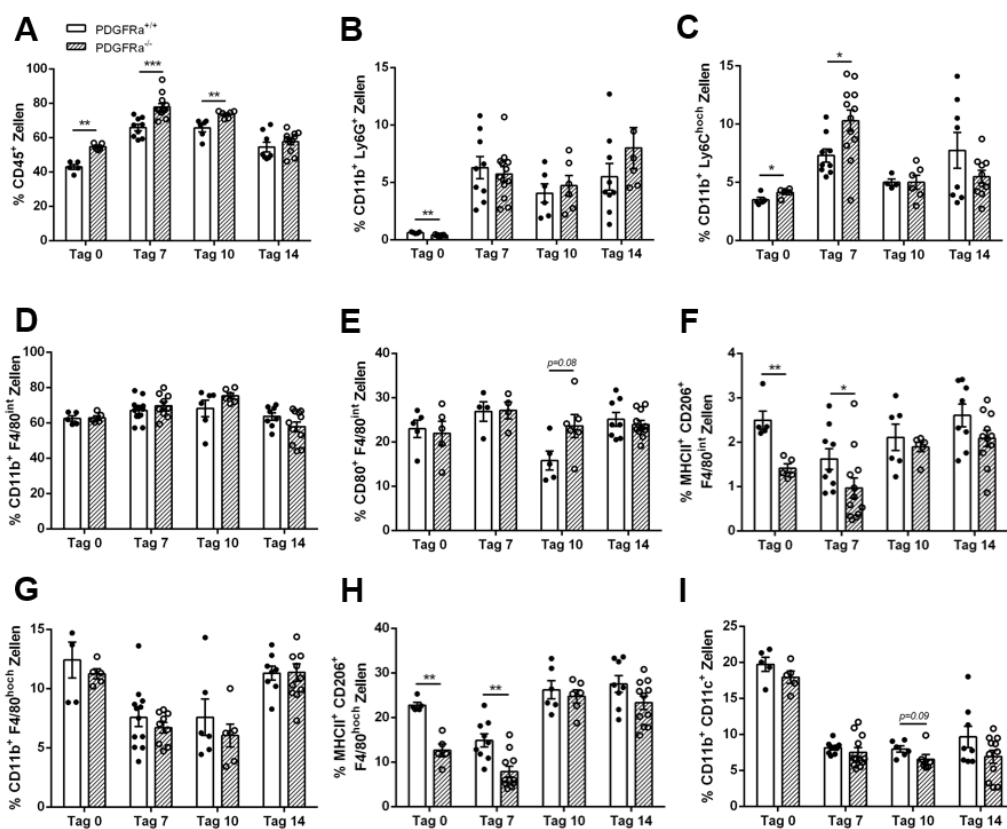


Abb. 12 | Durchflusszytometrische Analyse von LP-Immunezellen aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/±}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis (*separate housing*). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/±}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt, DSS-Colitis im Alter von 8 Wochen induziert (2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage) und LP-Zellpopulationen durchflusszytometrisch an Tag 0 ($n=5$), 7 ($n=9$), 10 ($n=6$) und 14 ($n=8-11$) der DSS-Colitis (*gepoolte* Daten aus drei Experimenten) bestimmt (dargestellt als prozentualer Mittelwert \pm SEM), **A** Leukozyten, charakterisiert als CD45⁺ Zellen **B** Neutrophile, charakterisiert als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen **C** Monozyten, charakterisiert als CD11b⁺ Ly6C^{hoch} Zellen, **D** Infiltrierende F4/80^{int} Makrophagen **E** Infiltrierende pro-inflammatorische CD80⁺ Makrophagen **F** Infiltrierende anti-inflammatorische Makrophagen, charakterisiert als MHCII⁺ CD206⁺ F4/80^{int} Zellen, **G** Residente F4/80^{hoch} Makrophagen, **H** Residente anti-inflammatorische Makrophagen, charakterisiert als MHCII⁺ CD206⁺ F4/80^{hoch} Zellen und **I** Dendritische Zellen, als CD11b⁺ CD11c⁺ definiert, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p > 0,001$.

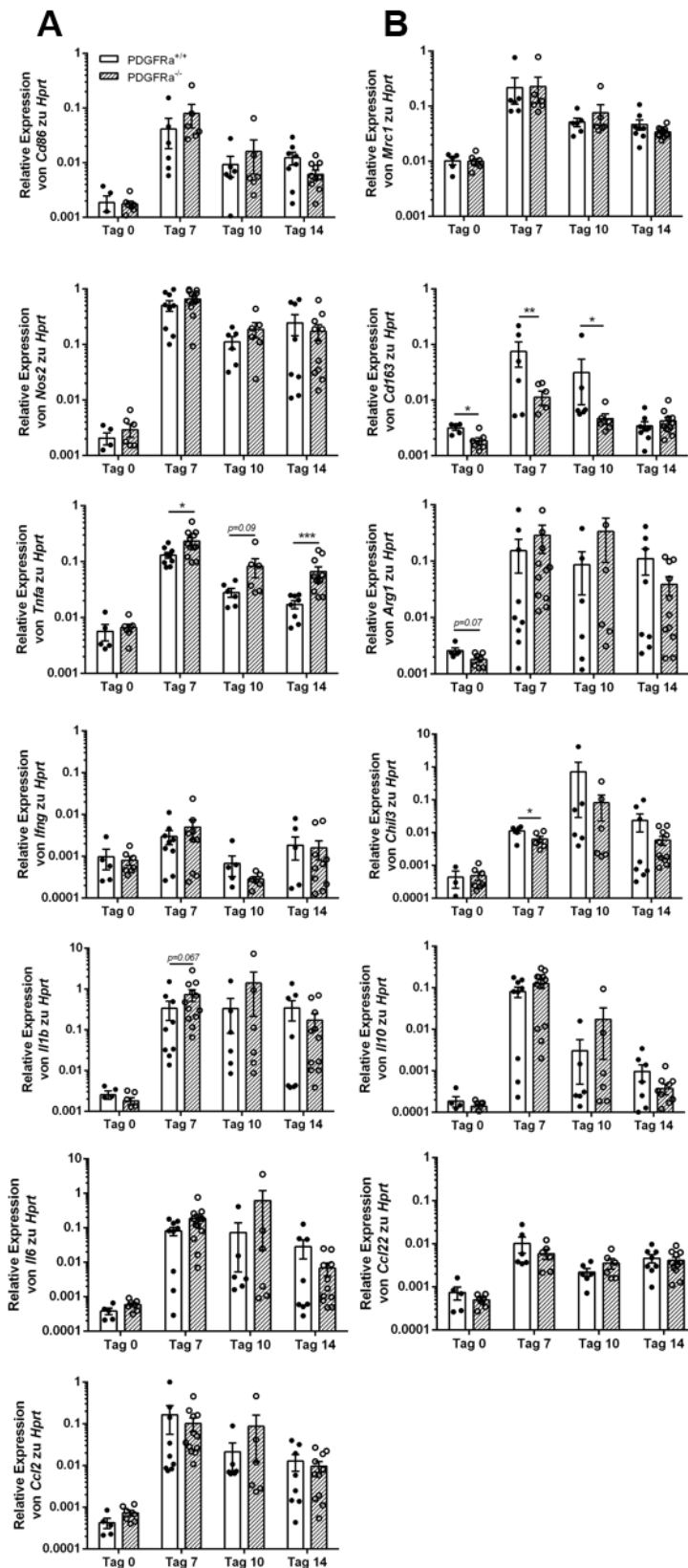


Abb. 13 | Analyse der Genexpression im Colon von LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis (*separate housing*). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt, DSS-Colitis im Alter von 8 Wochen induziert (2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage) und relative Expressionen mittels qRT-PCR an Tag 0 (n=3-5), 7 (n=6-11), 10 (n=6) und 14 (n=6-11) der DSS-Colitis (*gepoolte* Daten aus drei Experimenten) im Colongewebe bestimmt (normalisiert auf *Hprt*; dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A Relative Expressionen von pro-inflammatorischen Genen auf mRNA-Ebene und **B** Relative Expressionen von anti-inflammatorischen Genen auf mRNA-Ebene, * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$ und *** $p < 0,001$.**

Weiterhin zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen eine stärkere Hochregulierung von *Tnfa* auf mRNA-Ebene an Tag 7 ($p = 0,0183$), 10 ($p = 0,0931$) und 14 ($p = 0,0008$), jedoch nicht im *steady state*. Ferner zeichnet sich der Trend einer höheren Expression von *Il1b* an Tag 7 ($p = 0,067$) auf mRNA-Ebene in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen ab. Keine signifikanten Unterschiede in den Expressionen von anderen pro-inflammatorischen Genen wie *Cd86*, *Nos2*, *Il6*, *Ifny* und *Ccl2* auf mRNA-Ebene können zwischen LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen vor und während DSS-Colitis nachgewiesen werden (vgl. Abb. 13A). Komplementär zur Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Gene zeigt sich eine partiell niedrigere Expression anti-inflammatorischer Gene in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen. Hierbei wird der *Scavenger-Rezeptor Cd163* in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im *steady state* ($p = 0,0101$) und an Tag 7 ($p = 0,0012$) und 10 ($p = 0,026$) der DSS-Colitis sowie *Chitinase-like 3 (Ym1/Chil3)* an Tag 7 ($p = 0,0411$) der DSS-Colitis auf mRNA-Ebene weniger stark exprimiert als in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen. Daneben deutet sich eine niedrigere Expression von *Arginase 1 (Arg1)* an Tag 0 ($p = 0,0732$) auf mRNA-Ebene an. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ergeben sich in den Expressionen von *Mrc1* (CD206), *Il10* und *Ccl22* auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 13B).

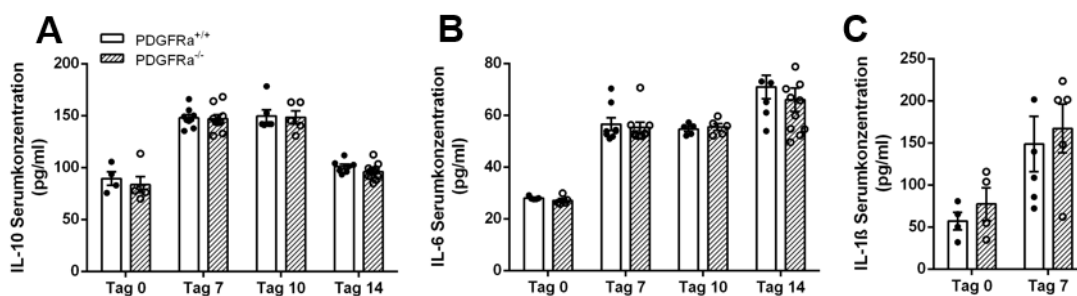


Abb. 14 | Serumkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen während DSS-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (*separate housing*). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt, DSS-Colitis im Alter von 8 Wochen induziert (2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage) und Zytokinkonzentrationen mittels ELISA an Tag 0 ($n=4-5$), 7 ($n=5-9$), 10 ($n=6$) und 14 ($n=5-11$) der DSS-Colitis (*gepoolte* Daten aus drei Experimenten) im Serum bestimmt (dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A** IL-10 Konzentrationen, **B** IL-6 Konzentrationen und **C** IL-1 β Konzentration

Ergänzend zur Expressionsanalyse pro- und anti-inflammatorischer Gene wurden die Konzentrationen von IL-6, IL-1 β und IL-10 im Serum der Versuchstiere vor und während der DSS-Colitis mittels ELISA bestimmt. Hier können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. So zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse ähnliche Konzentrationen von IL-10 (vgl. Abb. 14A), IL-6 (vgl. Abb. 14B) und IL-1 β (vgl. Abb. 14C) im Serum. Eine allgemeine Induktion von IL-10, IL-6 und IL-1 β zeigt sich im Verlauf der DSS-Colitis in allen Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

3.4. Protektive Funktion von myeloidem PDGFR- α während bakterieller Infektion

Bakterielle Infektionen des Gastrointestinaltrakts mit Enteropathogenen wie *Escherichia coli* (EPEC) und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) verursachen charakteristische *attaching and effacing* (A/E) Läsionen im infizierten Darm durch enges Anheften an Enterozyten, die Auslöschung von Mikrovilli-Strukturen und den Umbau des intestinalen Epithels (Kai *et al.*, 2010; Clements *et al.*, 2012). Da bekannt ist, dass *Citrobacter rodentium* die Barriereintegrität des Epithels, die mukosale Wundheilung, Inflammation und die Komposition der kommensalen Mikroflora reguliert, bietet die Infektion mit diesem Mauspathogen ein robustes Modell, um die Pathogenese von humanen intestinalen Dysfunktionen wie zum Beispiel M. Crohn näher untersuchen zu können (Collins *et al.*, 2014; Pickard *et al.*, 2014). Um die Pathogen-Wirts-Interaktion während intestinaler Inflammation im Kontext einer bakteriell induzierten Colitis und im Hinblick auf die Pathogenese von CED näher zu untersuchen, wurde daher als zweites Colitis-Modell die Infektion mit *C. rodentium* gewählt. Eine akute Colitis wurde hierzu in 8-Wochen alten SH Mäusen mittels oraler Gavage mit $2 \cdot 10^9$ koloniebildenden Einheiten (KBE) *C. rodentium* induziert. Die Kontrolltiere wurden gleichzeitig mit PBS behandelt. Die Organentnahme erfolgte an Tag 14 der Infektion (vgl. Abb. 15A).

Auch im *Citrobacter*-Modell führt die Defizienz von PDGFR- α in myeloiden Zellen zu einer Aggravation der Colitis. So zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse gegenüber LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen in der späten Infektionsphase, ab Tag 11, einen signifikant höheren Gewichtsverlust. LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäuse hingegen, weisen bis zum Versuchsende eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 3 % auf, wohingegen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Mittel 5 % ihres Ausgangsgewichts verlieren (vgl. Abb. 15B). Komplementär zum Gewichtsverlauf zeigen sich auch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen in der intestinalen Infektionslast durch *C. rodentium*. Hier zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren an Tag 7 ($p = 0,0399$) und 14 ($p = 0,0502$) der Infektion eine signifikant höhere Bakterienkolonisierung durch *C. rodentium*, gemessen an KBE/g Stuhl (vgl. Abb. 15C). In der Colonlänge hingegen, zeigen sich keine Genotypspezifischen Unterschiede in den infizierten Mäusen (vgl. Abb. 15D). Die histologische Untersuchung der Colonsegmente mittels HE-Färbung zeigt an Tag 14 der Infektion eine deutlich stärkere Inflammation in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, charakterisiert durch eine erhöhte Leukozyten-Infiltrierung der LP sowie epitheliale Hyperplasie. Im *steady state* können keine histologischen Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15E). Weiterhin wurde die *C. rodentium*-Infektion durch den Nachweis des enterobakteriellen EspB-Gens, welches für das *type-III-secreted pore-forming protein* kodiert, mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese (Bande bei 95 bp) verifiziert

(vgl. Abb. 15F). Das EspB-Protein ist essenziell in der Pathogenese von EPEC und EHEC (Flores *et al.*, 2002) und auch in *C. rodentium* konserviert (McKeel *et al.*, 2002).

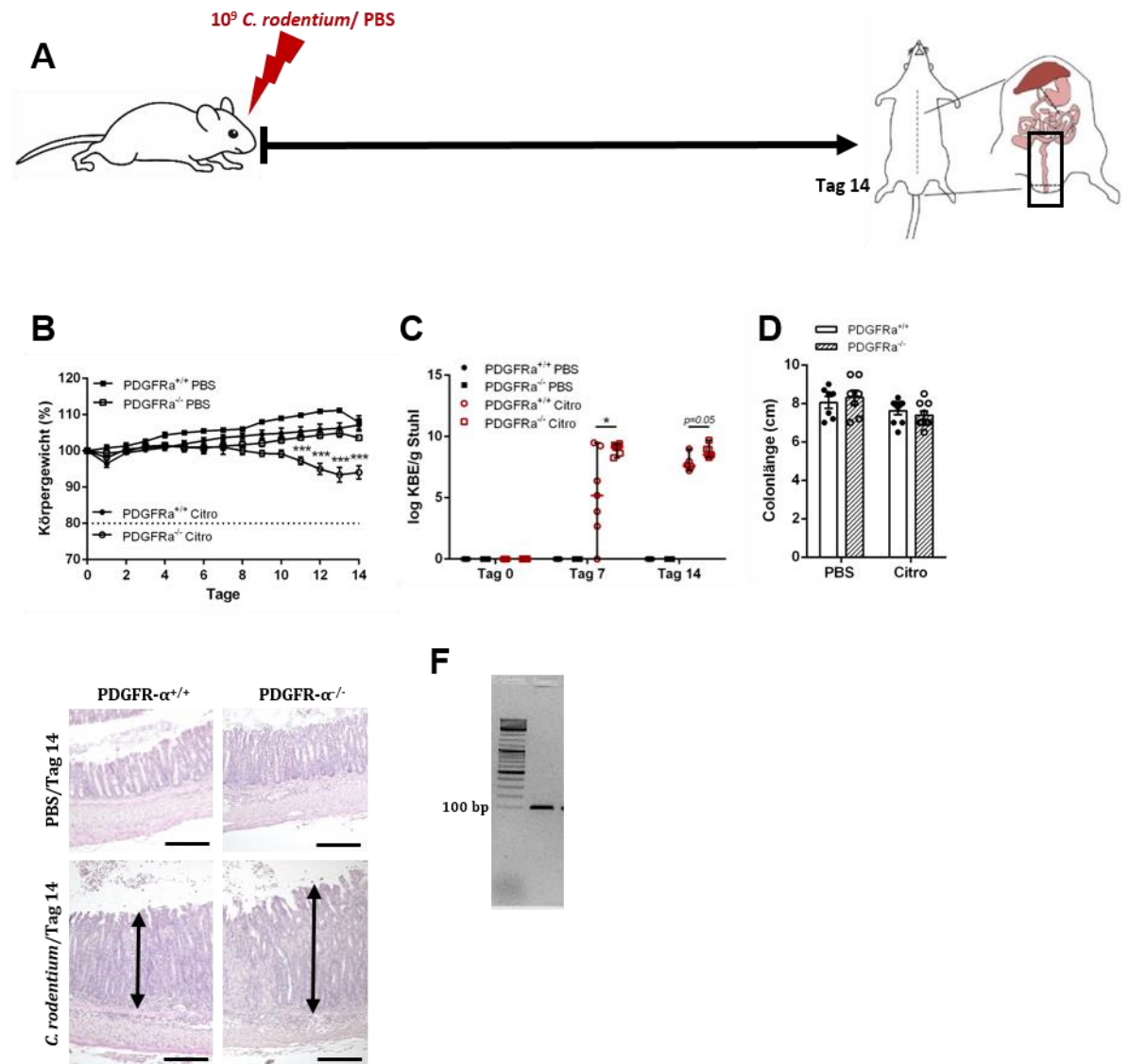


Abb. 15 | Charakteristika der *C. rodentium*-induzierten Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (separate housing). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt und im Alter von 8 Wochen entweder mit 10^9 *C. rodentium* Suspension (n=9) oder PBS (n=7) gavagiert (dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs, **B** Gewichtsverlauf über einen Zeitraum von 14 Tagen, **C** log Koloniebildende Einheiten (KBE)/g Stuhl an Tag 0, 7 und 14 (dargestellt als Median \pm Variationsbreite), **D** Colonlänge an Tag 14, **E** Hämatoxylin-Eosin-Färbung von repräsentativen Colonsegmenten an Tag 14 (Skalierung: 100 μ m) und **F** PCR-Nachweis von *C. rodentium*, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

Die durchflusszytometrische Analyse von LP-Zellen kann auch bei der *C. rodentium*-induzierten Colitis den Verlust von anti-inflammatorischen Makrophagen und die Akkumulation von pro-inflammatorischen Effektorzellen in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen verifizieren. Eine erhöhte Leukozyten-Anzahl (p = 0,0728) in unifizierten LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, wie sie sich auch schon in vorherigen DSS-Experimenten im *steady state* gezeigt hat, zeichnet sich auch hier ab, jedoch zeigen alle infizierten Tiere an Tag 14 eine vergleichbare Frequenz an CD45⁺ Zellen (vgl. Abb. 16A). Daneben weisen infizierte LysM-

PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse eine erhöhte Frequenz an pro-inflammatorischen Effektorzellen wie Neutrophilen, definiert als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen ($p = 0,0033$), und infiltrierenden CD80⁺ MHCII⁺ Makrophagen ($p = 0,0074$) auf (vgl. Abb. 16B & E). Weiterhin konnte eine höhere Frequenz an inflammatorischen Monozyten (CD11b⁺ Ly6C^{hoch}) in PBS-Kontrollen nachgewiesen werden ($p = 0,0973$), jedoch nicht in infizierten Tieren (vgl. Abb. 16C). In den Gesamtfrequenzen infiltrierender Makrophagen (F4/80^{int} Zellen) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen, jedoch manifestiert sich in infizierten Tieren gegenüber PBS-Kontrollen ein genereller Abfall der Frequenzen dieses Zelltyps (vgl. Abb. 16D). Sowohl in PBS- als auch in *Citrobacter*-gavagierten LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zeigt sich im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen eine signifikant niedrigere Frequenz an infiltrierenden anti-inflammatorischen MHCII⁺ CD206⁺ Makrophagen ($p = 0,007/p = 0,0028$) (vgl. Abb. 16F) und dendritischen Zellen (CD11b⁺ CD11c⁺) ($p = 0,0414/p = 0,0040$) (vgl. Abb. 16I). Keine Unterschiede in den Frequenzen Gewebe-residenter Makrophagen (F4/80^{hoch} Zellen) können in uninfizierten und infizierten Mäusen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 16G). Eine signifikant niedrigere Frequenz an residenten MHCII⁺ CD206⁺ Makrophagen ($p = 0,0262$) kann in infizierten LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, jedoch nicht in PBS-Kontrollen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 16H).

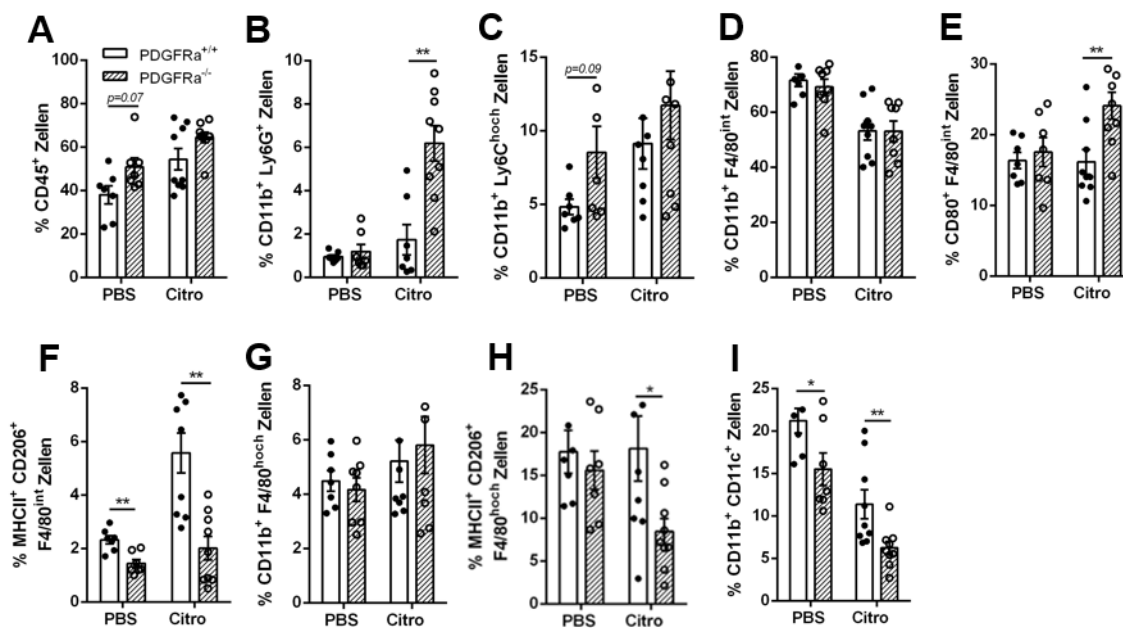


Abb. 16 | Durchflusszytometrische Analyse von LP-Immunzellen aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während *C. rodentium*-Colitis (separate housing). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt, *C. rodentium*-Colitis im Alter von 8 Wochen induziert (Gavage mit 10^9 Bakterien ($n=9$) oder PBS ($n=7$); gepoolte Daten aus zwei Experimenten) und LP-Zellpopulationen durchflusszytometrisch nach 14 Tagen bestimmt (dargestellt als prozentualer Mittelwert \pm SEM), **A** Leukozyten, charakterisiert als CD45⁺ Zellen **B** Neutrophile, charakterisiert als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen, **C** Monozyten, charakterisiert als CD11b⁺ Ly6C^{hoch} Zellen, **D** Infiltrierende F4/80^{int} Makrophagen, **E** Infiltrierende pro-inflammatorische CD80⁺ Makrophagen, **F** Infiltrierende anti-inflammatorische Makrophagen, charakterisiert als MHCII⁺CD206⁺ F4/80^{int} Zellen, **G** Residente F4/80^{hoch} Makrophagen **H** Residente anti-inflammatorische Makrophagen, charakterisiert als MHCII⁺ CD206⁺ F4/80^{hoch} Zellen und **I** Dendritische Zellen, charakterisiert als CD11b⁺ CD11c⁺, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Die Expressionsanalyse verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Gene verifiziert partiell Ergebnisse aus DSS-Experimenten. So deutet sich in *C. rodentium*-infizierten LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine stärkere Hochregulierung von *Il1b* ($p = 0,0973$) und *Ifny* ($p = 0,0973$) auf mRNA-Ebene an, wobei kein signifikanter Genotyp-spezifischer Unterschied in der Expression von *Tnfa* nachgewiesen werden kann. Interessanterweise kann in infizierten LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren eine stärkere Hochregulierung von *Il6* auf mRNA-Ebene ($p = 0,0379$) gezeigt werden.

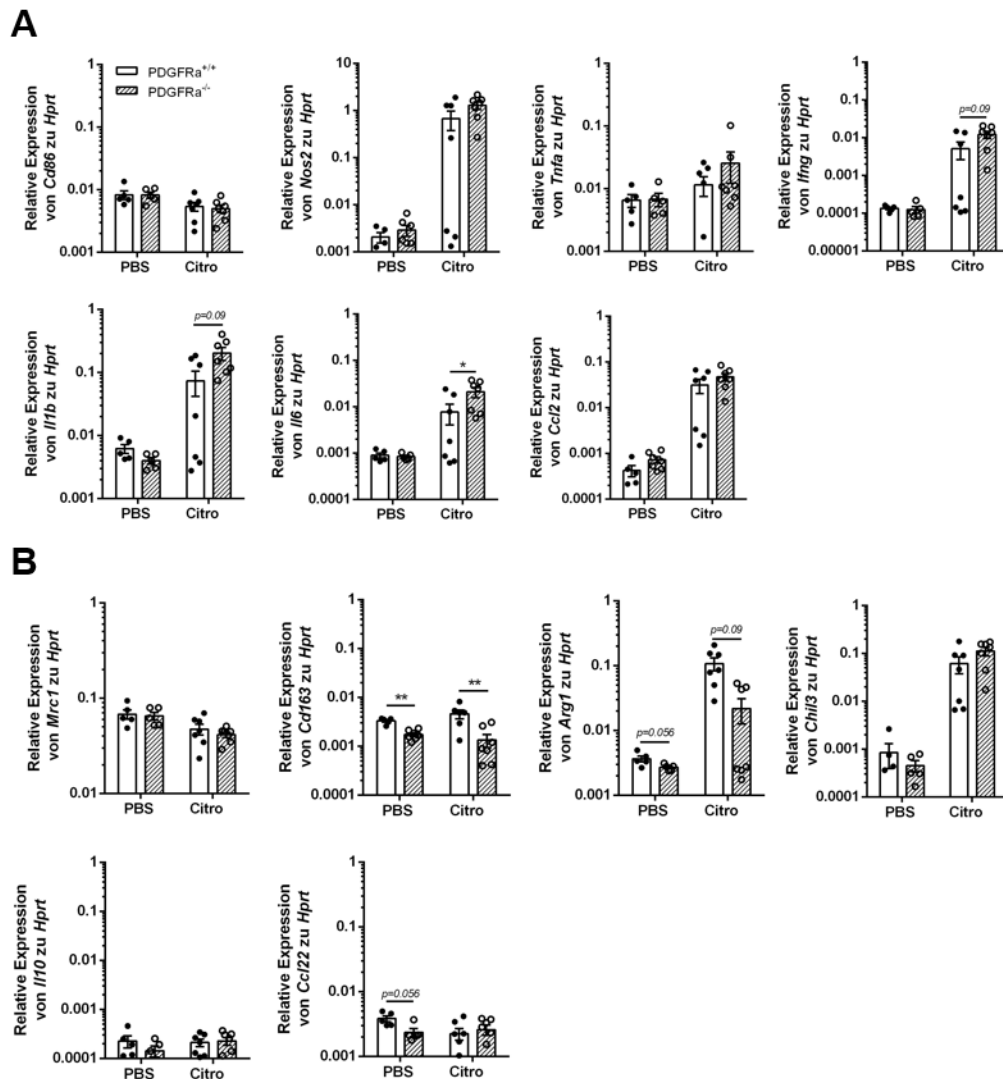


Abb. 17 | Analyse der Genexpression im Colon von LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während *C. rodentium*-Colitis (separate housing). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt, *C. rodentium*-Colitis im Alter von 8 Wochen induziert (Gavage mit 10^9 Bakterien ($n=6-9$) oder PBS ($n=4-7$); gepoolte Daten aus zwei Experimenten) und relative Genexpressionen nach 14 Tagen bestimmt (normalisiert auf *Hprt*; dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A** Relative Expressionen von pro-inflammatorischen Genen auf mRNA-Ebene und **B** Relative Expressionen von anti-inflammatorischen Genen wurden an Tag 0, 7, 10 und 14 mittels qRT-PCR im Colongewebe bestimmt, * $p < 0,05$ und ** $p > 0,01$.

Erneut zeigen sich keine Unterschiede in den Expressionen der pro-inflammatorischen Gene *Cd86*, *Nos2* und *Ccl2* zwischen PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (vgl. Abb. 17A). Auch in der Regulierung von anti-inflammatorischen Genen während der

C. rodentium-induzierten Colitis können DSS-Daten teilweise bestätigt werden (vgl. Abb. 17B). So zeigen sowohl uninfizierte ($p = 0,0025$) als auch infizierte ($p = 0,0082$) LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse eine signifikant niedrigere Expression von *Cd163* auf mRNA-Ebene. Zusätzlich deutet sich in uninfizierten ($p = 0,0556$) und infizierten ($p = 0,0973$) LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine niedrigere Expression von *Arg1* und in uninfizierten LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen von *Ccl22* ($p = 0,0556$) auf mRNA-Ebene an. Anders als in DSS-Experimenten wird *Ym1/Chil3* in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen ähnlich stark exprimiert. Wiederholt können keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Regulierung von *Mrc1* (CD206) und *Il10* auf mRNA-Ebene gezeigt werden (vgl. Abb. 17B).

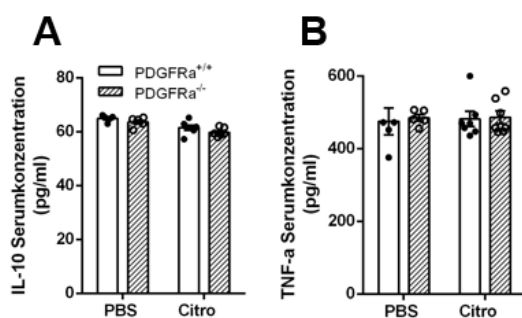


Abb. 18 | Serumkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen während *C. rodentium*-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (separate housing). LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt, *C. rodentium*-Colitis im Alter von 8 Wochen induziert (Gavage mit 10^9 Bakterien ($n=7-9$) oder PBS ($n=4-5$); gepoolte Daten aus zwei Experimenten) und Zytokinkonzentrationen im Serum mittels ELISA nach 14 Tagen bestimmt (dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A** IL-10 Konzentrationen und **B** TNF- α Konzentrationen.

Im Serum von uninfizierten und infizierten LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen können keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen von IL-10 (vgl. Abb. 18A) und TNF- α (vgl. Abb. 18B) nachgewiesen werden.

3.5. Cohousing führt zu einer Angleichung des Phänotyps von LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis

Um auch den Mikrobiom-Einfluss in den Experimenten mit berücksichtigen zu können, wurden 4-Wochen alte LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere im gleichen Verhältnis auf die Käfige aufgeteilt (Cohouse (CH)-2:2), sodass ein Mikrobiom-Austausch durch Koprophagie für die gesamte Versuchsdauer gewährleistet werden konnte. Anschließend wurden die Versuchstiere im Alter von 8 Wochen mit 2,5 % Natrium-Dextransulfat (DSS) im Trinkwasser für 7 Tage behandelt. Ab Tag 7 wurden die Versuchstiere wieder mit Wasser *ad libitum* gehalten. Die Organentnahmen erfolgten an drei verschiedenen Zeitpunkten der DSS-Colitis (Tag 0 (Kontrolle), Tag 7 und Tag 14), um die Funktion von PDGFR- α während akuter Inflammation und der Resolutionsphase analysieren zu können. Unbehandelte Tiere dienen hier als Kontrollen.

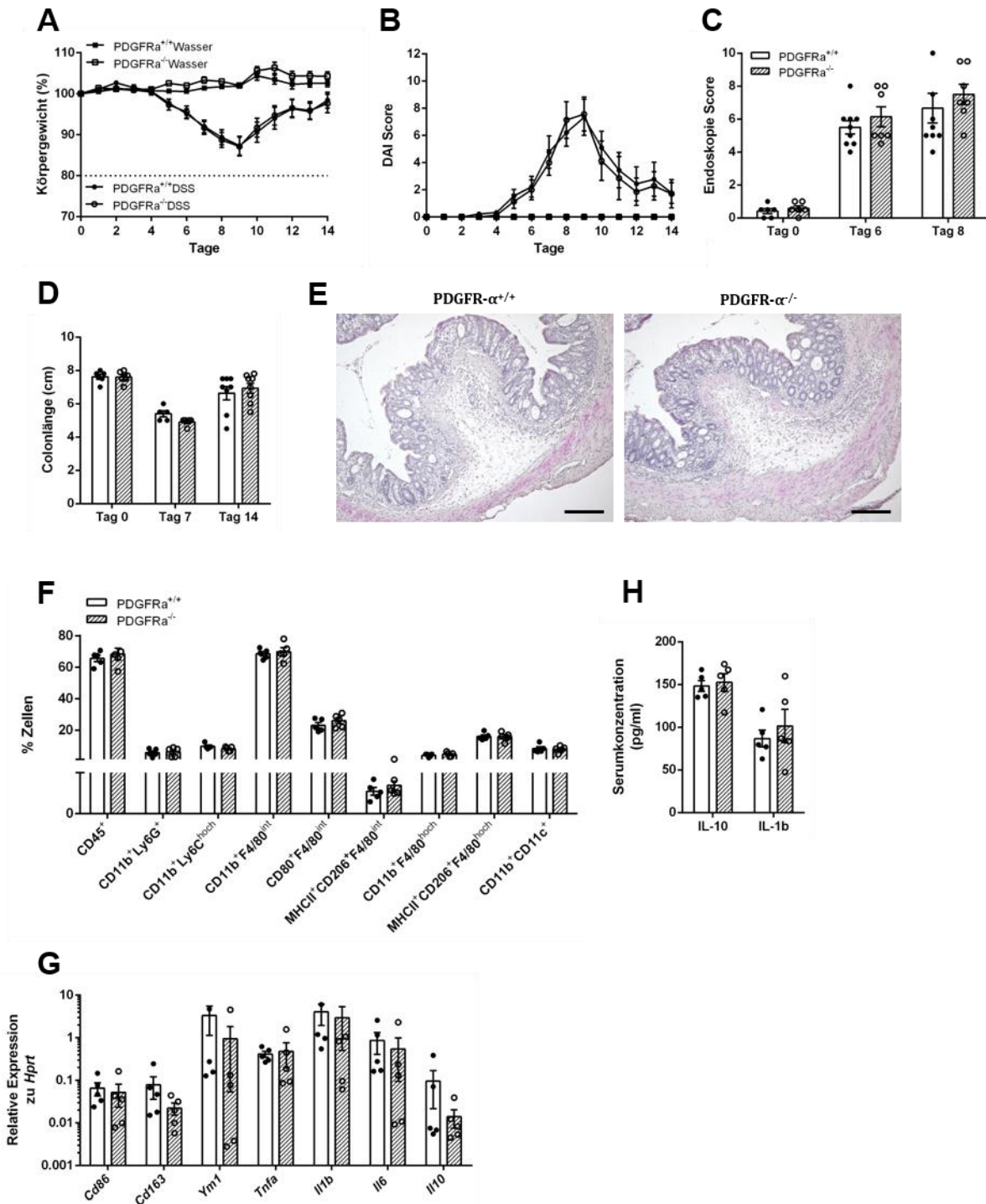


Abb. 19 | Phänotypisierung von cohouse LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen während DSS-Colitis. DSS-Colitis (2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage) wurde in 8-Wochen alten LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertieren (*cohouses*) induziert (*gepoolte* Daten aus zwei Experimenten; dargestellt als Mittelwert \pm SEM), **A** Gewichtsverlauf über einen Zeitraum von 14 Tagen, **B** Disease Activity Index (DAI)-Score über einen Zeitraum von 14 Tagen, **C** Endoskopie-Scores an Tag 0 (n=6), 6 (n=7-9) und 8 (n=7-8), **D** Colonlänge an Tag 0 (n=6), 7 (n=5) und 14 (n=8), **E** Hämatoxylin-Eosin-Färbung von repräsentativen Colonsegmenten an Tag 7 (Skalierung: 100 μ m), **F** Durchflusszytometrische Analyse von LP-Zellpopulationen an Tag 7 (n=5; dargestellt als prozentualer Mittelwert \pm SEM) **G** Expressionsanalyse von pro- und anti-inflammatorischen Genen im Colon auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR an Tag 7 (normalisiert auf *Hprt*; n=5) und **H** Serumkonzentrationen von IL-10 und IL-1 β an Tag 7 (n=5) mittels ELISA bestimmt.

Sowohl LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - als auch LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse zeigen im Verlauf der DSS-induzierten Colitis einen milden Krankheitsverlauf ohne signifikante Unterschiede

zwischen den beiden Genotypen. Die unbehandelten Tiere weisen ebenfalls keine Genotyp-spezifischen Unterschiede auf (Tag 0). Insgesamt verlieren alle Versuchstiere bis Tag 9 der DSS-induzierten Colitis durchschnittlich 15 % ihres Ausgangsgewichts (vgl. Abb. 19A). Weiterhin zeigen sowohl LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ als auch LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse ähnliche DAI-Scores mit einem Maximalwert von 8 an Tag 9 der DSS-Colitis (vgl. Abb. 19B). Auch in der endoskopischen Untersuchung weisen die Versuchstiere keine signifikanten Unterschiede auf, wobei die Streuung innerhalb der Gruppen an Tag 6 und 8 relativ stark ist (vgl. Abb. 19C). Sowohl die LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - als auch die LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse zeigen in der Colonlänge keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf ihre Genotypen (vgl. Abb. 19D). An Tag 7 der DSS-Colitis beträgt die durchschnittliche Colonlänge 5,5 cm und an Tag 14 6,5 cm. Als Kontrolle wurden die Colonsegmente unbehandelter Tiere gemessen, wobei hier die Länge im Mittel 7,8 cm beträgt. Ebenfalls wurde der Entzündungsgrad im Colon mittels HE-Färbung von histologischen Querschnitten *ex vivo* bestimmt. Auch hier ergeben sich keine sichtbaren Genotyp-spezifischen Unterschiede zwischen LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen an Tag 0, 7 und 14 (vgl. Abb. 19E).

Die Frequenzen verschiedener myeloider LP-Zellpopulationen wurden durchflusszytometrisch und die Regulierung von pro- und anti-inflammatorischen Genen auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR sowie Zytokinkonzentrationen im Serum mittels ELISA bestimmt. Als repräsentativer Zeitpunkt wurde Tag 7 der DSS-Colitis gewählt, da hier die intestinale Inflammation bisher am stärksten war. Sowohl in der durchflusszytometrischen Bestimmung der LP-Zellpopulationen als auch in der Genexpressionsanalyse ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen. So zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - sowie LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse ähnliche Frequenzen an Leukozyten und anderen myeloiden Zellpopulation an Tag 7 der DSS-induzierten Colitis (vgl. Abb. 19F). Auch zeigen die Versuchstiere ähnliche Expressionen pro- und anti-inflammatorischer Gene auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 19G) an Tag 7 der Colitis. Ebenfalls können keine Genotyp-spezifischen Unterschiede von IL-10 und IL-6 im Serum der Versuchstiere gezeigt werden (vgl. Abb. 19H). Auch an Tag 0 und 14 der DSS-induzierten Colitis können keine signifikanten Unterschiede auf Zell- und Genebene sowie im Serum zwischen *cohouse* PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen werden (Daten werden nicht gezeigt).

3.6. Myeloides PDGFR- α übt eine modulierende Funktion auf das Mikrobiom aus

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine Mikrobiom-modulierende Funktion von myeloidem PDGFR- α hin. Deshalb wurde im nächsten Schritt mit Hilfe von 16S rRNA-Sequenzierung die Komposition des Mikrobioms aus Stuhlproben von unbehandelten

cohouse (CH) und *separate housing* (SH) LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ (WT)/LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ (KO)-Mäusen analysiert (vgl. Abb. 20A).

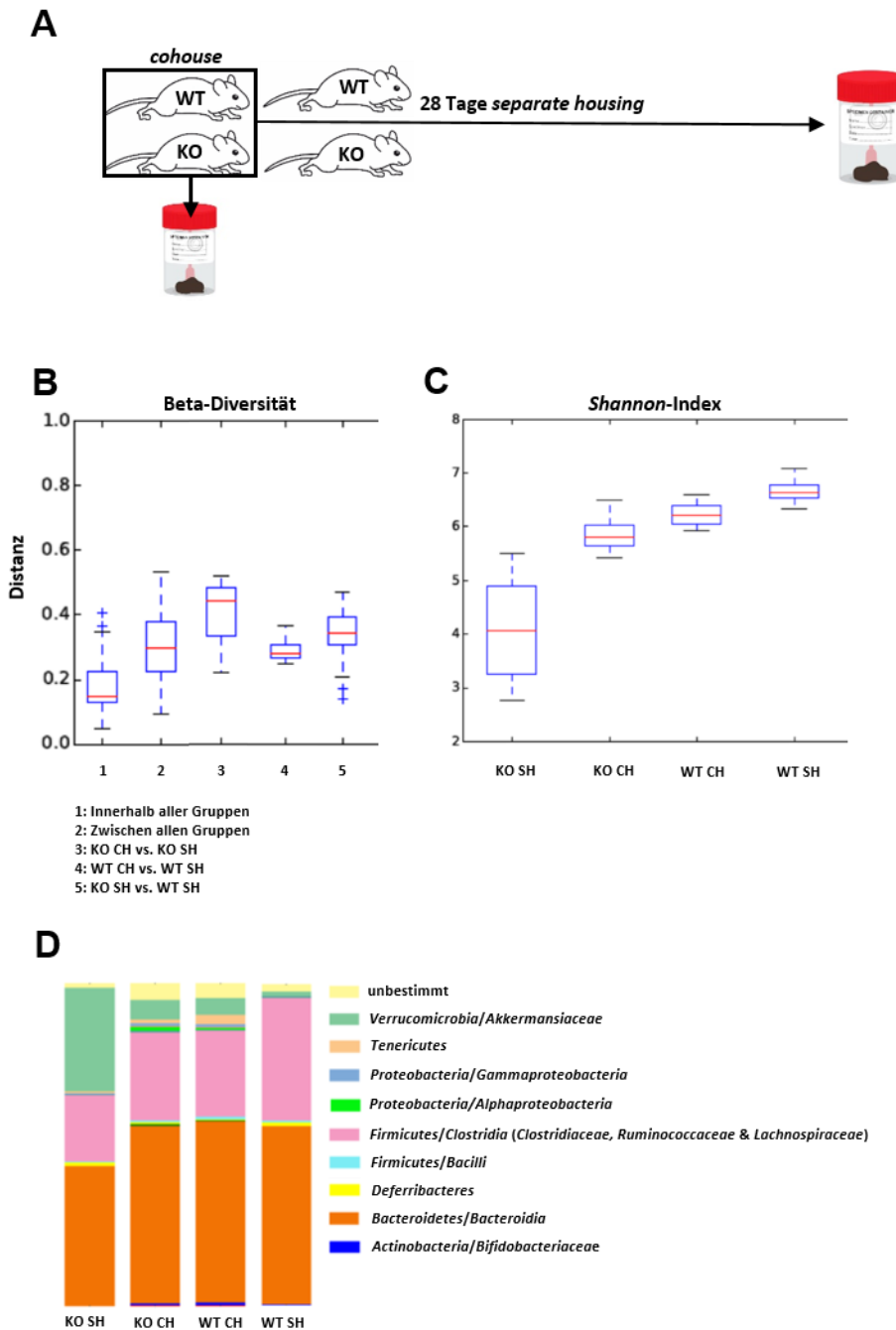


Abb. 20 | 16S rRNA Analyse des Mikrobioms von LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Stuhlproben von LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (KO) und Wildtypen (WT/PDGFR- $\alpha^{+/+}$) (*cohouse* (CH) oder *separate housing* (SH)) wurden mittels 16S rRNA-Sequenzierung analysiert (n=5) **A** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs, **B** Beta-Diversität, **C** Alpha-Diversität gemessen am *Shannon-Index* und **D** Auflistung der Phyla, Klassen und Familien einzelner Gruppen.

Hierbei zeigt sich in der Bestimmung der Beta-Diversität (Vergleich der gemeinsamen und verschiedenen Spezies zwischen zwei Proben) ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung des Mikrobioms bei SH KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren bereits nach vier Wochen separater Haltung. Das Mikrobiom von WT- und KO-Geschwistertieren, die nicht getrennt wurden (CH), hingegen, zeigt eine ähnliche Beta-Diversität und damit

einhergehend ein ähnliches Mikrobenspektrum auf (vgl. Abb. 20B). Die Alpha-Diversität (*Shannon-Index*), die die Anzahl verschiedener Taxa impliziert, ist in den CH Tieren vergleichbar (*Shannon-Index* beträgt im Mittel 6), wohingegen die Alpha-Diversitäten von SH WT- (*Shannon-Index* beträgt 6,5) und KO-Mäusen (*Shannon-Index* beträgt 4) sich deutlich voneinander unterscheiden (vgl. Abb. 20C). Demnach weisen SH KO-Mäuse im Vergleich zu allen anderen Gruppen nach vierwöchiger Separation eine deutlich niedrigere mikrobielle Diversität auf. SH WT-Mäuse zeigen im Vergleich zu den CH WT-Tieren nur eine leicht höhere Diversität, was auf eine Dominanz des Wildtyp-Mikrobioms schließen lässt. Im Kompositionsprofil des Mikrobioms, auf Phylum-Ebene, zeigen sich deutliche Unterschiede in den Abundanzen von *Verrucomicrobia* (*Akkermansiaceae*), *Firmicutes/Clostridia* (*Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* und *Lachnospiraceae*) und *Bacteroidetes* (*Bacteroidia*) zwischen SH WT- und KO-Mäusen. So weisen WT-Tiere eine größere Abundanz an *Bacteroidia* und *Clostridia* bei gleichzeitiger Verminderung von *Akkermansia* auf (vgl. Abb. 20D).

3.7. Aggravierte DSS-Colitis in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen ist Mikrobiota-abhängig

Um vorwiegend den Einfluss des Mikrobioms aus LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen auf die DSS-induzierte intestinale Inflammation analysieren zu können und bisherige Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine DSS-Colitis, unter den gleichen Bedingungen wie in vorherigen Experimenten (siehe 2.2.9.3), in gnotobiotischen C57BL/6J-Wildtypen induziert. Hierzu wurde der Darm der gnotobiotischen Tiere mittels oraler Gavage mit dem Mikrobiom von separierten Spendertieren (LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - oder LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse) rekolonisiert (siehe 2.2.6.1). Da die phänotypischen Unterschiede an Tag 7 der DSS-Colitis am größten waren, wurde dieser Tag als Zeitpunkt der Organentnahme gewählt (vgl. Abb. 21A).

Gnotobioten, die mit dem Mikrobiom von SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (KO-GF) rekolonisiert wurden, zeigen an Tag 6 und 7 der DSS-Colitis im Vergleich zu Gnotobioten, die mit dem Mikrobiom von SH PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen (WT-GF) rekolonisiert wurden, eine signifikante Aggravation der DSS-Colitis, charakterisiert durch einen höheren Gewichtsverlust (vgl. Abb. 21B) und damit einhergehend einem höheren DAI-Score (vgl. Abb. 21C). Wie in vorherigen Experimenten mit separat gehaltenen PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, kann auch in Gnotobioten kein signifikanter Unterschied in der Colonlänge zwischen den beiden Gruppen an Tag 7 der DSS-induzierten Colitis gezeigt werden. Eine effektive Induktion der Inflammation kann jedoch in WT-GF und KO-GF-Mäusen an Tag 7 im Vergleich zu Kontrollen anhand einer verkürzten Colonlänge nachgewiesen werden (vgl. Abb. 21D).

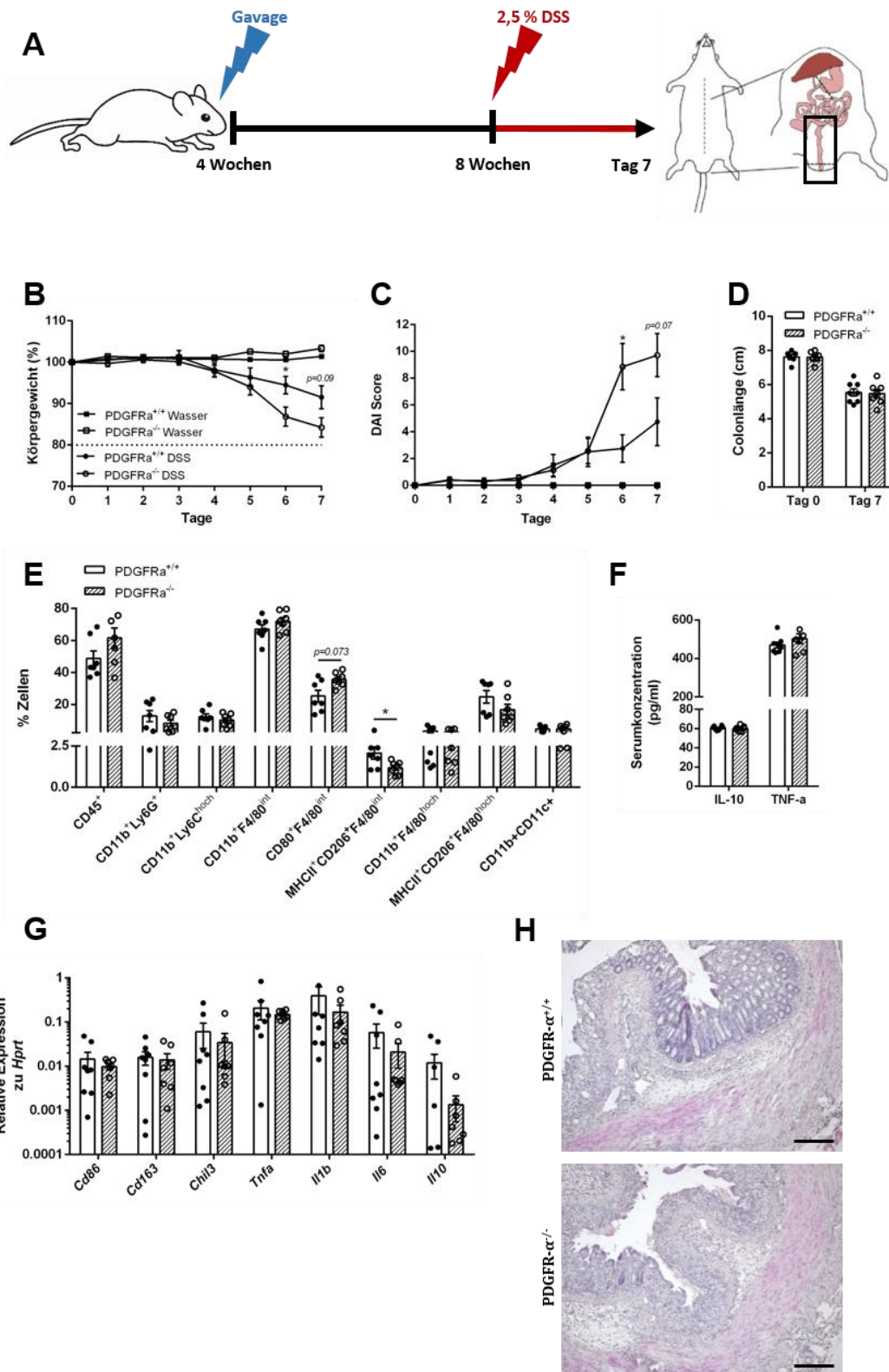


Abb. 21 | Analyse des Phänotyps von LysM-PDGFR- α ^{+/+} und LysM-PDGFR- α ^{-/-} Mäusen (separate housing) in Gnotobioten. Gnotobioten wurden im Alter von 4 Wochen entweder mit dem Mikrobiom von SH LysM-PDGFR- α ^{-/-} oder LysM-PDGFR- α ^{+/+} Mäusen gavagiert und im Alter von 8 Wochen mit 2,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage behandelt (gepoolte Daten aus zwei Experimenten; n=8 und n=7; dargestellt als Mittelwert \pm SEM) **A** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs, **B** Gewichtsverlauf und **C** Disease Activity Index-Score über einen Zeitraum von 7 Tagen, **D** Colonlänge an Tag 7, **E** Durchflusszytometrische Analyse von LP-Zellen an Tag 7 (dargestellt als prozentualer Mittelwert \pm SEM), **F** Relative Expressionen von repräsentativen pro- und anti-inflammatorischen Genen auf mRNA-Ebene im Colon an Tag 7, bestimmt mittels qRT-PCR (normalisiert auf *Hprt*), **G** Serumkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen mittels ELISA bestimmt und **H** Hämatoxylin-Eosin-Färbung von repräsentativen Colonsegmenten an Tag 7 (Skalierung: 100 μ m), **p*<0.05.

In der durchflusszytometrischen Analyse von LP-Zellen kann an Tag 7 der DSS-Colitis eine signifikante Reduktion der Frequenz infiltrierender MHCII⁺ CD206⁺ Makrophagen ($p = 0,0379$) in KO-GF-Mäusen nachgewiesen werden. Zudem zeichnet sich ein Trend in der Anzahl infiltrierender CD80⁺ MHCII⁺ Makrophagen ab. So deutet sich in KO-GF-Mäusen eine Zunahme dieser Zell-Frequenz ($p = 0,0728$) an. In der Anzahl anderer LP-Zellpopulationen weisen die Gnotobioten keine signifikanten Unterschiede auf (vgl. Abb. 21E). Ergänzend dazu wurde die Expression repräsentativer pro- und anti-inflammatorischer Gene mittels qRT-PCR überprüft. Hier können keine signifikanten Unterschiede in den relativen Expressionen von *Cd86*, *Cd163*, *Ym1/Chil3*, *Tnfa*, *Il1b*, *Il6* und *Il10* auf mRNA-Ebene in WT-GF und KO-GF-Mäusen gezeigt werden (vgl. Abb. 21G). Ein Unterschied in den Serum-Konzentrationen von IL-10 und TNF- α kann in Gnotobioten an Tag 7 der DSS-Colitis nicht gezeigt werden (vgl. Abb. 21F), jedoch zeichnet sich in der histologischen Untersuchung von Colosegmenten mittels HE-Färbung eine stärkere Inflammation in KO-GF-Mäusen ab, charakterisiert durch eine vermehrte mukosale Leukozyten-Infiltrierung, Verdickung des Colons und Krypten-Verlust (vgl. Abb. 21H). Insgesamt lässt sich somit nicht nur eine Mikrobiom-modulierende Funktion von myeloidem PDGFR- α vermuten, sondern auch eine partielle Übertragbarkeit des Makrophagen-Phänotyps durch das Mikrobiom.

3.8. Myeloides PDGFR- α vermittelt mukosale Integrität

Für das intestinale Gleichgewicht sind die Zusammensetzung des Mikrobioms und damit zusammenhängend die Integrität der Mukosa von entscheidender Bedeutung. Diese können von Makrophagen und dendritischen Zellen beeinflusst werden (Macpherson & Uhr, 2016). Aufgrund der signifikanten Unterschiede zwischen SH LysM-PDGFR- $\alpha^{+/-}$ und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen auf Gen- und Zellebene im Hinblick auf Makrophagen (*steady state*) als auch in der Komposition des Mikrobioms, sollte nun die epitheliale Barrierefunktion, *in vivo*, sowie die Mucinschicht, *ex vivo*, charakterisiert werden.

Hierzu wurden zunächst Versuchstiere mit FITC-konjugierten Dextran oral gavagiert und das Serum nach 4 Stunden spektralphotometrisch analysiert. Zur Ermittlung eines Basalwerts wurde allen Tieren vor der FITC-Dextran Behandlung Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Nach 4 Stunden zeigen LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/-}$ -Mäusen eine signifikant höhere ($p = 0,0006$) FITC-Dextran Konzentration im Serum (vgl. Abb. 22A). Dies deutet auf eine höhere intestinale Permeabilität und damit einhergehend auf eine verminderte mukosale Integrität in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen hin.

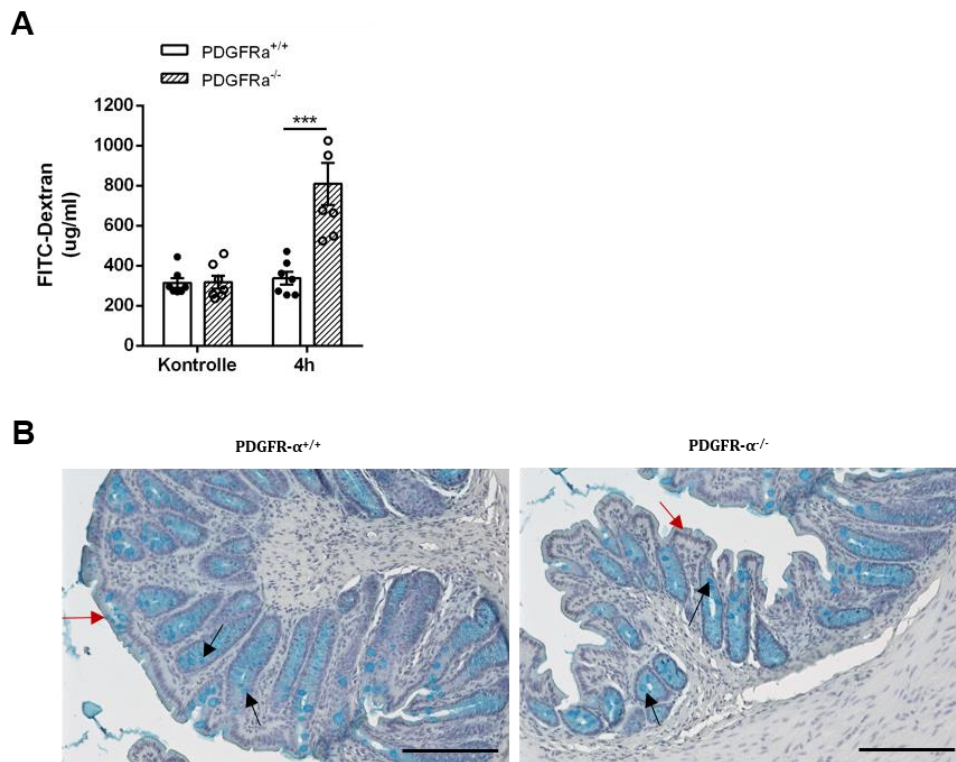


Abb. 22 | Charakterisierung des Mukosaepithels in LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (*separate housing*). SH LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Geschwistertiere wurden im Alter von 4 Wochen nach ihrem Genotyp getrennt und FITC-Dextran im Alter von 8 Wochen appliziert, **A** FITC-Dextran Serumkonzentrationen nach 0 h und 4 h (n=6-7; dargestellt als Mittelwert \pm SEM), ***p<0,001 und **B** Alcianblau-Hämatoxylin Färbung un behandelter Mäuse, wobei die schwarzen Pfeile Goblet-Zellen/transmembrane Mucinschicht und die roten Pfeile die äußere Mucinschicht markieren (Skalierung: 50 μ m).

Weiterhin wurde die Mucinschicht, *ex vivo*, in Paraffin-basierten Schnitten von Colonsegmenten un behandelter Mäuse mittels Co-Färbung von Hämatoxylin (Zellkerne) und Alcianblau (Mucinschicht) visualisiert. Hierbei deutet sich in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen eine verminderte transmembrane Mucinschicht und damit einhergehende Reduktion an Goblet-Zellen an (vgl. Abb. 22B).

3.9. Analyse von BMDMs *in vitro*

3.9.1. Verringerte Phagozytose-Aktivität in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -BMDMs

Ein essenzieller Bestandteil der angeborenen Immunabwehr ist die Internalisierung und Lyse von Pathogenen und apoptotischen Zellen durch Makrophagen. Hierbei vermitteln neben Komplementrezeptoren (*complement receptors*-CRs) und Fc γ -Rezeptoren auch der Mannose Rezeptor (MMR/CD206) sowie *Scavenger*-Rezeptoren (z. B. CD163) die Bindung und Internalisierung von Mikroorganismen (Stein *et al.*, 1992). Damit einhergehend deuten eine verringerte Frequenz an MHCII⁺ CD206⁺ Zellen und eine Herunterregulierung von *Cd163* auf mRNA-Ebene in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen auf eine veränderte Phagozytose hin. Um diese funktionelle Eigenschaft der Makrophagen zu analysieren, wurden BMDMs aus PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, wie unter 2.2.6.5 beschrieben, generiert. Für die Analyse der Phagozytose-Aktivität wurden

ausdifferenzierte BMDMs über Nacht entweder mit IFN- γ /LPS (pro-inflammatorischer Phänotyp) oder IL-4 (anti-inflammatorischer Phänotyp) stimuliert und am nächsten Tag wie unter 2.2.7 dargestellt gemessen. Als Kontrolle dienten unstimulierte BMDMs.

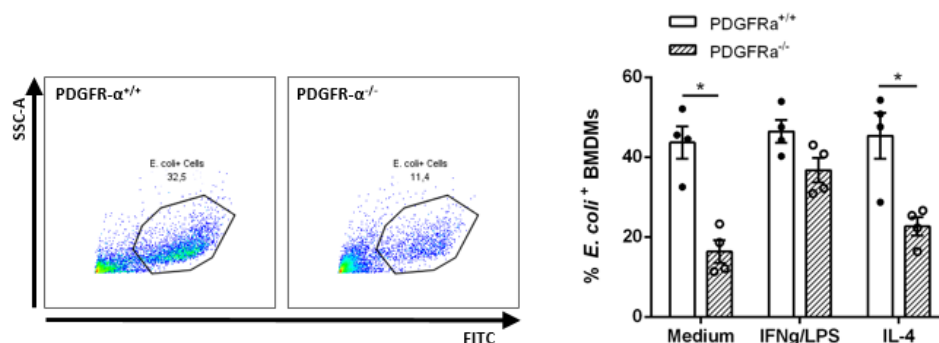


Abb. 23 | Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose-Aktivität von BMDMs. Makrophagen wurden aus dem Knochenmark 8-Wochen alter LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ - und LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse isoliert, für 7 Tage in Kultur genommen, anschließend über Nacht entweder mit IFN- γ /LPS oder IL-4 stimuliert und die Phagozytose-Aktivität mittels FITC-konjugierter *E. coli* durchflusszytometrisch bestimmt (n=4; dargestellt als prozentualer Mittelwert \pm SEM), *p<0.05.

Unstimulierte BMDMs sowie BMDMs, die mit IL-4 stimuliert wurden, aus LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zeigen eine signifikant geringere Phagozytose-Aktivität (p = 0,0286) im Vergleich zu gleich behandelten BMDMs aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen. Kein Genotypspezifischer Unterschied in der phagozytischen Aktivität zeigt sich hingegen in IFN- γ /LPS stimulierten Makrophagen (vgl. Abb. 23).

3.9.2. Butyrat unterstützt die Expression von *Stat6* in anti-inflammatorischen BMDMs über PDGFR- α

In der Mikrobiom-Analyse zeigen sich deutlich verminderte Abundanzen der Phyla *Firmicutes* (*Clostridia*) und *Bacteroidetes* in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu allen anderen Gruppen, wobei der Unterschied im Hinblick auf die Klasse *Clostridia* am größten war. Ein großer Teil dieser kommensalen Bakterien zeichnet sich durch eine Reihe vorteilhafter Einflüsse auf die intestinale Homöostase aus. Durch zelluläre Komponenten und Metabolite wie SCFAs können Mikroorganismen intestinale Epithelzellen mit Energie versorgen und dadurch die Barriereintegrität stärken sowie direkt mit dem Immunsystem interagieren (Guo *et al.*, 2020). Hierbei konnten Ji und Kollegen bereits nachweisen, dass beispielsweise Butyrat die Polarisierung eines anti-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyps über STAT6 unterstützen kann (Ji *et al.*, 2016). Da bekannt ist, dass STAT6 sowohl Teil des PDGFR/PDGF- als auch IL-4-Signalweg ist (Patel *et al.*, 1996), sollte in diesem Teil die Expression von *Stat6* in anti-inflammatorischen Makrophagen vor und nach Butyrat-Behandlung, *in vitro*, im Hinblick auf den Verlust von PDGFR- α untersucht werden. Hierzu wurden BMDMs, wie unter 2.2.6.5 beschrieben, isoliert und differenziert. Anschließend wurden ausdifferenzierte BMDMs, wie unter 2.2.8 beschrieben, mit IL-4 polarisiert und danach für 24 Stunden mit Butyrat stimuliert. Nachfolgend wurde die Expression *Stat6* mittels qRT-PCR analysiert.

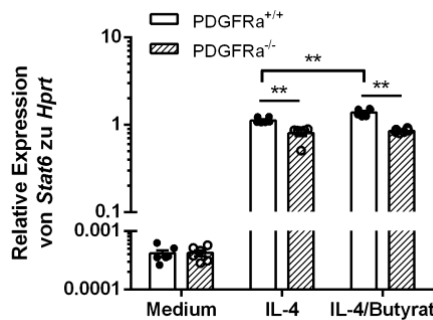


Abb. 24 | Butyrat-Behandlung von IL-4-polarisierten BMDMs. BMDMs aus *LysM-PDGFR-α^{+/+}*- und *LysM-PDGFR-α^{-/-}*-Mäusen wurden im Alter von 8 Wochen isoliert, differenziert, über Nacht mit IL-4 (10 ng/ml) polarisiert und anschließend mit 1 mM Butyrat für 24 Stunden stimuliert. Die relative Expression von *Stat6* wurde mittels qRT-PCR analysiert (n=6; dargestellt als Mittelwert ± SEM; normalisiert auf *Hprt*), **p<0,01.

Eine Hochregulierung von *Stat6* über den IL-4-Signalweg zeigt sich sowohl in *LysM-PDGFR-α^{+/+}*- als auch *LysM-PDGFR-α^{-/-}*-BMDMs im Vergleich zur Medium-Kontrolle, wobei in BMDMs aus *LysM-PDGFR-α^{+/+}*-Mäusen eine signifikant höhere Expression von *Stat6* auf mRNA-Ebene (p = 0,0022) nachgewiesen werden konnte. Nach Butyrat-Behandlung zeigt sich im Vergleich zur IL-4-Behandlung zudem in *LysM-PDGFR-α^{+/+}*-BMDMs erneut eine signifikante Hochregulierung von *Stat6* auf mRNA-Ebene (p = 0,0022). In *LysM-PDGFR-α^{-/-}*-BMDMs konnte nach Butyrat-Behandlung keine weitere Hochregulierung von *Stat6* auf mRNA-Ebene (p = 0,0022) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 24).

3.9.3. Butyrat stimuliert die Expression von *Pdgfra* in *PDGFR-α^{+/+}*-BMDMs

In der Expressionsanalyse von *Stat6* zeigen *LysM-PDGFR-α^{+/+}*-BMDMs nach Butyrat-Behandlung im Gegensatz zu *LysM-PDGFR-α^{-/-}*-BMDMs eine erneute Hochregulierung von *Stat6* auf mRNA-Ebene. Daher sollte im letzten Teil geprüft werden, ob Butyrat die Expression von *Pdgfra* stimulieren kann. In diesem Zusammenhang konnten Gladhaug und Kollegen *in vitro*, in Rattenhepatozyten, zeigen, dass eine Behandlung mit Butyrat einen Einfluss auf die Morphologie und Bindeeigenschaften von EGFR hat (Gladhaug *et al.*, 1988). Hierbei konnte diese Arbeitsgruppe zudem nachweisen, dass Butyrat die Expression von EGFR hochregulieren kann (Gladhaug *et al.*, 1989). EGFRs und PDGFRs gehören zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren (*receptor tyrosine kinases-RTKs*) und konservieren ähnliche strukturelle Merkmale wie beispielsweise die Ig-ähnliche Domäne am extrazellulären N-Terminus oder Cysteinreiche Regionen, die für die Ligandenbindung essenziell sind (Heldin & Westermark, 1999; Ferguson, 2008; Schlessinger, 2014), wodurch auch eine mögliche Butyrat-PDGFR-Bindung denkbar wäre. Hierzu wurden *LysM-PDGFR-α^{+/+}*-BMDMs, wie unter 2.2.6.5 beschrieben, isoliert und differenziert. Im Anschluss wurden ausdifferenzierte *LysM-PDGFR-α^{+/+}*-BMDMs für 24 Stunden mit Butyrat stimuliert und die Expression von *Pdgfra* mittels qRT-PCR analysiert.

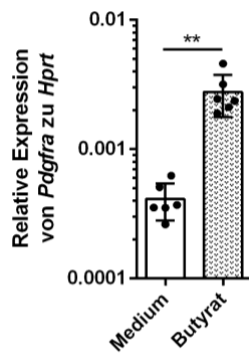


Abb. 25 | Butyrat-Behandlung von WT-BMDMs. BMDMs aus *LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$* -Mäusen wurden im Alter von 8 Wochen isoliert, differenziert und im Anschluss mit 1 mM Butyrat für 24 Stunden stimuliert. Die relative Expression von *Pdgfra* wurde mittels qRT-PCR analysiert (n=6; dargestellt als Mittelwert \pm SEM; normalisiert auf *Hprt*), **p<0,01.

Hierbei zeigt sich in *LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$* -BMDMs eine signifikante Hochregulierung von *Pdgfra* nach Behandlung mit Butyrat (p = 0,0022) im Vergleich zur Medium-Kontrolle (vgl. Abb. 25).

4. DISKUSSION

Die Pathogenese von CED ist multifaktoriell und trotz der weltweit hohen Prävalenz bislang nur unvollständig verstanden. Im Wesentlichen beruht die CED-Pathogenese jedoch auf einer intestinalen Barrierestörung, einer nicht ausreichenden Säuberung von gealtertem oder totem Zellmaterial durch Phagozyten und einer Fehlregulierung des mukosalen Immunsystems (Matricon *et al.*, 2010). Hierbei wird die Gewebeschädigung der Darmmukosa durch das intestinale Immunsystem verursacht, wobei zahlreiche Immunzellen der intestinalen LP eine vermehrte Aktivierung aufweisen. Die Auslösung und Verstärkung der intestinalen Entzündungsreaktion kann hierbei als Autoimmunreaktion, durch eine Disruption der immunologischen Toleranz, oder als unspezifische Schädigung, durch eine Reaktion auf exogene Antigene, auftreten (Chang, 2020). Mit der Gewebeschädigung der Darmmukosa setzen auch Wundheilungsprozesse ein. Hierbei können anti-inflammatorische Makrophagen kontinuierlich Wachstumsfaktoren freisetzen, die den Gewebeaufbau stimulieren und regulieren (Wynn & Vannella, 2016). PDGFs können in diesem Zusammenhang das Zellwachstum, die Zellproliferation und die Zellmigration anregen, und dadurch die mukosale Barriereintegrität unterstützen (Beck & Podolsky, 1999; Theiss *et al.*, 2004; Playford & Ghosh, 2008).

In dieser Arbeit wurde mittels spezifischer Deletion von PDGFR- α in myeloiden Zellen der Einfluss von PDGFR- α auf die intestinale Homöostase und Colitis-Suszeptibilität im Mausmodell analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von myeloidem PDGFR- α prädominant zu einer Verarmung an anti-inflammatorischen LP-Makrophagen und damit einhergehenden verminderten mukosalen Integrität sowie daraus resultierenden Mikrobiom-Dysbiose führt. Aus diesem Grund ist es von zentraler Bedeutung, die Funktion von myeloiden PDGFRs/PDGFs in intestinaler Homöostase und Inflammation zu untersuchen.

4.1. Hochregulierung von *Pdgfra* in intestinaler Inflammation

Bisher wurden zahlreiche Gene in *genome-wide association studies* (GWAS) mittels *next generation sequencing* (NGS) und anderen Analysen identifiziert. Insgesamt wurden dabei 270 Risikogene für CED bestimmt, wovon nur 30 Gene in M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patient:innen überlappen (Huang *et al.*, 2017; Mirkov *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2017). Die Expressionsanalyse von *Pdgfra* und *Pdgfr β* im Colongewebe von CED-Patient:innen konnte eine signifikante Hochregulierung von *Pdgfra/Pdgfr β* in Patient:innen mit aktivem M. Crohn im Vergleich zu Kontrollen, jedoch nicht in Patient:innen mit Colitis ulcerosa zeigen (vgl. Abb. 9A-C). Hierbei könnten Polymorphismen im *Pdgfra/Pdgfr β* Gen zu den nicht-überlappenden Risikogenen zählen, die nur in die Pathogenese von M. Crohn involviert sind. Weiterhin differenzieren Risikogene in Populationen auch im Hinblick auf

die Ethnie. Hier wurde bereits gezeigt, dass unter anderem NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*)-Genvarianten primär in CED-Patient:innen mit europäischer oder jüdischer Abstammung gefunden werden als in Patient:innen mit japanischer oder chinesischer Herkunft (Inoue *et al.*, 2002; Leong *et al.*, 2003; Duerr *et al.*, 2006). Verschiedene genetische Prädispositionen für CED können somit durch ihre inflammatorischen Signalwege variieren. Daneben könnte eine transmurale Entzündung, wie sie sich bei M. Crohn-Patient:innen manifestiert (Boyapati *et al.*, 2015), generell zu einer stärkeren Induktion von PDGFRs führen, da sich bei C. ulcerosa-Patient:innen die Entzündung hauptsächlich auf das Epithel beschränkt (Fries & Comunale, 2011). Eine höhere Induktion der Expression von *Pdgfra* im Vergleich zu *Pdgfrβ* auf mRNA-Ebene in M. Crohn-Patient:innen geht zudem mit bisherigen Studien einher, die zeigen, dass PDGFR-β/PDGF-B vermehrt im Gefäßsystem wirksam sind (Hellström *et al.*, 1999), wohingegen PDGFR-α/PDGF-A beispielsweise eine kritische Rolle während der Darmentwicklung in Mäusen spielen (Karlsson *et al.*, 2000). Ergänzend dazu konnte bereits eine großflächige Verteilung von PDGFR-α-positiven Zellen im Gastrointestinaltrakt von Meerschweinchen gezeigt werden, welche die LP, die Muskelschicht und Subserosa durchziehen (Chan *et al.*, 2010). Weiterhin konnte in Mäusen gezeigt werden, dass über die PDGF-A/PDGFR-α-Signaltransduktion unter anderem Proliferation und Chemotaxis (Ying *et al.*, 2017) sowie die intestinale Villi- und Krypten-Architektur gesteuert wird (Karlsson *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Studie konnte zusätzlich im Verlauf einer DSS-induzierten Colitis im Colon von C57BL/6J-Mäusen, ähnlich wie in Patient:innen mit aktiven M. Crohn, eine signifikante Hochregulierung von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene, jedoch nicht von *Pdgfrβ*, während akuter Inflammation (Tag 7) im Vergleich zum *steady state* (Tag 0) gezeigt werden (vgl. Abb. 9D). Dies suggeriert eine mögliche Teilübertragbarkeit muriner Daten auf die Pathogenese von M. Crohn-Patient:innen.

Die spezifische Funktion von PDGFR-α/PDGF-A in intestinalen Makrophagen wurde im Anschluss mittels konditionellem KO-Modell (Cre-loxP-System; LysM) untersucht. Lysozym ist eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems und in die Spaltung von Peptidoglykanen aus gram-positiven Mikroorganismen involviert. Myeloide Zellen exprimieren in hohem Maße die Isoform Lysozym M, und ihr Promotor wird hierbei verwendet, um die Cre-Rekombinase-Expression so zu lenken, dass gezielt geflochte Gene in myeloiden Zellen deletiert werden (Shi *et al.*, 2018b). Lysozym M wird prädominant von myeloiden Zellen wie zum Beispiel Granulozyten und einigen DCs exprimiert, jedoch sind es vor allem reife Makrophagen, die LysM⁺ sind (Faust *et al.*, 2000; Abram *et al.*, 2014). Die Effizienz des *Knockout*-Modells konnte dabei in BMDMs nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10C). Hierbei haben BMDMs, die aus LysM-PDGFR-α^{-/-}-Tieren isoliert wurden, im Vergleich zu BMDMs, die aus LysM-PDGFR-α^{+/-}-Tieren

stammten, eine signifikant niedrigere Expression von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene gezeigt. Zusätzlich wurde in allen Versuchstieren anhand der *Pdgfra*-Expression im Colon während DSS-induzierter Colitis untersucht, ob PDGFRs prädominant von mononuklearen Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Hierbei scheinen myeloide Zellen und höchstwahrscheinlich sogar Makrophagen im Colon als Zielzellen im PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg zu fungieren, da LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren zu allen Zeitpunkten der DSS-Colitis und bereits im *steady state* eine signifikant niedrigere intestinale Expression von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene gezeigt haben (vgl. Abb. 10D).

4.2. Myeloide Deletion von PDGFR- α erhöht die Colitis-Suszeptibilität und moduliert das angeborene Immunsystem

Voraussetzung zur Evaluierung der Bedeutung von myeloidem PDGFR- α für die CED-Progression war die Generierung eines murinen CED-Phänotyps (Colitis-Modell), der der humanen Pathogenese ähnelt. Die Anforderung an ein murines Colitis-Modell war die Abbildung der Erkrankung im Hinblick auf diverse Charakteristika wie die mukosale Leukozyten-Infiltrierung aufgrund einer Epithelschädigung, eine verstärkte Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie krankheitstypische Merkmale, die sich aus dem DAI-Score und der histologischen Analyse des Colons zusammensetzen. DSS fungiert in diesem Kontext als chemisches Colitogen mit antikoagulanten Eigenschaften, welches eine intestinale Inflammation induziert (Laroui *et al.*, 2012; Chassaing *et al.*, 2015). Prädominant basiert dieser Prozess auf der chemischen Schädigung des Epithels und der damit verbundenen Translokation von pro-inflammatorischen Stimuli (Bakterien und ihre Metabolite), die damit einhergehend über DAMPs und PAMPs eine angeborene Immunantwort induzieren. Alle Versuchstiere, die im Rahmen dieser Studie mit DSS behandelt wurden, haben eine repräsentative Colitis entwickelt, erkennbar am Verlust von Körpergewicht, Diarrhö, erhöhten Endoskopie- und DAI-Scores, Leukozyten-Infiltrierung sowie der Hochregulierung pro-inflammatorischer Gene und verstärkten Sezernierung inflammatorischer Zytokine. SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse haben im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren dabei eine höhere Colitis-Suszeptibilität gezeigt, die sich durch einen früher eintretenden Gewichtsverlust, einen höheren DAI- und Endoskopie-Score, einer höheren Mortalitätsrate sowie einer stärkeren intestinalen Inflammation (HE-Färbung) und erhöhten Leukozyten-Infiltrierung (CD45-Färbung) manifestiert haben (vgl. Abb. 11F). Daneben hat sich in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine stärkere Inflammation auch auf Zellebene gezeigt, charakterisiert durch eine Akkumulation an infiltrierenden Leukozyten (CD45⁺ Zellen) (vgl. Abb. 12A) und inflammatorischen Monozyten (Ly6C^{hoch} Zellen) in der *Lamina propria* (vgl. Abb. 12C). Damit einhergehend haben SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse zu allen Zeitpunkten der DSS-Colitis eine signifikant höhere Expression von *Tnfa* auf mRNA-Ebene gezeigt

(vgl. Abb. 13A). Das Schlüsselenzym der Makrophagen, TNF- α , kann über NF κ B-Signalwege Zellüberleben vermitteln. Auf der anderen Seite wird TNF- α als wichtiger Mediator von Apoptose, Nekroptose sowie als Treiber einer gesteigerten Inflammation bei CED und anderen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis angesehen (Ruder *et al.*, 2019). Die Expression von PDGFs wird unter anderem durch TNF- α induziert sowie durch andere Mediatoren (IL-1, IL-6, TGF- β , EGF und FGF- β) und PDGF selbst gesteuert. Außerdem wird PDGFR durch IL-1 β und LPS induziert und insgesamt vermehrt in Inflammation und Stress exprimiert (Specia *et al.*, 2012). Damit einhergehend könnte möglicherweise über den PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg ein pro-inflammatorischer Makrophagen-Phänotyp, der sich durch eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α charakterisieren lässt, inhibiert werden. An Tag 7 der DSS-Colitis hat sich zudem eine stärkere Hochregulierung von *Il1b* auf mRNA-Ebene im Colon von SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen angedeutet, was eine stärkere Aktivierung des Inflammasoms, einer Gruppe von intrazellulären multimerischen Proteinkomplexen, die die inflammatorische Caspase-1 aktivieren, suggeriert. Das Inflammasom definiert sich über sein Sensorprotein (ein PRR), das zu einer pro-Caspase-1 aktivierenden Form als Antwort auf PAMPs und DAMPs oligomerisieren kann (Sharma & Kanneganti, 2016). Der Sensor des Inflammasoms besteht vorwiegend aus einem NOD-like-Rezeptor (NLR). Bisher wurden NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 und NLRC4 identifiziert. Diese NLRs zeichnen sich generell durch drei Domänen aus: eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) oder Pyrin-Domäne, welche zur Caspase-Aktivierung benötigt werden, eine NACHT-Domäne mit ATPase-Aktivität, die zur Oligomerisierung des Komplexes dient und eine *Leucine-rich-Reapeat*-Domäne (LRR), die eine regulatorische Funktion erfüllt (Philpott *et al.*, 2014). Die Aktivierung von Inflammasomen zählt zu den wichtigsten inflammatorischen Signalwegen (Franchi *et al.*, 2009). Mutationen im NLRP3-Gen werden mit einer Vielzahl von inflammatorischen Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer, Diabetes und Arteriosklerose sowie CED assoziiert (Kelley *et al.*, 2019). Die NLRP3-Inflammasom-induzierte Produktion von IL-1 β spielt zudem eine kritische Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase (Sokol *et al.*, 2008). Damit einhergehend konnte in CED-Patient:innen gezeigt werden, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit verbundene erhöhte Freisetzung von IL-1 β zu einer verstärkten Inflammation führt (Mao *et al.*, 2018). Das NLRP3-Gen wird hauptsächlich von Makrophagen exprimiert und detektiert als Teil des Inflammasoms Produkte von beschädigten Zellen wie beispielsweise extrazelluläres ATP und kristalline Harnsäure (Leemans *et al.*, 2011). Makrophagen sezernieren daneben konstant pro-IL-1 β , welches bei Aktivierung des Inflammasoms in die aktive Form IL-1 β überführt wird, wodurch die bakterielle Abwehr gestärkt wird und somit auch ein potenzieller Einfluss von

Makrophagen auf die bakterielle Flora und den Umgang mit pathogenen Erregern besteht (Dinarello, 1996; Lopez-Castejon & Brough, 2011).

Eine intestinale Dysbiose, der Verlust von begünstigenden Bakterien, meist einhergehend mit einer Überzahl an potenziell pathogenen Bakterien (Pathobionten), kann ebenfalls zur Pathogenese von CED beitragen (Eyerich *et al.*, 2009). Bakterielle Infektionen des Gastrointestinaltrakts mit Enteropathogenen wie *Escherichia coli* (EPEC) und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) können charakteristische *attaching and effacing* (A/E) Läsionen im infizierten Darm durch enges Anheften an Enterozyten, die Auslöschung von Mikrovilli-Strukturen, und den Umbau des intestinalen Epithels verursachen (Kai *et al.*, 2010; Clements *et al.*, 2012). Enterobakterien wie EPEC und EHEC werden zudem mit der Pathogenese von CED assoziiert (Darfeuille-Michaud & Colombel, 2008). Hierbei wird angenommen, dass eine maladaptive chronische Inflammation des Gastrointestinaltraktes bei Menschen mit einer genetischen Prädisposition aus einer abnormalen Exposition des mukosalen Immunsystems gegenüber Enterobakterien resultiert, ähnlich wie sie sich bei CED-Patient:innen manifestiert (Bhinder *et al.*, 2013). Das Mauspathogen *C. rodentium* und humanpathogene Enterobakterien teilen virulente Mechanismen zur Darmkolonisierung des Wirts, was eine Übertragbarkeit potenzieller Mechanismen zur CED-Pathogenese im Hinblick auf Wirts-Pathogen-Interaktionen suggeriert. Ähnlich wie bei der DSS-induzierten Colitis haben SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse während der Infektion mit *C. rodentium* eine höhere Colitis-Suzeptibilität gezeigt, die sich in einem höheren Gewichtsverlust, einer höheren bakteriellen Infektionslast und stärkeren intestinalen Inflammation manifestiert haben (vgl. Abb. 15). Hierbei konnte die Infektion mit dem Mauspathogen höhere Frequenzen an neutrophilen Granulozyten (Ly6G⁺ Zellen) und pro-inflammatorischen CD80⁺ MHCII⁺ F4/80^{int} Makrophagen (vgl. Abb. 16) sowie eine stärkere Hochregulierung von *Il6* auf mRNA-Ebene in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen induzieren. Ebenfalls hat sich in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine stärkere Hochregulierung von *Ifng* und *Il1b* auf mRNA-Ebene angedeutet (vgl. Abb. 17). Somit scheint der myeloide PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg auch in einer bakteriell-induzierten Colitis, jedoch über andere Mechanismen, eine wichtige Rolle in der Regulierung des Entzündungsgeschehens zu spielen.

Sowohl im Verlauf der chemisch als auch der bakteriell induzierten Colitis werden *Il6*, *Il1b*, *Nos2* und *Ccl2* auf mRNA-Ebene, im Vergleich zu Kontrollen (*steady state*), in allen Gruppen stark hochreguliert (vgl. Abb. 13A & Abb. 17A). Nur *Tnfa* und *Ifng* scheinen Colitis-Typ-abhängig reguliert zu werden, denn während der DSS-Colitis zeigt sich eine deutliche Hochregulierung von *Tnfa* auf mRNA-Ebene, jedoch scheint *Ifng* nur wenig bis kaum hochreguliert zu werden (vgl. Abb. 13A). In der *C. rodentium*-Colitis hingegen, scheint *Tnfa* nur in geringem Maße, jedoch *Ifng* offenbar stärker hochreguliert zu werden (vgl. Abb. 17A). TNF- α fungiert als multifunktionaler Botenstoff des Immunsystems

während der lokalen und systemischen Inflammation, da er sowohl Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung über TLRs, den MAP-Kinase-Weg und NF κ B stimulieren kann (Jang *et al.*, 2021). Im Allgemeinen induziert TNF- α bei lokalen Entzündungsprozessen klassische Symptome wie Fieber, Schwellung, Rötung und Schmerz (Luheshi & Rothwell, 1996), wohingegen eine aberrante oder exzessive Aktivierung von TNF- α in einer chronischen Inflammation resultieren kann, die eventuell eine Autoimmunerkrankung zur Folge haben könnte (Jang *et al.*, 2021). Monoklonale Antikörper wie Infliximab oder Golimumab, die als TNF- α -Inhibitor fungieren, werden beispielsweise bei der Therapie von CED eingesetzt (Jang *et al.*, 2021). Somit scheinen die Pathogenese von CED und die DSS-Colitis wichtige Mechanismen und Charakteristika im Verlauf des Inflammationsgeschehens zu teilen, was einen partiellen Transfer von murinen Daten auf den menschlichen Krankheitsverlauf suggeriert. IFN- γ spielt eine kritische Rolle für die angeborene und adaptive Immunität gegen virale und einige bakterielle sowie protozoische Infektionen (Kovarik *et al.*, 2016). Daneben ist IFN- γ ein wichtiger Aktivator von Makrophagen und Induktor der MHCII-Expression (Giroux *et al.*, 2003). Hierbei kann die IFN- γ -Bindung die trans-Phosphorylierung von JAK1 und JAK2 induzieren, welche dann wiederum die intrazelluläre Rezeptordomäne, die als Andockstelle für STAT1 fungiert, phosphorylieren und so einen pro-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyp induzieren kann (Ivashkiv, 2018; Tur *et al.*, 2021). Somit besteht ein potenzieller Einfluss von IFN- γ auf die pro-inflammatorische Polarisierung von Makrophagen. Dieser Einfluss manifestiert sich in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen durch die erhöhte Frequenz pro-inflammatorischer CD80⁺ MHCII⁺ F4/80^{int} Makrophagen in der *C. rodentium*-Colitis. Dies könnte eine Inhibierung der pro-inflammatorischen Polarisierung von Makrophagen mittels PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg suggerieren.

Komplementär zu einer stärkeren pro-inflammatorischen Makrophagen-Aktivierung während intestinaler Inflammation, zeigen SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren auf Zellebene auch eine Verarmung an anti-inflammatorischen CD206⁺ MHCII⁺ Makrophagen (vgl. Abb. 12E & F) und auf mRNA-Ebene, eine signifikant geringere Hochregulierung von *Cd163* (vgl. Abb. 13B), oder keine Regulierung (vgl. Abb. 17B). In diesem Zusammenhang konnte *in vitro*, am Beispiel einer Infektion mit *C. rodentium* von CMT-93 Epithelzellen und J774A.1 murinen Makrophagen, gezeigt werden, dass durch die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit verbundenen Freisetzung von IL-1 β durch Epithelzellen, anti-inflammatorische Makrophagen rekrutiert werden können, die dann die Wundheilung unterstützen (Bording-Jorgensen *et al.*, 2021). Daneben konnte eine Vielzahl an kardiologischen Studien zeigen, dass CD206⁺ Makrophagen für Wundheilungsprozesse beispielsweise nach einem Myokardinfarkt essenziell sind, da diese hierbei durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β und VEGFs die Angiogenese und Fibrose stimulieren

können (Ma *et al.*, 2018; Poller *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021). Demnach könnte der Verlust dieses Zelltyps während einer intestinalen Inflammation zu einer verminderten Wundheilung führen. Damit einhergehend haben SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse nicht nur eine stärkere intestinale Entzündung während der DSS-Colitis ausgebildet, sondern scheinen auch eine verminderte Fähigkeit zur Regeneration in der Resolutionsphase zu haben, abgebildet im Körpergewicht (vgl. Abb. 11B), DAI-Score (vgl. Abb. 11C) und in der Mortalitätsrate (vgl. Abb. 11E). Die Verarmung an CD163⁺ CD206⁺ Makrophagen scheint demnach während einer Colitis zu einer verstärkten Inflammation in der akuten Entzündungsphase und zu einer verringerten Wundheilung in der Resolutionsphase zu führen. Sowohl der MR CD206 als auch der SR CD163 werden mit einem anti-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyp sowie der Phagozytose-Aktivität assoziiert. Damit einhergehend konnte zudem eine Hochregulierung von *Cd163* in reifen intestinalen CD206⁺ Makrophagen nachgewiesen werden (Fabriek *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2021). Im Rahmen dieser Studie konnte *in vitro*, in naiven und IL-4-polarisierten BMDMs aus LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen, zusätzlich eine verringerte Phagozytose-Aktivität gezeigt werden (vgl. Abb. 23). Dies suggeriert eine Involvierung des PDGFR- α /PDGF-A-Signalwegs in die anti-inflammatorische Polarisierung von Makrophagen und auch in ihre phagozytische Funktion. Eine verringerte phagozytische Aktivität könnte im Kontext einer Colitis die Aggravation der intestinalen Inflammation partiell erklären, da eine effiziente Säuberung von apoptotischen und nekrotischen Zellen sowie von translokalisierenden Bakterien durch eine verminderte Phagozytose-Aktivität verringert werden könnte. Zusammen mit einer Verarmung an anti-inflammatorischen Makrophagen könnte dies eine weitere mögliche Erklärung für eine erhöhte Colitis-Suszeptibilität in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen sein.

4.3. PDGFR- α vermittelt die anti-inflammatorische Polarisierung von Makrophagen

Die Verarmung an CD206⁺ MHCII⁺ Makrophagen (vgl. Abb. 12F & H) und eine geringere Expression von *Cd163* auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 13B) haben sich interessanterweise bereits in allen unbehandelten SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen gezeigt, was auf eine generelle Involvierung von PDGFR- α in die anti-inflammatorische Makrophagen-Polarisierung hindeutet. Hierbei konnte bereits gezeigt werden, dass sich Makrophagen des CD163⁺ anti-inflammatorischen Phänotyps durch Wachstumsfaktoren wie TGF- β stimulieren beziehungsweise aktivieren lassen (Murray *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016) sowie anti-inflammatorische Makrophagen auch durch die Produktion von Wachstumsfaktoren charakterisiert werden können (Knighton & Fiegel, 1989; Wynn & Vannella, 2016; Viola *et al.*, 2019). *Vice versa* könnten myeloide Wachstumsfaktorrezeptoren wie PDGFRs möglicherweise auch die anti-inflammatorische Polarisierung in Makrophagen beeinflussen. In diesem Zusammenhang

konnten Shimokado und Kollegen *in vitro*, in humanen Peritoneal- und Lungenmakrophagen, nachweisen, dass PDGFs einen signifikanten Teil in der Gesamtheit aller sezernierten Wachstumsfaktoren ausmachen (Shimokado *et al.*, 1985).

Der Mannoserezeptor CD206 (*Mrc1*) wird prädominant von reifen Makrophagen, erkennbar an ihren charakteristischen Vesikeln, exprimiert (Gröger *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2021). Hierbei konnten diese Populationen sowohl in Menschen als auch in Mäusen identifiziert werden, wobei eine positive Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und *Mrc1*-Expression in intestinalen Makrophagen gezeigt werden konnte (Wright *et al.*, 2021). Daneben wurde eine Hochregulierung anti-inflammatorischer Gene und eine Herunterregulierung pro-inflammatorischer Gene in diesem Zelltyp nachgewiesen, sodass angenommen wird, dass intestinale CD206⁺ Makrophagen einen anti-inflammatorischen Phänotyp besitzen (Rivollier *et al.*, 2012; Bain *et al.*, 2013). Damit einhergehend konnte in Patient:innen mit rheumatischer Atritis gezeigt werden, dass CD206⁻ und CD206⁺ Makrophagen unterschiedliche Rollen als Inflammationstreiber (CD206⁻) oder in der Vermittlung von Wundheilungsprozessen (CD206⁺) spielen (Alivernini *et al.*, 2020). Zusätzlich haben Wright und Kollegen eine positive Korrelation von *Il10*- und *Mrc1*-Expression in intestinalen Makrophagen zeigen können (Wright *et al.*, 2021). In dieser Arbeit konnte auf Zellebene eine Verarmung an intestinalen CD206⁺ MHCII⁺ Makrophagen in *LysM-PDGFR- α ^{-/-}*-Mäusen nachgewiesen werden, jedoch konnte auf Genebene weder eine veränderte Expression von *Mrc1* noch *Il10* gezeigt werden (vgl. Abb. 13B & Abb. 17B). Die Genexpressionsanalyse berücksichtigt hierbei einen Ausschnitt des gesamten Colongewebes, wobei in der durchflusszytometrischen Analyse nur F4/80⁺ Makrophagen berücksichtigt wurden. Es ist bereits bekannt, dass beispielsweise auch unreife dendritische Zellen (Sallusto *et al.*, 1995; Mellman *et al.*, 1998; Cochand *et al.*, 1999), Endothelzellen und Fibroblasten (Sheikh *et al.*, 2000) den Mannose Rezeptor exprimieren können. Demnach könnten mögliche Unterschiede im Expressionsmuster eines spezifischen Zelltyps durch andere Zellen überlagert werden. Ähnliches könnte auf die Expression von *Il10* zutreffen, denn so sind es vor allem Monozyten und Makrophagen (Schreiber, 1997; Morhardt *et al.*, 2019), die IL-10 produzieren, jedoch stellen daneben auch regulatorische T-Zellen (Foxp3⁺) eine wichtige Quelle für IL-10 dar (Moore *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2013). Ferner können auch dendritische Zellen (Schülke, 2018), Th1-Zellen (O' Gara & Vieira, 2007), Th2-Zellen (Fiorentino *et al.*, 1989), Th17-Zellen (Huber *et al.*, 2011), Mastzellen (Nagata & Nishiyama, 2021), B-Zellen (Fillatreau *et al.*, 2002), NK Zellen (Clark *et al.*, 2019), Neutrophile (Kasten *et al.*, 2010) und Eosinophile (Huang *et al.*, 2014) IL-10 sezernieren, was auch hier eine Überlagerung einzelner Expressionmuster spezifischer Zelltypen widerspiegeln könnte, sowie ähnliche Zytokinmengen im Serum der Mäuse erklären würde (vgl. Abb. 14A & Abb. 18A).

Intestinale CD206⁺ Makrophagen zeichnen sich neben ihrer Reife zudem über eine erhöhte Expression von *Cd163* aus (Wright *et al.*, 2021). In der Expressionsanalyse wurde dieses Gen in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren weniger stark exprimiert, was darüber hinaus mit einer verringerten Frequenz CD206⁺ MHCII⁺ Makrophagen einhergehen würde. Da der *Scavenger*-Rezeptor CD163 exklusiv von der Monozyten-Linie exprimiert wird (Lau *et al.*, 2004), konnten hier eindeutig Genotyp-spezifische Unterschiede im Expressionsmuster im Colon nachgewiesen werden. Daneben hat sich in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Tieren auch eine weniger starke Expression von *Arg1* auf mRNA-Ebene angedeutet (vgl. Abb. 13B & Abb. 17B). Das Enzym Arginase 1 katalysiert den letzten Reaktionsschritt im Harnstoffzyklus von Wirbeltieren, wobei die Aminosäure L-Arginin zu L-Ornithin hydrolysiert wird (Morris, 2007; Mills, 2012). Die L-Ornithin-Produktion in Makrophagen kann die Zellproliferation und Gewebereparatur durch die Bildung von Polyaminen und Kollagen unterstützen (Yang & Ming, 2014) und charakterisiert somit den metabolischen Makrophagen-Phänotyp. Demnach beschreibt die Produktion von Arginase 1 eine anti-inflammatorische Makrophagen-Polarisierung auf metabolischer Ebene. Als Pendant dazu fungiert die Produktion von Nitritoxid mittels Nitridoxid-Synthase (NOS), die dann die Zytotoxizität durch pro-inflammatorische Makrophagen und damit einhergehend die Entzündungsreaktion vermittelt (Hibbs *et al.*, 1987; Nathan & Ding, 2010). Somit scheint PDGFR- α neben der funktionalen auch für die metabolische anti-inflammatorische Makrophagen-Polarisierung von Relevanz zu sein.

4.4. Myeloides PDGFR- α vermittelt mukosale Integrität

Unbehandelte (*steady state*) SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse haben neben der Verarmung an anti-inflammatorischen CD163⁺ CD206⁺ Makrophagen auch bereits höhere Endoskopie Scores (vgl. Abb. 11D) und Frequenzen an CD45⁺ Leukozyten (vgl. Abb. 12A) sowie inflammatorischen Ly6C^{hoch} Monozyten (vgl. Abb. 12C) gezeigt, was auf eine generelle Aktivierung der angeborenen Immunantwort hindeuten könnte. Diese Aktivierung könnte beispielsweise als Reaktion auf PAMPs oder DAMPs in Folge einer Epitheldysfunktion zurückzuführen sein, da eine bakterielle Translokation bei einer verminderten Barriereintegrität, beispielsweise hervorgerufen durch eine Abschwächung der *tight junctions*, schneller stattfinden kann. *Zonulae occludentes* (*tight junctions*) sind schmale bandartige Strukturen, die sich aus Membranproteinen (z. B. Catenine, Aktin oder E-Cadherin) zusammensetzen (Zihni *et al.*, 2016). Diese Proteinkomplexe umgeben Epithelzellen und verbinden diese durch Bänder mit ihren Nachbarzellen, wodurch Zellzwischenräume verschlossen werden und eine parazelluläre Barriere (Diffusionsbarriere) geschaffen wird, die den In- und Efflux von Molekülen über das Epithel kontrolliert und somit die Polarität und Integrität der Epithelzellen aufrechterhält (Cereijido *et al.*, 2008; Zihni *et al.*, 2016). Am Beispiel der Angiogenese

konnte bereits gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren die Funktionen von *tight junctions* modulieren können (Wallez & Huber, 2008; Díaz-Coránguez *et al.*, 2019), insbesondere VEGFs (Antonetti *et al.*, 1999) und PDGFs (Harhaj *et al.*, 2002). Hierbei könnten möglicherweise auch PDGFs, die von Makrophagen sezerniert werden, eine wichtige Rolle spielen, denn sowohl Makrophagen selbst als auch sezernierte Wachstumsfaktoren werden mit der Gewebekomöostase und -regeneration assoziiert (Chazaud, 2014; Frankel & Lim, 2018; Ishihara *et al.*, 2018; Mosser *et al.*, 2021). Daneben wurde auch gezeigt, dass der *Scavenger*-Rezeptor CD163 mit direkten Zell-Zell-Interaktionen zwischen Makrophagen (durch morphologische Änderungen) und Endothelzellen assoziiert wird (Lloyd-Price *et al.*, 2019). Eine verminderte Expression dieses Rezeptors könnte möglicherweise auch eine fehlerhafte Makrophagen-Epithelzell-Interaktion zufolge haben, die möglicherweise für eine intakte epitheliale Barrierefunktion erforderlich wäre. Damit einhergehend konnte in SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte intestinale Permeabilität im Rahmen einer FITC-Dextran Behandlung gezeigt werden (vgl. Abb. 22A). Schäden im intestinalen Epithel und eine damit verbundene verringerte Barriereintegrität können zu einer verstärkten Exposition des mukosalen Gewebes gegenüber mikrobieller Antigene führen (Allaire *et al.*, 2018). Dadurch kann die Rekrutierung von Leukozyten und die Freisetzung von löslichen Mediatoren erfolgen, was letztlich zu einer mukosalen Inflammation führen kann (Neurath, 2014; Zundler *et al.*, 2019). Eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriereintegrität spielt die Balance zwischen Wachstum und Überleben von intestinalen Epithelzellen (*intestinal epithelial cells*-IECs). Diese Balance wird vom Epithel selbst und von rekrutierten mukosalen Immunzellen orchestriert (Sommer *et al.*, 2021). Hierbei spielt vor allem die Kommunikation zwischen myeloiden Zellen und dem Epithel eine kritische Rolle, wobei insbesondere Makrophagen die Regeneration von Epithelzellen und somit die Barriereintegrität regulieren können (Powrie *et al.*, 1994). Der CSF-1R/CSF-1-Signalweg reguliert primär das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und Monozyten (Pierce *et al.*, 1990; Hamilton, 1997; Jones & Ricardo, 2013), wobei die Inhibierung dieses Signalwegs in einer Verarmung intestinaler Makrophagen resultieren (Hume *et al.*, 1988) und seine Stimulierung zu einer Makrophagen-Infiltrierung in Geweben führen kann (Sehgal *et al.*, 2018). Daneben kann jedoch die Expression von *Csf1* in Makrophagen auch die Differenzierung von IECs sowie in Krypten-assoziierten Makrophagen die Differenzierung von Goblet- und Paneth-Zellen steuern, und somit indirekt verschiedene Stammpopulationen in Krypten disbalancieren (Gabanyi *et al.*, 2016). Damit einhergehend kann eine CSF-1-Signalweg-Blockade auch die Differenzierung anderer Epithelzellen wie zum Beispiel Goblet-Zellen beeinträchtigen (Huynh *et al.*, 2013; Gabanyi *et al.*, 2016), was die Wichtigkeit von Makrophagen für die Differenzierung von Epithelzellen und somit für die

Aufrechterhaltung der Barrierefunktion hervorhebt. Der CSF-1-Rezeptor gehört wie PDGFR zu den Tyrosinkinaserzeptoren, welche die gleichen Strukturen konservieren (Qiu *et al.*, 1988). Demnach könnte der PDGFR/PDGF-Signalweg möglicherweise auch für die Makrophagen-vermittelte Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion von Relevanz sein.

Im Rahmen einer histologischen Untersuchung hat sich auch eine verringerte Anzahl an Goblet-Zellen und damit einhergehend verminderten transmembranen Mucinschicht im Colon von SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen angedeutet (vgl. Abb. 22B). Die wichtigste Rolle der intestinalen Mucinschicht besteht in dem Schutz des Intestinums vor mechanischen, chemischen und biologischen Angriffen, um so die intestinale Homöostase aufrechterhalten zu können. Hierbei bildet die Mucinschicht einen Mantel um die intestinalen Zellen, der diese vor dem Kontakt mit externen Substanzen, Enzymen, Bakterien und Toxinen schützt (Hansson, 2019). Daneben besitzen Mucine, die aus Glykoproteinen bestehen, die Fähigkeit, Wasser zu binden, wodurch die Mucinschicht befeuchtet wird. Dadurch können beispielsweise Epithelzellen vor Dehydrierung und Stress geschützt werden, der bei der Passage luminaler Inhalte und damit verbundenen Peristaltik entstehen kann (Cone, 2009; Johansson *et al.*, 2013; Cornick *et al.*, 2015). Demnach könnte eine verringerte Mucinschicht die Dehydrierung und somit Instabilisierung von intestinalen Epithelzellen fördern und dadurch die Barriereintegrität schwächen. Auch infiltrierende Bakterien können bei einer dünneren oder defekten Mucinschicht so schneller an Epithelzellen adhären und diese dadurch schädigen. Ferner verringert sich das luminaire Nährstoffangebot für Mucin-degradierende kommensale Bakterien wie zum Beispiel *Akkermansia muciniphila*. Innerhalb des intestinalen Epithelverbandes sind es vor allem Goblet-Zellen, die durch ihre Drüsenfunktion Mucine sezernieren und somit die mukosale Integrität fördern können (Yang & Yu, 2021). In diesem Zusammenhang konnte im Respirationstrakt von Ratten gezeigt werden, dass der EGFR/EGF-Signalweg die Mucinproduktion durch Goblet-Zellen regulieren kann. Hierbei konnte die Stimulierung von EGFR mit seinen Liganden EGF und TGF- α die Expression von MUC5A *in vivo* und *in vitro* induzieren (Takeyama *et al.*, 1999). Der PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg ist bereits in die frühe Entwicklung der Villus-Morphogenese und Kryptenarchitektur involviert (Karlsson *et al.*, 2000) und könnte somit auch im Hinblick auf die Makrophagen-vermittelte Proliferation von Goblet-Zellen und somit für die Aufrechterhaltung der mukosalen Integrität relevant sein. Damit einhergehend wurde auch gezeigt, dass intestinale Makrophagen die Proliferation von Epithelzellen regulieren und somit ihre Integrität unterstützen können (Pull *et al.*, 2005). *Vice versa* konnten Kristek und Kollegen *in vitro*, in einer Co-Kultur von murinen Epithelzellen aus dem Colon (CMT-93) und J774A.1 Makrophagen, nachweisen, dass lösliche Mediatoren, die von intestinalen Epithelzellen freigesetzt werden, die anti-

inflammatorische Polarisierung von Makrophagen induzieren können (Kristek *et al.*, 2015). Möglicherweise könnte der PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg hier involviert sein, wodurch eine Art *Feedback Loop* zwischen Makrophagen und Epithelzellen einerseits die anti-inflammatorische Polarisierung von Makrophagen steuert, andererseits die Proliferation von Epithel/Goblet-Zellen beeinflusst. Deshalb könnte die Abwesenheit von PDGFR- α in Makrophagen möglicherweise dazu führen, dass eine partielle Induktion der anti-inflammatorischen Polarisierung ausbleibt und dadurch die Makrophagen-vermittelte Proliferation/Regeneration von Epithel/Goblet-Zellen abnimmt, wodurch letztlich die mukosale Integrität und das damit verbundene lumenale Nährstoffangebot vermindert und die mikrobielle Komposition so moduliert wird.

4.5. Myeloides PDGFR- α alterniert die Komposition des Mikrobioms und beeinflusst dadurch die Colitis-Suszeptibilität

Das menschliche Mikrobiom setzt sich hauptsächlich aus zwei dominanten Phyla zusammen, den *Firmicutes* und *Bacteroidetes*, die mehr als 90 % der mikrobiellen Taxa ausmachen. Der restliche Teil setzt sich aus subdominanten Phyla wie *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Verrucomicrobia* zusammen (Qin *et al.*, 2010). Diese Komposition bleibt in der Regel bei akuten Störungen unberührt, da die initiale Komposition aufgrund der Plastizität des Mikrobioms schnell wiederhergestellt werden kann (Candela *et al.*, 2012). Jedoch kann eine kontinuierliche Exposition gegenüber verschiedenen Stressoren (Schwermetalle, Pestizide, Antibiotika und chlorhaltiges Wasser über die Nahrungsaufnahme) oder generell, eine genetische Disposition die mikrobielle Komposition dauerhaft modulieren und zu einer Dysbiose führen (Candela *et al.*, 2012). Eine solche intestinale Dysbiose wird mit zahlreichen pathologischen Konditionen, die den Gastrointestinaltrakt (Diarrhö, Reizdarmerkrankung), das Immunsystem (Allergien, Multiple Sklerose, Typ-1-Diabetes, Reizdarmsyndrom, rheumatische Arthritis) und das zentrale Nervensystem (Alzheimer und Parkinson, Autismus) sowie mit dem Energiemetabolismus des Wirts selbst (Übergewichtigkeit, Typ-2-Diabetes, Arteriosklerose) betreffen können, assoziiert (Bravo *et al.*, 2012; Belkaid & Hand, 2014; Carding *et al.*, 2015; Young, 2017; Hills *et al.*, 2019). Eine intestinale Dysbiose, die sich durch eine Verarmung an obligatorisch-anaeroben Spezies und einer Anreicherung an fakultativ-anaeroben Bakterien manifestiert, ist zudem ein Charakteristikum in der Pathogenese von CED. Hierbei wird vermutet, dass die chronische Inflammation einen Sauerstoffanstieg im Darm induziert, was in einem Ungleichgewicht zwischen obligatorisch- und fakultativ-anaeroben Bakterien resultiert (Henson & Phalak, 2017).

Im Rahmen dieser Studie konnte in SH LysM-PDGFR- α ^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu SH LysM-PDGFR- α ^{+/+}-Tieren (*steady state*) in der Mikrobiom-Analyse neben einer generellen Abnahme der mikrobiellen Diversität (vgl. Abb. 20C) auch eine Abnahme in den

Abundanzen der Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes* sowie eine deutlich erhöhte Abundanz von Mucin-degradierenden *Akkermansia* (*Verrucomicrobia*) gezeigt werden (vgl. Abb. 20D). Mit dieser Gattung werden in der Regel probiotische Eigenschaften assoziiert (Cani & de Vos, 2017; Zhang *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020). Im Mikrobiom von Patient:innen mit CED konnte beispielsweise eine verringerte Abundanz von *Akkermansia* nachgewiesen werden (Png *et al.*, 2010; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013; Schneeberger *et al.*, 2015). In anderen Publikationen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine übermäßig starke Darm-Kolonisierung mit *Akkermansia* im Kontext einer DSS-induzierten Colitis in Mäusen auch pro-colitogen fungieren kann (Seregin *et al.*, 2017). Demnach könnten SH LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse durch eine Überkolonisierung mit dieser Gattung und damit verbundenen pathologischen Mucin-Degradierung, eine verminderte mukosale Integrität zeigen. Ergänzend dazu hat sich im Rahmen einer histologischen Untersuchung eine verringerte Mucinschicht in LysM-PDGFR- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen angedeutet (vgl. Abb. 22B).

Firmicutes, zu denen Familien wie *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* oder *Lachnospiraceae* gehören, können durch die Produktion von Buttersäure/Butyrat das mukosale Immunsystem unterstützen und dadurch die intestinale Homöostase stabilisieren. Dabei dienen die SCFAs zum einen als Energielieferanten für die Bakterien selbst und für andere Zellen wie beispielsweise Epithelzellen. Daneben senken SCFAs den intestinalen pH-Wert, wodurch das Wachstum von Pathogenen und Pilzen generell gehemmt und die intestinale Homöostase so aufrechterhalten wird (Rechkemmer & von Engelhardt, 1988; Chu & Montrose, 1995; Blottière *et al.*, 2003; van der Hee & Wells, 2021). Neben der anti-inflammatorischen Wirkung wurde auch gezeigt, dass Butyrat die Zellteilung regulieren und die Barriereintegrität stärken kann (Blottière *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2017). Daneben konnte nachgewiesen werden, dass Butyrat, welches prädominant von der Klasse *Clostridia* (*Firmicutes*) produziert wird, eine wichtige Rolle in der STAT6-abhängigen anti-inflammatorischen Makrophagen-Polarisierung spielt (Ji *et al.*, 2016). Somit scheint über myeloides PDGFR- α die Komposition des Mikrobioms alterniert zu werden, *vice versa* scheinen die Metaboliten des Mikrobioms aber auch die anti-inflammatorische Polarisierung von Makrophagen über STAT6/Butyrat beeinflussen zu können. Nicht alle Mitglieder des Phylums *Firmicutes* produzieren jedoch Butyrat. Die Gattung *Lactobacillus* beispielsweise, die auch zu diesem Phylum zählt, produziert anstelle von Butyrat hauptsächlich Acetat und Lactat (Markowiak-Kopeć & Ślizewska, 2020). Acetat, das Anion der Essigsäure und Lactat, das Anion der Milchsäure, verfügen wie Butyrat über probiotische Eigenschaften, die die intestinale Homöostase stärken (Vinolo *et al.*, 2011; Iraporda *et al.*, 2015). Bakterien, die zum Phylum *Bacteroidetes* gehören, können wie *Firmicutes* auch SCFAs produzieren. Anders als *Firmicutes* produzieren Bakterien dieses Phylums prädominant Essigsäure/Acetat und Propionsäure/Propionat (Feng *et al.*,

2018). Diese SCFAs können ähnlich wie Butyrat auch anti-inflammatorisch wirken und somit die intestinale Homöostase unterstützen (Tedelind *et al.*, 2007; Kendrick *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2014). Hierbei wurde am Beispiel einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* gezeigt, dass beispielsweise Propionat die antimikrobielle Abwehr durch Makrophagen verstärken kann (Hobbs *et al.*, 2021). Bakterien, die Ballaststoffe fermentieren und dadurch SCFAs produzieren, sind zudem in der intestinalen Mukosa und im Stuhl von CED-Patient:innen (im Vergleich zu gesunden Kontrollen) reduziert (Venegas *et al.*, 2019).

Eine verringerte Abundanz an *Firmicutes* und *Bacteroidetes* und die damit verbundene Verarmung an SCFA-Anionen wie Acetat, Propionat und Butyrat könnte demnach zu einer verminderten anti-inflammatorischen Polarisierung von LP Makrophagen beitragen.

4.6. Butyrat unterstützt die anti-inflammatorische Makrophagen-Polarisierung über PDGFR- α und STAT6

Es wurde bereits gezeigt, dass Butyrat die Entwicklung eines anti-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyps unterstützen kann (Ji *et al.*, 2016; Schulthess *et al.*, 2019). Hierbei kann Butyrat den NF κ B-Signalweg und die damit verbundene Produktion von TNF- α unterdrücken und über STAT6 die Makrophagen-Polarisierung stimulieren (Segain *et al.*, 2000; Lühns *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017). In IL-4 polarisierten BMDMs aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen konnte nach Butyrat-Behandlung eine erhöhte Expression von *Stat6* auf mRNA-Ebene gezeigt werden (vgl. Abb. 24). Dies suggeriert eine partielle Aktivierung von STAT6 über PDGFR- α und dadurch eine wichtige Rolle von PDGFR- α in der anti-inflammatorischen Makrophagen-Polarisierung. Damit einhergehend konnte in BMDMs aus LysM-PDGFR- $\alpha^{+/+}$ -Mäusen nach Butyrat-Behandlung eine signifikante Hochregulierung von *Pdgfra* auf mRNA-Ebene gezeigt werden (vgl. Abb. 25). Ergänzend dazu wurde in anderen Publikationen bereits gezeigt, dass Butyrat die Hochregulierung von *Egfr* stimulieren kann (Gladhaug *et al.*, 1988; Gladhaug *et al.*, 1989). EGFRs und PDGFRs bilden die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, die konservierte strukturelle Eigenschaften für die Ligandenbindung besitzen (Ferguson, 2008; Heldin & Westermark, 1999). In diesem Zusammenhang könnte Butyrat über solche konservierten Bereiche möglicherweise auch eine Hochregulierung von *Pdgfra* in Makrophagen stimulieren und somit zur anti-inflammatorischen Makrophagen-Polarisierung über STAT6 beitragen.

4.7. Konklusion & Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sowie bisher publizierte Studien suggerieren eine wichtige Rolle für PDGFR- α in intestinaler Homöostase und Inflammation sowohl in Mäusen als auch in Menschen. Hierbei scheint PDGFR- α als Regulator von pro- und anti-inflammatorischen Prozessen und Eigenschaften von

Makrophagen zu fungieren. Weiterhin deuten die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit auf eine besondere Funktion von myeloidem PDGFR- α im Hinblick auf die intestinale Barriereintegrität und damit verbundenen Modulation des Mikrobioms hin. Die gezielte Induktion der *Pdgfra*-Expression in Makrophagen zur Verringerung der entzündlichen Aktivität und Verbesserung der mikrobiellen Zusammensetzung des Darms über die Stabilisierung der epithelialen Barriereintegrität könnte daher ein möglicher Ansatz für eine CED-Therapie sein.

Die Ergebnisse dieser Studie werden durch den spezifischen *Knockout* in myeloiden Zellen limitiert, da dieser mehrere Zelltypen (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) betrifft und dadurch die Differenzierung von Effekten einzelner Zelltypen erschwert, insbesondere, weil all diese Zelltypen in die intestinale Homöostase und inflammatorische Prozesse involviert sind. Damit einhergehend exprimieren beispielsweise Mikrogliazellen, die sich vermutlich von Makrophagen ableiten, auch Lysozym M (Heppner *et al.*, 2005) und könnten demnach auch von dem *Knockout* betroffen sein, was zusätzlich bei der Ergebnisinterpretation berücksichtigt werden muss, denn dieser Zelltyp kann ähnlich wie intestinale Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, die dann zum Beispiel das Neuritenwachstum, die Gliogenese und Angiogenese regulieren können (Pons & Rivest, 2020). Der Gastrointestinaltrakt kann über die *Gut-Brain Axis* (GBA) mit dem zentralen Nervensystem über verschiedene Signalwege (Vagus Nerv (Bonaz *et al.*, 2018), HPA-Achse (Vagnerová *et al.*, 2019), Tryptophan Metabolismus (Gao *et al.*, 2020) und Neurotransmitter (Mittal *et al.*, 2018) bidirektional kommunizieren (Carabotti *et al.*, 2015). Somit könnte möglicherweise die Abnahme intestinaler SCFAs auch einen Einfluss auf kognitive Strukturen und damit verbundener Eigenschaften haben. In diesem Zusammenhang konnten Chen und Kollegen bereits zeigen, dass Butyrat die Demyelinisierung, so, wie sie sich in der Pathogenese von multipler Sklerose (MS) manifestiert, unterdrücken und sogar die Remyelinisierung verstärken kann (Chen *et al.*, 2019). Hierbei könnte möglicherweise die Produktion von Wachstumsfaktoren wie PDGFs auch eine relevante Rolle im Kontext der Wundheilung und Remyelinisierung spielen. Insgesamt müsste jedoch für eine präzisere Aussage über die Funktion von PDGFR- α in Mikrogliazellen, Monozyten, neutrophilen und dendritischen Zellen eine spezifischere Depletion von PDGFR- α in den jeweiligen Zelltypen mittels anderer konditioneller *Knockouts* generiert und analysiert werden.

Die Isolation von Makrophagen aus dem Knochenmark hingegen, kann Interaktionen mit anderen Zelltypen verhindern. Jedoch wurde hierbei bereits gezeigt, dass sich LP-Makrophagen und BMDMs in ihren Charakteristika und Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden (Gordon *et al.*, 2014) und eine Übertragbarkeit von

Ergebnissen deswegen nur limitiert möglich ist. Demnach könnte eine Kombination aus *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen eine fundierte Basis für aufbauende Studien bieten.

Um die Daten der qRT-PCR im Hinblick auf die Hochregulierung von PDGFR- α durch Butyrat zu stützen, wäre ein Aktivierungsnachweis des Rezeptors nach Butyrat-Behandlung auf Proteinebene mittels Western Blot förderlich. Gleiches gilt für die Aktivierung von STAT6 mittels Phosphorylierung von PDGFR- α . Damit einhergehend könnte in einem zusätzlichen *in vivo* DSS-Experiment mit einer Butyrat-Behandlung die Arbeits-Hypothese abschließend bestätigt werden, denn hier würde man erwarten, dass eine Butyrat-Behandlung in Wildtypen eine Verbesserung des Colitis-Verlaufs impliziert, jedoch in KO-Tieren, aufgrund der myeloiden Depletion von PDGFR- α , kaum eine Verbesserung erzielen würde. Zusätzlich könnte eine Metabolom-Analyse Butyrat beziehungsweise Buttersäure als Ziel-SCFA identifizieren, da in der Mikrobiom-Analyse neben der Klasse *Clostridia* auch im Phylum *Bacteroidetes* eine verringerte Abundanz nachgewiesen wurde. Anders als *Clostridia* produzieren diese Bakterien prädominant Essigsäure/Actetat und Propionsäure/Propionat anstelle von Buttersäure/Butyrat. Somit könnten mittels Analyse des Metaboloms die Ziel-SCFA und andere wichtige mikrobielle Metabolite, die in den myeloiden PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg involviert sind, identifiziert werden.

Neben der Analyse myeloider LP-Zellen im Hinblick auf PDGFR- α , wäre auch eine Analyse von LP-Lymphozyten interessant, denn hier könnte der Verlust von myeloidem PDGFR- α beispielsweise einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung und -Funktion zur Folge haben. Kritisch für die Aktivierung von T-Zellen ist die Anwesenheit von APZ wie Makrophagen bei jedem Aktivierungsschritt und jeder Effektorphase. Hierbei fungieren Makrophagen als zentrale Regulatoren der T-Zell-Aktivierung (Guerriero, 2019). Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung identifizieren und präsentieren Makrophagen naiven T-Zellen unbekannte Antigene über oberflächengebundene MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Rezeptoren, wobei der MHCI-Klasse-Weg CD8⁺ T-Killerzellen und der MHCII-Klasse-Weg CD4⁺ T-Helferzellen aktiviert (Martín-Orozco *et al.*, 2001; Gaudino & Kumar, 2019; Kiritsy *et al.*, 2021). Somit könnte eine Verarmung an CD206⁺ MHCII⁺ Makrophagen durch den Verlust von myeloidem PDGFR- α potenziell Einfluss auf die Aktivierung von T-Helferzellen haben, und somit nicht nur die angeborene, sondern auch die adaptive Immunantwort modulieren.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nicht nur eine protektive, anti-inflammatorische Wirkung von myeloidem PDGFR- α bei intestinaler Inflammation nachgewiesen, sondern der PDGFR- α /PDGF-A-Signalweg als wichtiger Mediator der anti-inflammatorischen Makrophagen-Polarisierung identifiziert und die Notwendigkeit von myeloiden PDGFs für die Aufrechterhaltung der mukosalen Integrität sowie der damit

verbundenen mikrobiellen Kolonisierung hervorgehoben. Da der Verlust von myeloidem PDGFR- α in einer intestinalen Epitheldysfunktion und damit verbundenen mikrobiellen Dysbiose resultiert, ähnlich wie es sich in Patient:innen mit CED manifestiert, könnte es sich bei diesem Rezeptor um ein vielversprechendes Zielmolekül für die Therapie von CED handeln.

IV. LITERATUR

- Abram, C., Roberge, G., Hu, Y., & Lowell, C. (2014). Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-YFP reporter mice. *J Immunol Methods*, *408*, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.009>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alivernini, S., MacDonald, L., Elmesmari, A., Finlay, S., Tolusso, B., Gigante, M. R., Petricca, L., Di Mario, C., Bui, L., Perniola, S., Attar, M., Gessi, M., Fedele, A. L., Chilaka, S., Somma, D., Sansom, S. N., Filer, A., McSharry, C., Millar, N. L., ... Kurowska-Stolarska, M. (2020). Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nature Medicine*, *26*(8), 1295–1306. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0939-8>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, *39*, 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *12*(4), 205–217. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
- Andersson, M., Ostman, A., Backstrom, G., Hellman, U., George-Nascimento, C., Westermark, B., & Heldin, C. H. (1992). Assignment of interchain disulfide bonds in platelet-derived growth factor (PDGF) and evidence for agonist activity of monomeric PDGF. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(16), 11260–11266. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)49905-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)49905-5)
- Anisiewicz, A., Łabędź, N., Krauze, I., & Wietrzyk, J. (2020). Calcitriol in the presence of conditioned media from metastatic breast cancer cells enhances ex vivo polarization of m2 alternative murine bone marrow-derived macrophages. *Cancers*, *12*(11), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers12113485>
- Anthony, R. M., Jr, J. F. U., Alem, F., Hamed, H. A., & Cristina, T. (2007). Mediate Protection Against Nematode Parasites. *12*(8), 955–960.
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Hollinger, L. A., Wolpert, E. B., & Gardner, T. W. (1999). Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(33), 23463–23467. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23463>
- Antoniades, H. N. (1981). *platelet-derived Purification*. *78*(12), 7314–7317.
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W. W., & Mowat, A. M. I. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C hi monocyte precursors. *Mucosal Immunology*, *6*(3), 498–510. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.89>
- Bain, Calum C., & Schridde, A. (2018). Origin, differentiation, and function of intestinal macrophages. *Frontiers in Immunology*, *9*(NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02733>
- Battegay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H., & Pech, M. (1994). PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF β -receptors. *Journal of Cell Biology*, *125*(4), 917–928. <https://doi.org/10.1083/jcb.125.4.917>
- Beck, P., & Podolsky, D. (1999). Growth Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *5*(1), 44–60. <https://doi.org/10.1002/ibd.3780050108>
- Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Kiesslich, R., Lehr, H. A., Galle, P. R., & Neurath, M. F. (2005). In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut*, *54*(7), 950–954. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.061283>
- Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Östman, A., Heldin, C. H., Alitalo, K., & Eriksson, U. (2001). PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β -receptor. *Nature Cell Biology*, *3*(5), 512–516. <https://doi.org/10.1038/35074588>
- Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, T. B., Philpott, K., Mellor, A. L., Knott, T. J., & Scott, J. (1986). cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature*, *320*(6064), 695–699. <https://doi.org/10.1038/320695a0>
- Bhinder, G., Sham, H. P., Chan, J. M., Morampudi, V., Jacobson, K., & Vallance, B. A. (2013). The Citrobacter rodentium mouse model: studying pathogen and host contributions to infectious colitis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *72*, 1–7. <https://doi.org/10.3791/50222>
- Binder, V., & Orholm, M. (1996). Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Netherlands Journal of Medicine*, *48*(2), 53–56. [https://doi.org/10.1016/0300-2977\(95\)00093-3](https://doi.org/10.1016/0300-2977(95)00093-3)
- Binder, Vibeke. (1998). Genetic Epidemiology in Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases*, *16*(6),

- 351–355. <https://doi.org/10.1159/000016891>
- Bishayee, S., Majumdar, S., Khire, J., & Das, M. (1989). Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(20), 11699–11705. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)80121-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)80121-1)
- Blatti, S. P., Foster, D. N., Ranganathan, G., Moses, H. L., & Getz, M. J. (1988). Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(4), 1119–1123. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1119>
- Blottière, H. M., Buecher, B., Galmiche, J.-P., & Cherbut, C. (2003). Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society*, *62*, 101–106.
- Boillot, J., Alamowitch, C., Berger, A.-M., Luo, J., Bruzzo, F., Bornet, F. R. J., & Slama, G. (1995). Effects of dietary propionate on hepatic glucose production, whole-body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism in normal rats. *British Journal of Nutrition*, *73*(2), 241–251. <https://doi.org/10.1079/bjn19950026>
- Bonaz, B., Bazin, T., & Pellissier, S. (2018). The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00049>
- Bording-Jorgensen, M., Armstrong, H., Wickenberg, M., LaPointe, P., & Wine, E. (2021). Macrophages and Epithelial Cells Mutually Interact through NLRP3 to Clear Infection and Enhance the Gastrointestinal Barrier. *Immuno*, *2*(1), 13–25. <https://doi.org/10.3390/immuno2010002>
- Bork, P., & Beckmann, G. (1993). A widespread module in developmentally regulated proteins. *Journal of Molecular Biology*, *231*(231), 539–545. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1305>
- Boström, H., Willetts, K., Pekny, M., Levéen, P., Lindahl, P., Hedstrand, H., Pekna, M., Hellström, M., Gebre-Medhin, S., Schalling, M., Nilsson, M., Kurland, S., Törnell, J., Heath, J. K., & Betsholtz, C. (1996). PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*, *85*(6), 863–873. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81270-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81270-2)
- Bouladoux, N., Harrison, O. J., & Belkaid, Y. (2017). The mouse model of infection with *Citrobacter rodentium*. *Current Protocols in Immunology*, *2017*(November), 19.15.1–19.15.25. <https://doi.org/10.1002/cpim.34>
- Boyapati, R., Satsangi, J., & Ho, G. T. (2015). Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000Prime Reports*, *7*(April). <https://doi.org/10.12703/P7-44>
- Brahmi, M., Lesluyes, T., Dufresne, A., Toulmonde, M., Italiano, A., Mir, O., Le Cesne, A., Valentin, T., Chevreau, C., Bonvalot, S., Penel, N., Coindre, J. M., Le Guellec, S., Le Loarer, F., Karanian, M., Blay, J. Y., & Chibon, F. (2021). Expression and prognostic significance of PDGF ligands and receptors across soft tissue sarcomas. *ESMO Open*, *6*(1), 100037. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2020.100037>
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., & Lakatos, P. L. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's and Colitis*, *7*(4), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.010>
- Burton, N. A., Schürmann, N., Casse, O., Steeb, A. K., Claudi, B., Zankl, J., Schmidt, A., & Bumann, D. (2014). Disparate impact of oxidative host defenses determines the fate of salmonella during systemic infection in mice. *Cell Host and Microbe*, *15*(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.006>
- Büscher, M. (2019). Flow Cytometry Instrumentation – An Overview. *Current Protocols in Cytometry*, *87*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/cpcy.52>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Candela, M., Biagi, E., Maccaferri, S., Turroni, S., & Brigidi, P. (2012). Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends in Microbiology*, *20*(8), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.05.003>
- Cani, P. D., & de Vos, W. M. (2017). Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, *8*(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01765>
- Cao, R., Bråkenhielm, E., Li, X., Pietras, K., Widenfalk, J., Östman, A., Eriksson, U., & Cao, Y. (2002). Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- α and - β receptors. *The FASEB Journal*, *16*(12), 1575–1583. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0319com>
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, *28*(2), 203–209.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D., Corfe, B., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health & Disease*, *26*.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota

- in disease. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0), 1–9.
<https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191>
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Aleardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., & Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*, 5(8), 919–923. <https://doi.org/10.1038/11360>
- Centre, B. (1996). *IUROSCIUiC [LEIT [RS Protective effect of platelet-derived growth factor against. 204*, 101–104.
- Cereijido, M., Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D., & Larre, I. (2008). Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 770–793. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2007.09.001>
- Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 599–608. <https://doi.org/10.1080/01926230600865531>
- Chan, F., Liu, Y., Sun, H., Li, X., Shang, H., Fan, D., An, J., & Zhou, D. (2010). Distribution and possible role of PDGF-AA and PDGFR- α in the gastrointestinal tract of adult guinea pigs. *Virchows Archiv*, 457(3), 381–388. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0946-0>
- Chang, J. T. (2020). Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *The New England Journal of Medicine*, 383, 2652–2664. <https://doi.org/10.2310/gastro.5412>
- Chang, K. K., Yoon, C., Yi, B. C., Tap, W. D., Simon, M. C., & Yoon, S. S. (2018). Platelet-derived growth factor receptor- α and - β Promote cancer stem cell phenotypes in sarcomas. *Oncogenesis*, 7(6), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0059-1>
- Chang, S. K., Dohrman, A. F., Basbaum, C. B., Ho, S. B., Tsuda, T., Toribara, N. W., Gum, J. R., & Kim, Y. S. (1994). Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology*, 107(1), 28–36. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90057-4)
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., & Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2247–2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2015). DSS Protocol. *Curr Protoc Immunol*, 27(4), 1–19. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104.Dextran>
- Chazaud, B. (2014). Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*, 219(3), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.09.001>
- Cheifetz, A. S. (2013). Management of active Crohn disease. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 309(20), 2150–2158. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.4466>
- Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., & Rock, K. L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine*, 13(7), 851–856. <https://doi.org/10.1038/nm1603>
- Chen, T., Noto, D., Hoshino, Y., Mizuno, M., & Miyake, S. (2019). Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1552-y>
- Chiara, F., Goumans, M. J., Forsberg, H., Ahgrén, A., Rasola, A., Aspenström, P., Wernstedt, C., Hellberg, C., Heldin, C. H., & Heuchel, R. (2004). A gain of function mutation in the activation loop of platelet-derived growth factor β -receptor deregulates its kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42516–42527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406051200>
- Chiaranunt, P., Tai, S. L., Ngai, L., & Mortha, A. (2021). Beyond Immunity: Underappreciated Functions of Intestinal Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 12(September), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.749708>
- Choy, M. C., Visvanathan, K., & De Cruz, P. (2017). An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(1), 2–13. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000955>
- Chu, S., & Montrose, M. H. (1995). Extracellular pH regulation in microdomains of colonic crypts: Effects of short-chain fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3303–3307. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3303>
- Clark, R. A. F., Folkvord, J. M., Charles, E., Murray, M. J., & John, M. (1989). *Fibroblasts To Contract Collagen Matrices*. 84(September), 1036–1040.
- Clark, S. E., Burrack, K. S., Jameson, S. C., Hamilton, S. E., & Lenz, L. L. (2019). NK Cell IL-10 Production Requires IL-15 and IL-10 Driven STAT3 Activation. *Frontiers in Immunology*, 10(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02087>
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli* © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . *Gut*

- Microbs*, 3(April), 71–87.
- Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., & Nicod, L. P. (1999). Human Lung Dendritic Cells Have an Immature Phenotype with Efficient Mannose Receptors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21(5), 547–554. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.5.3785>
- Collins, J. W., Keeney, K. M., Crepin, V. F., Rathinam, V. A. K., Fitzgerald, K. A., Finlay, B. B., & Frankel, G. (2014). *Citrobacter rodentium*: Infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 612–623. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3315>
- Collins, P., & Rhodes, J. (2006). Ulcerative colitis: Diagnosis and management. *British Medical Journal*, 333(7563), 340–343. <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7563.340>
- Cone, R. A. (2009). Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.008>
- Cornick, S., Tawiah, A., & Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, 3(1), 1–2. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>
- Coussens, L., Van Beveren, C., Smith, D., Chen, E., Mitchell, R. L., Isacke, C. M., Verma, I. M., & Ullrich, A. (1986). Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene *fms* at carboxyl terminus. *Nature*, 320(6059), 277–280. <https://doi.org/10.1038/320277a0>
- Crepin, V. F., Collins, J. W., Habibzay, M., & Frankel, G. (2016). *Citrobacter rodentium* mouse model of bacterial infection. *Nature Protocols*, 11(10), 1851–1876. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.100>
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, H. W. J., Naylor, C. P. E., & MacFarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>
- Czimmerer, Z., Daniel, B., Horvath, A., Ruckerl, D., Nagy, G., Kiss, M., Peloquin, M., Budai, M. M., Cuaranta-Monroy, I., Simandi, Z., Steiner, L., Nagy, B., Poliska, S., Banko, C., Bacso, Z., Schulman, I. G., Sauer, S., Deleuze, J. F., Allen, J. E., ... Nagy, L. (2018). The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity*, 48(1), 75–90.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.010>
- Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S., & Albina, J. E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(1), 64–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.0407247>
- Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *The New England Journal of Medicine*, 365, 1713–1725. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1102942>
- Daniel, T. O., Gibbs, V. C., Milfay, D. F., Garovoy, M. R., & Williams, L. T. (1986). Thrombin stimulates *c-sis* gene expression in microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261(21), 9579–9582. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67551-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67551-9)
- Darfeuille-Michaud, A., & Colombel, J. F. (2008). Pathogenic *Escherichia coli* in inflammatory bowel diseases. Proceedings of the 1st International Meeting on *E. coli* and IBD, June 2007, Lille, France. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2(3), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2008.02.003>
- Darnell, J. E. (1997). STATs and gene regulation. *Science*, 277(5332), 1630–1635. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1630>
- Delprat, V., Tellier, C., Demazy, C., Raes, M., Feron, O., & Michiels, C. (2020). Cycling hypoxia promotes a pro-inflammatory phenotype in macrophages via JNK/p65 signaling pathway. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57677-5>
- den Haan, J. M. M., Arens, R., & van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, 162(2), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.011>
- Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R., & Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, 8(10), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/ni1511>
- Desgeorges, T., Caratti, G., Mounier, R., Tuckermann, J., & Chazaud, B. (2019). Glucocorticoids shape macrophage phenotype for tissue repair. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01591>
- Dhabhar, F. S., Malarkey, W. B., Neri, E., & McEwen, B. S. (2012). *Stress-induced redistribution of immune cells - from barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones*. 37(9), 1345–1368. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.008>. STRESS-INDUCED
- Díaz-Coránguez, M., Liu, X., & Antonetti, D. A. (2019). Tight junctions in cell proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235972>
- DiCorleto, P. E., & Bowen Pope, D. F. (1983). Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(7 I), 1919–1923. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1919>
- Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095–2147.

- <https://doi.org/10.1182/blood.v87.6.2095.bloodjournal8762095>
- Duerkop, B. A., Vaishnava, S., & Hooper, L. V. (2009). Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity*, *31*(3), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.009>
- Duerr, R., Taylor, K., Brant, S., Rioux, J., Silverberg, M., Daly, M., Steinhart, H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L., Kistner, E., Schumm, P., Lee, A., Gregersen, P., ... Cho, J. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, *314*(5804), 1461–1463. <https://doi.org/10.1126/science.1135245>
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, *20*(1), 34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Edelberg, J. M., Aird, W. C., Wu, W., Rayburn, H., Mamuya, W. S., Mercola, M., & Rosenberg, R. D. (1998). PDGF mediates cardiac microvascular communication. *Journal of Clinical Investigation*, *102*(4), 837–843. <https://doi.org/10.1172/JCI3058>
- Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A., & Mosser, D. A. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.*, *80*(6), 1298–1307. <https://doi.org/10.1189/jlb.0406249>
- Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry*, *56*(2), 319–320. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odoriso, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B., & Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(12), 3573–3585. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>
- Fabriek, B. O., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*, *210*(2–4), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.010>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(4), 890–898. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>
- Faust, N., Varas, F., Kelly, L. M., Heck, S., & Graf, T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood*, *96*(2), 719–726. <https://doi.org/10.1182/blood.v96.2.719>
- Feng, W., Ao, H., & Peng, C. (2018). Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01354>
- Ferguson, K. M. (2008). A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annu Rev Biophys*, *37*, 353–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125829.A>
- Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., & Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology*, *3*(10), 944–950. <https://doi.org/10.1038/ni833>
- Fiorentino, D., Bond, M., & Mosmann, T. (1989). Two Types of Mouse T Helper Cell. *Journal of Experimental Medicine*, *170*(December 1989), 2081–2095. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2189521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute. *Gut Microbes*, *August*, 289–306.
- Flores, V. M. Q., Campos de Souza Fernandes, R. C., De Macedo, Z. S., & Medina-Acosta, E. (2002). Expression and purification of the recombinant enteropathogenic Escherichia coli vaccine candidates BfpA and EspB. *Protein Expression and Purification*, *25*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1604>
- Foss, B., Ulvestad, E., & Bruserud, Ø. (2001). Erratum: Platelet-derived growth factor (PDGF) in human acute myelogenous leukemia: PDGF receptor expression, endogenous PDGF release and responsiveness to exogenous PDGF isoforms by in vitro cultured acute myelogenous leukemia blasts (European Journal of. *European Journal of Haematology*, *67*(4), 267–278. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2001.0430a.x>
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R., & Nunez, G. (2009). The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis. *Nature Immunology*, *10*(3), 734–764. <https://doi.org/10.1038/ni.1703>
- Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(34), 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>

- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T. H., Hedderich, J., May, S., Lu, T., Schuldt, D., Nikolaus, S., Rosenstiel, P., Krawczak, M., & Schreiber, S. (2008). Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nature Genetics*, *40*(6), 713–715. <https://doi.org/10.1038/ng.148>
- Frankel, N. W., & Lim, W. A. (2018). Building a Stable Relationship: Ensuring Homeostasis among Cell Types within a Tissue. *Cell*, *172*(4), 638–640. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.024>
- Fraser, I. P., & Ezekowitz, R. A. B. (1999). Mannose receptor and phagocytosis. *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*, *5*(C), 87–101. [https://doi.org/10.1016/S1874-5172\(99\)80029-7](https://doi.org/10.1016/S1874-5172(99)80029-7)
- Fries, W., & Comunale, S. (2011). *Ulcerative Colitis : Pathogenesis*. 1373–1382.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E. L., & Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, *5*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Gabanyi, I., Muller, P., Feighery, L., Oliveira, T., Costa-Pinto, F., & Mucida, D. (2016). Neuro-immune interactions drive tissue programming in intestinal macrophages. *Cell*, *164*(3), 378–391. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023>. Neuro-immune
- Gao, K., Mu, C. L., Farzi, A., & Zhu, W. Y. (2020). Tryptophan Metabolism: A Link between the Gut Microbiota and Brain. *Advances in Nutrition*, *11*(3), 709–723. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz127>
- Gaudino, S. J., & Kumar, P. (2019). Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00360>
- Gecse, K., Khanna, R., Stoker, J., Jenkins, J. T., Gabe, S., Hahnloser, D., & D'Haens, G. (2013). Fistulizing crohn's disease: Diagnosis and management. *United European Gastroenterology Journal*, *1*(3), 206–213. <https://doi.org/10.1177/2050640613487194>
- Geerlings, S. Y., Kostopoulos, I., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2018). Akkermansia muciniphila in the human gastrointestinal tract: When, where, and how? *Microorganisms*, *6*(3), 1–26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030075>
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, *19*(1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Gent, A. E., Hellier, M. D., Grace, R. H., Swarbrick, E. T., & Coggon, D. (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *The Lancet*, *343*, 766–767. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91841-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91841-4)
- Gilbertson, D. G., Duff, M. E., West, J. W., Kelly, J. D., Sheppard, P. O., Hofstrand, P. D., Gao, Z., Shoemaker, K., Bukowski, T. R., Moore, M., Feldhaus, A. L., Humes, J. M., Palmer, T. E., & Hart, C. E. (2001). Platelet-derived Growth Factor C (PDGF-C), a Novel Growth Factor that Binds to PDGF α and β Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(29), 27406–27414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101056200>
- Gillett, A., Marta, M., Jin, T., Tuncel, J., Leclerc, P., Nohra, R., Lange, S., Holmdahl, R., Olsson, T., Harris, R. A., & Jagodic, M. (2010). TNF Production in Macrophages Is Genetically Determined and Regulates Inflammatory Disease in Rats. *The Journal of Immunology*, *185*(1), 442–450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904101>
- Giroux, M., Schmidt, M., & Descoteaux, A. (2003). IFN- γ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C- α . *The Journal of Immunology*, *171*(8), 4187–4194. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4187>
- Gladhaug, I. P., Refsnes, M., & Christoffersen, T. (1989). Regulation of hepatocyte epidermal growth factor receptors by n-butyrate and dimethyl sulfoxide: Sensitivity to modulation by the tumor promoter TPA. *Anticancer Research*, *9*(6), 1587–1592.
- Gladhaug, Ivar P., Refsnes, M., Sand, T. E., & Christoffersen, T. (1988). Effects of Butyrate on Epidermal Growth Factor Receptor Binding, Morphology, and DNA Synthesis in Cultured Rat Hepatocytes. *Cancer Research*, *48*(22), 6560–6564.
- Goenka, S., & Kaplan, M. H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunologic Research*, *50*(1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8205-2>
- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews*, *262*(1), 36–55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>
- Griffiths, A. M. (2004). Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, *18*(3), 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2004.01.002>
- Gröger, M., Holnthoner, W., Maurer, D., Lechleitner, S., Wolff, K., Mayr, B. B., Lubitz, W., & Petzelbauer, P.

- (2000). Dermal Microvascular Endothelial Cells Express the 180-kDa Macrophage Mannose Receptor In Situ and In Vitro. *The Journal of Immunology*, 165(10), 5428–5434. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5428>
- Guan, Q. (2019). A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
- Guan, Q., & Zhang, J. (2017). Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation*, 2017(Dc). <https://doi.org/10.1155/2017/4810258>
- Guerrero, J. L. (2019). Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 342). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.07.001>
- Guha, A., Glowacka, D., Carroll, R., Dashner, K., Black McL., P., & Stiles, C. D. (1995). Expression of platelet derived growth factor and platelet derived growth factor receptor mRNA in a glioblastoma from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 58(6), 711–714. <https://doi.org/10.1136/jnnp.58.6.711>
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., & He, P. (2020). Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>
- Hamilton, A. (1997). CSF-1 signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 62, 145–155.
- Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Ostman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, A., & Heldin, C. H. (1988). A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *Journal of Biological Chemistry*, 263(31), 16493–16498. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37619-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37619-1)
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., ... Schreiber, S. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics*, 39(2), 207–211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>
- Haniu, M., Hsieh, P., Rohde, M. F., & Kenney, W. C. (1994). Characterization of disulfide linkages in platelet-derived growth factor AA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2), 433–439. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1189>
- Haniu, M., Rohde, M. F., & Kenney, W. C. (1993). Disulfide Bonds in Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor BB Dimer: Characterization of Intermolecular and Intramolecular Disulfide Linkages. *Biochemistry*, 32(9), 2431–2437. <https://doi.org/10.1021/bi00060a039>
- Hansson, G. C. (2019). Mucus and mucins in diseases of the intestinal and respiratory tracts. *Journal of Internal Medicine*, 285(5), 479–490. <https://doi.org/10.1111/joim.12910>
- Harhaj, N. S., Barber, A. J., & Antonetti, D. A. (2002). Platelet-derived growth factor mediates tight junction redistribution and increases permeability in MDCK cells. *Journal of Cellular Physiology*, 193(3), 349–364. <https://doi.org/10.1002/jcp.10183>
- Hayashi, H., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2002). Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiology and Immunology*, 46(8), 535–548. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02731.x>
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, 54(11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45935-0>
- Heidaran, M. A., Pierce, J. H., Jensen, R. A., Matsui, T., & Aaronson, S. A. (1990). Chimeric α - and β -platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the α -PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 18741–18744. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)30572-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)30572-0)
- Heldin, C. H., Ernlund, A., Rorsman, C., & Ronnstrand, L. (1989). Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8905–8912. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)81879-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)81879-8)
- Heldin, C. H., Lennartsson, J., & Westermark, B. (2018). Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. *Journal of Internal Medicine*, 283(1), 16–44. <https://doi.org/10.1111/joim.12690>
- Heldin, Carl Henrik, & Lennartsson, J. (2013). Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009100>

- Heldin, Carl Henrik, Östman, A., & Rönstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1378(1).
[https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(98\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(98)00015-8)
- Heldin, Carl Henrik, & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, 79(4), 1283–1316.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1283>
- Heldin, P., Laurent, T. C., & Heldin, C. H. (1989). Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 258(3), 919–922.
<https://doi.org/10.1042/bj2580919>
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14), 3047–3055. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3047>
- Henson, M. A., & Phalak, P. (2017). Microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases: In silico investigation of the oxygen hypothesis. *BMC Systems Biology*, 11(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s12918-017-0522-1>
- Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., Waisman, A., Rüllicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B., & Aguzzi, A. (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature Medicine*, 11(2), 146–152. <https://doi.org/10.1038/nm1177>
- Herb, M., & Schramm, M. (2021). Functions of ros in macrophages and antimicrobial immunity. *Antioxidants*, 10(2), 1–39. <https://doi.org/10.3390/antiox10020313>
- Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Westermark, B., Heldin, C. H., & Nister, M. (1992). Platelet-derived Growth Factor and Its Receptors in Human Glioma Tissue: Expression of Messenger RNA and Protein Suggests the Presence of Autocrine and Paracrine Loops. *Cancer Research*, 52(11), 3213–3219.
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford. *Clinical Chemistry*, 48(10), 1819–1827. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.10.1819>
- Hibbs, J. B., Vavrin, Z., & Taintor, R. R. (1987). L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *Journal of Immunology*, 138(2), 550–565. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432129>
- Hidalgo-Cantabrana, C., Algeri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Martínez-Cambor, P., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., & Gálvez, J. (2016). Effect of a rosy Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* strain orally administered on dss-induced colitis mice model. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00868>
- Hobbs, L., Allen, L., Bias, M., Johnson, S., DeRespiris, H., Diallo, C., Bui, L., & Sun, Y. (2021). The Opposing Role of Propionate in Modulating *Listeria monocytogenes* Intracellular Infections. *Frontiers in Microbiology*, 12(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.721801>
- Hoch, R. V., & Soriano, P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development*, 130(20), 4769–4784. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>
- Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M., & Chen, S. H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research*, 66(2), 1123–1131. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>
- Huang, H., Fang, M., Jostins, L., & Mirkov, M. U. (2017). *Europe PMC Funders Group Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single variant resolution*. 547(7662), 173–178.
<https://doi.org/10.1038/nature22969>. Fine-mapping
- Huang, L., Gebreselassie, N. G., Gagliardo, L. F., Ruyechan, M. C., Lee, N. A., Lee, J. J., & Appleton, J. A. (2014). Eosinophil-Derived IL-10 Supports Chronic Nematode Infection. *The Journal of Immunology*, 193(8), 4178–4187. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400852>
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Huber, F. J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C. J., Rudensky, A. Y., Roncarolo, M. G., Battaglia, M., & Flavell, R. A. (2011). Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3- and Foxp3+ Regulatory CD4+ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity*, 34(4), 554–565.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.020>
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., & Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599–603.
<https://doi.org/10.1038/35079107>
- Hume, D. A., Pavli, P., Donahue, R. E., & Fidler, I. J. (1988). The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte system in vivo. *The*

- Journal of Immunology*, 141(10), 3405–3409.
- Huynh, D., Akçora, D., Malaterre, J., Chan, C. K., Dai, X. M., Bertoncello, I., Stanley, E. R., & Ramsay, R. G. (2013). CSF-1 Receptor-Dependent Colon Development, Homeostasis and Inflammatory Stress Response. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056951>
- Ince, L. M., Weber, J., & Scheiermann, C. (2019). Control of leukocyte trafficking by stress-associated hormones. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03143>
- Inoue, N., Tamura, K., Kinouchi, Y., Fukuda, Y., Takahashi, S., Ogura, Y., Inohara, N., Núez, G., Kishi, Y., Koike, Y., Shimosegawa, T., Shimoyama, T., & Hibi, T. (2002). Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 123(1), 86–91. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.34155>
- Iovine, N. M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M. J., & Weinrauch, Y. (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 76(3), 986–993. <https://doi.org/10.1128/IAI.01063-07>
- Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D. E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., Sirard, J. C., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Rumbo, M. (2015). Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, 220(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.06.004>
- Irving, M. H., & Catchpole, B. (1992). Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *British Medical Journal*, 304(6834), 1106–1108.
- Ishihara, J., Ishihara, A., Fukunaga, K., Sasaki, K., White, M. J. V., Briquez, P. S., & Hubbell, J. A. (2018). Laminin heparin-binding peptides bind to several growth factors and enhance diabetic wound healing. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04525-w>
- Ivashkiv, L. B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 18(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Ji, J., Shu, D., Zheng, M., Wang, J., Luo, C., Wang, Y., Guo, F., Zou, X., Lv, X., Li, Y., Liu, T., & Qu, H. (2016). Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep24838>
- Johansson, M. E. V., Holmén Larsson, J. M., & Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4659–4665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johansson, M. E. V., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(6), 352–361. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Jones, C. V., & Ricardo, S. D. (2013). Macrophages and CSF-1: Implications for development and beyond. *Organogenesis*, 9(4), 249–260. <https://doi.org/10.4161/org.25676>
- Kai, A., Konishi, N., & Obata, H. (2010). [Diarrheagenic *Escherichia coli*]. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 68 Suppl 6(1), 203–207. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.403>
- Kanakaraj, P., Raj, S., Bishayee, S., & Khan, S. A. (1991). Ligand-Induced Interaction between α - and β -Type Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) Receptors: Role of Receptor Heterodimers in Kinase Activation. *Biochemistry*, 30(7), 1761–1767. <https://doi.org/10.1021/bi00221a005>
- Kang, B., Alvarado, L. J., Kim, T., Lehmann, M. L., Cho, H., He, J., Li, P., Kim, B. H., Larochelle, A., & Kelsall, B. L. (2020). Commensal microbiota drive the functional diversification of colon macrophages. *Mucosal Immunology*, 13(2), 216–229. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0228-3>
- Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M., & Witko-Sarsat, V. (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contributions to Microbiology*, 15, 118–146. <https://doi.org/10.1159/000136335>
- Karlsson, L., Lindahl, P., Heath, J. K., & Betsholtz, C. (2000). Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR- α deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development*, 127(16), 3457–3466. <https://doi.org/10.1242/dev.127.16.3457>
- Kasten, K. R., Muenzer, J. T., & Caldwell, C. C. (2010). Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(1), 28–31.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.066>
- Kawakami, K., Qifeng, M., Tohyama, M., Qureshi, M. H., & Saito, A. (1996). Contribution of tumor necrosis factor-alpha (TNF α) in host defense mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol*, *106*, 468–474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-870.x>
- Kazlauskas, A., & Cooper, J. A. (1989). Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell*, *58*(6), 1121–1133. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90510-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90510-2)
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kendrick, S. F. W., O'Boyle, G., Mann, J., Zeybel, M., Palmer, J., Jones, D. E. J., & Day, C. P. (2010). Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*, *51*(6), 1988–1997. <https://doi.org/10.1002/hep.23572>
- Kenney, W. C., Haniu, M., Herman, A. C., Arakawa, T., Costigan, V. J., Lary, J., Yphantis, D. A., & Thomason, A. R. (1994). Formation of mitogenically active PDGF-B dimer does not require interchain disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(16), 12351–12359. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32723-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32723-0)
- Kim, J. J., Shajib, M. S., Manocha, M. M., & Khan, W. I. (2012). Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of Visualized Experiments*, *60*, 1–6. <https://doi.org/10.3791/3678>
- Kim, S. Y., & Nair, M. G. (2019). Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunology and Cell Biology*, *97*(3), 258–267. <https://doi.org/10.1111/imcb.12236>
- Kim, Y., Nurakhayev, S., Nurkesh, A., Zharkinbekov, Z., & Saparov, A. (2021). Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22052715>
- Kimchi, E. T., Gusani, N. J., & Kaifi, J. T. (2012). Anatomy and physiology of the small intestine. In *Greenfield's Surgery: Scientific Principles and Practice: Fifth Edition* (Issue 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-40232-3.00071-6>
- Kiritsy, M. C., Ankley, L. M., Trombley, J., Huizinga, G. P., Lord, A. E., Orning, P., Elling, R., Fitzgerald, K. A., & Olive, A. J. (2021). A genetic screen in macrophages identifies new regulators of ifny-inducible mhcii that contribute to t cell activation. *ELife*, *10*, 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.65110>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Klinkhammer, B. M., Floege, J., & Boor, P. (2018). PDGF in organ fibrosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *62*, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.008>
- Knighton, D. R., & Fiegel, V. D. (1989). Macrophage-derived Growth Factors in Wound Healing. *American Review of Respiratory Disease*, *140*(4), 1108–1111. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/140.4.1108>
- Kobayashi, S. D., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2018). Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *Journal of Innate Immunity*, *10*(5–6), 432–441. <https://doi.org/10.1159/000487756>
- Kourembanas, S., Morita, T., Liu, Y., & Christou, H. (1997). Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney International*, *51*(2), 438–443. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.58>
- Kovarik, P., Castiglia, V., Ivin, M., & Ebner, F. (2016). Type I interferons in bacterial infections: A balancing act. *Frontiers in Immunology*, *7*(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00652>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, *54*(4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kreider, T., Anthony, R. M., Urban Jr., J. F., & Gause, W. C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*, *19*(4), 958–969. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.002>
- Kristek, M., Collins, L. E., DeCoursey, J., McEvoy, F. A., & Loscher, C. E. (2015). Soluble factors from colonic epithelial cells contribute to gut homeostasis by modulating macrophage phenotype. *Innate Immunity*, *21*(4), 358–369. <https://doi.org/10.1177/1753425914538294>
- Lakatos, P. L., Szamosi, T., & Lakatos, L. (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases: Good, bad or ugly? *World Journal of Gastroenterology*, *13*(46), 6134–6139. <https://doi.org/10.3748/wjg.13.6134>
- Larochelle, W. J., Jeffers, M., McDonald, W. F., Chillakuru, R. A., Giese, N. A., Lokker, N. A., Sullivan, C., Boldog, F. L., Yang, M., Vernet, C., Burgess, C. E., Fernandes, E., Deegler, L. L., Rittman, B., Shimkets, J., Shimkets, R. A., Rothberg, J. M., & Lichenstein, H. S. (2001). PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature Cell Biology*, *3*(5), 517–521. <https://doi.org/10.1038/35074593>
- Laroui, H., Ingersoll, S. A., Liu, H. C., Baker, M. T., Ayyadurai, S., Charania, M. A., Laroui, F., Yan, Y., Sitaraman, S. V., & Merlin, D. (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).

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032084>
- Lau, S. K., Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2004). Cd163. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(5), 794–801. <https://doi.org/10.1309/qhd6yfn81kqxuuh6>
- Lederle, W., Stark, H. J., Skobe, M., Fusenig, N. E., & Mueller, M. M. (2006). Platelet-derived growth factor-BB controls epithelial tumor phenotype by differential growth factor regulation in stromal cells. *American Journal of Pathology*, 169(5), 1767–1783. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060120>
- Lee, C., Kim, B. G., Kim, J. H., Chun, J., Im, J. P., & Kim, J. S. (2017). Sodium butyrate inhibits the NF-kappa B signaling pathway and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner. *International Immunopharmacology*, 51(August), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.023>
- Leemans, J. C., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2011). Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunological Reviews*, 243(1), 152–162. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01043.x>
- Leong, R. W. L., Armuzzi, A., Ahmad, T., Wong, M. L., Tse, P., Jewell, D. P., & Sung, J. J. Y. (2003). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17(12), 1465–1470. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01607.x>
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., & Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes and Development*, 8(16), 1875–1887. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1875>
- Levitzki, A. (2005). PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of restenosis. *Cardiovascular Research*, 65(3), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.08.008>
- Li, H., Fredriksson, L., Li, X., & Eriksson, U. (2003). PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene*, 22(10), 1501–1510. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206223>
- Li, X., & Eriksson, U. (2003). Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14(2), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00090-4)
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., & Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242>
- Lindahl, P., Karlsson, L., Hellström, M., Gebre-Medhin, S., Willetts, K., Heath, J. K., & Betsholtz, C. (1997). Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development*, 124(20), 3943–3953. <https://doi.org/10.1242/dev.124.20.3943>
- Liu, J., & Cao, X. (2016). Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(6), 711–721. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.58>
- Liu, S., Zhao, W., Lan, P., & Mou, X. (2021). The microbiome in inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to therapy. *Protein and Cell*, 12(5), 331–345. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00745-3>
- Lloyd-Price, J., Arze, C., Ananthakrishnan, A. N., Schirmer, M., Avila-Pacheco, J., Poon, T. W., Andrews, E., Ajami, N. J., Bonham, K. S., Brislawn, C. J., Casero, D., Courtney, H., Gonzalez, A., Graeber, T. G., Hall, A. B., Lake, K., Landers, C. J., Mallick, H., Plichta, D. R., ... Huttenhower, C. (2019). Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*, 569(7758), 655–662. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1237-9>
- Loftus, E. V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), 1504–1517. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.063>
- Loke, P., Gallagher, I., Nair, M. G., Zang, X., Brombacher, F., Mohrs, M., Allison, J. P., & Allen, J. E. (2007). Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4 + T Cells to be Sustained during Chronic Infection. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3926–3936. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3926>
- Lokker, N. A., O'Hare, J. P., Barsoumian, A., Tomlinson, J. E., Ramakrishnan, V., Fretto, L. J., & Giese, N. A. (1997). Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33037–33044. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.33037>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Luheshi, G., & Rothwell, N. (1996). Cytokines and Fever. *International Archives of Allergy and Immunology*, 109(4), 301–307. <https://doi.org/10.1159/000237256>
- Lührs, H., Gerke, T., Müller, J. G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberger, F., Scheppach, W., & Menzel, T. (2002). Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis.

- Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37(4), 458–466.
<https://doi.org/10.1080/003655202317316105>
- Ma, Y., Mouton, A. J., & Lindsey, M. L. (2018). Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Translational Research*, 191, 15–28.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.001>
- Macfarlane, G. T., Cummings, J. H., & Allison, C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology*, 132(6), 1647–1656. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-6-1647>
- Macpherson, A. J., & Uhr, T. (2016). *Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria* Author(s): Andrew J. Macpherson and Therese Uhr Source: 303(5664), 1662–1665.
- Manjili, M. H., Wang, X. Y., & Abrams, S. (2014). Evolution of our understanding of myeloid regulatory cells: From MDSCs to Mregs. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), 5–7.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00303>
- Manthey, C. F., Calabio, C. B., Wosinski, A., Hanson, E. M., Vallance, B. A., Groisman, A., Martín, M. G., Wang, J. Y. J., & Eckmann, L. (2014). Indispensable functions of ABL and PDGF receptor kinases in epithelial adherence of attaching/effacing pathogens under physiological conditions. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 307(2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00013.2014>
- Mao, L., Kitani, A., Strober, W., & Fuss, I. J. (2018). The role of NLRP3 and IL-1 β in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02566>
- Marchix, J., Goddard, G., & Helmrath, M. A. (2018). Host-Gut Microbiota Crosstalk in Intestinal Adaptation. *Cmgh*, 6(2), 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.01.024>
- Mariani, S., Basciani, S., Arizzi, M., Spera, G., & Gnessi, L. (2002). PDGF and the testis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(1), 11–17. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00518-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00518-5)
- Markowiak-Kopeć, P., & Śliżewska, K. (2020). The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12041107>
- Martín-Orozco, N., Isibasi, A., & Ortiz-Navarrete, V. (2001). Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- γ activation. *Immunology*, 103(1), 41–48. <https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01226.x>
- Matricon, J., Barnich, N., & Ardid, D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonsel - Immune Recognition and Signaling*, 1(4), 299–309.
<https://doi.org/10.4161/self.1.4.13560>
- Matsui, T., Heidarani, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J., & Aaronson, S. (1989). Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*, 243(4892), 800–804. <https://doi.org/10.1126/science.2536956>
- Matzinger, P. (2002). The danger model: A renewed sense of self. *Science*, 296(5566), 301–305.
<https://doi.org/10.1126/science.1071059>
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- McKeel, R., Douris, N., Foley, P. L., & Feldman, S. H. (2002). Comparison of an espB gene fecal polymerase chain reaction assay with bacteriologic isolation for detection of *Citrobacter rodentium* infection in mice. *Comparative Medicine*, 52(5), 439–444.
- Mellman, I., Turley, S. J., & Steinman, R. M. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends in Cell Biology*, 8(6), 231–237. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01276-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01276-8)
- Metcalf, A. M., Phillips, S. F., Zinsmeister, A. R., MacCarty, R. L., Beart, R. W., & Wolff, B. G. (1987). Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology*, 92(1), 40–47.
[https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90837-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90837-7)
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. B., & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 747–754. <https://doi.org/10.1084/jem.20041470>
- Mills, C. D. (2012). M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(6), 463–488. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10>
- Mirkov, M. U., Verstockt, B., & Cleynen, I. (2017). Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 2(3), 224–234. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30111-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30111-X)
- Mittal, R., Debs, L., Patel, A., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A., Deo, S., Daunert, S., & Liu, X. (2018). Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut-brain axis.

- Journal of Cellular Physiology*, 232(9), 2359–2372. <https://doi.org/10.1002/jcp.25518>
- Miyazawa, K., Bäckström, G., Leppänen, O., Persson, C., Wernstedt, C., Hellman, U., Heldin, C. H., & Östman, A. (1998). Role of immunoglobulin-like domains 2-4 of the platelet-derived growth factor α -receptor in ligand-receptor complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), 25495–25502. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25495>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Moore, K. W., Malefyt, R. D. W., Robert, L., & Garra, A. O. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10. *Molecular and Cellular Biology*, 1(1), 683–765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, 14(4), 793–802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
- Morhardt, T. L., Hayashi, A., Ochi, T., Quirós, M., Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Kuffa, P., Atarashi, K., Honda, K., Kao, J. Y., Nusrat, A., & Kamada, N. (2019). IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38125-x>
- Morris, S. M. (2007). Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *Journal of Nutrition*, 137(6). <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602s>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 858–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mosser, David M., Hamidzadeh, K., & Goncalves, R. (2021). Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(3), 579–587. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00541-3>
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Fisher, E. A., & Lawrence, T. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Nagata, K., & Nishiyama, C. (2021). IL-10 in mast cell-mediated immune responses: Anti-inflammatory and proinflammatory roles. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094972>
- Nagl, M., Kacani, L., Müllauer, B., Lemberger, E. M., Stoiber, H., Sprinzel, G. M., Schennach, H., & Dierich, M. P. (2002). Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1165–1168. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1165-1168.2002>
- Naik, S. H., Sathe, P., Park, H. Y., Metcalf, D., Proietto, A. I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., Kwak, J. Y., Wu, L., & Shortman, K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature Immunology*, 8(11), 1217–1226. <https://doi.org/10.1038/ni1522>
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Nathan, C. F. (1983). Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(5), 620–630. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90190-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90190-6)
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Ng, T. H. S., Britton, G. J., Hill, E. V., Verhagen, J., Burton, B. R., & Wraith, D. C. (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology*, 4(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129>
- Nguyen, G. C., Torres, E. A., Regueiro, M., Bromfield, G., Bitton, A., Stempak, J., Dassopoulos, T., Schumm, P., Gregory, F. J., Griffiths, A. M., Hanauer, S. B., Hanson, J., Harris, M. L., Kane, S. V., Orkwis, H. K., Lahaie, R., Oliva-Hemker, M., Pare, P., Wild, G. E., ... Silverberg, M. S. (2006). Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic whites: Characterization of a large North American cohort. *American Journal of Gastroenterology*, 101(5), 1012–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00504.x>
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1–10.

- <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
- O' Gara, A., & Vieira, P. (2007). Th1 cells control themselves by producing Interleukin-10. *Nature Reviews Immunology*, 7(June), 425–428.
- O'Shea, J., & Murray, P. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, 28(4), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.002>
- Omura, T., Heldin, C. H., & Östman, A. (1997). Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12676–12682. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12676>
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- Othberg, A., Odin, P., Ballagi, A., ÅAhgren, A., Funa, K., & Lindvall, O. (1995). Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro. *Experimental Brain Research*, 105(1), 111–122. <https://doi.org/10.1007/BF00242187>
- Parkes, M., Barrett, J. C., Prescott, N. J., Tremelling, M., Anderson, C. A., Fisher, S. A., Roberts, R. G., Nimmo, E. R., Cummings, F. R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C. W., Khawaja, S. A., Bagnall, R., Burke, D. A., Todhunter, C. E., Ahmad, T., Onnie, C. M., McArdle, W., ... Mathew, C. G. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics*, 39(7), 830–832. <https://doi.org/10.1038/ng2061>
- Patel, B. K. R., Wang, L. M., Lee, C. C., Taylor, W. G., Pierce, J. H., & LaRochelle, W. J. (1996). Stat6 and Jak1 are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 271(36), 22175–22182. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.22175>
- Paulsson, Y., Hammacher, A., Heldin, C. H., & Westermark, B. (1988). Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature*, 328(6132), 715–717. <https://doi.org/10.1038/328715a0>
- Pawson, T., & Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278(5346), 2075–2080. <https://doi.org/10.1126/science.278.5346.2075>
- Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P., Durand-Gasselin, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., Hervé, P., Emilie, D., Eddahibi, S., Simonneau, G., Souza, R., & Humbert, M. (2008). Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(1), 81–88. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1037OC>
- Peters, L. A., Perrigoue, J., Mortha, A., Iuga, A., Song, W. M., Neiman, E. M., Llewellyn, S. R., Di Narzo, A., Kidd, B. A., Telesco, S. E., Zhao, Y., Stojmirovic, A., Sendeki, J., Shameer, K., Miotto, R., Losic, B., Shah, H., Lee, E., Wang, M., ... Schadt, E. E. (2017). A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. *Nature Genetics*, 49(10), 1437–1449. <https://doi.org/10.1038/ng.3947>
- Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K., & Girardin, S. E. (2014). NOD proteins: Regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/nri3565>
- Piché, J. E., & Graves, D. T. (1989). Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: A comparison with human fibroblasts. *Bone*, 10(2), 131–138. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(89\)90011-2](https://doi.org/10.1016/8756-3282(89)90011-2)
- Pickard, J. M., Maurice, C. F., Kinnebrew, M. A., Abt, M. C., Schenten, D., Golovkina, T. V., Bogatyrev, S. R., Ismagilov, R. F., Pamer, E. G., Turnbaugh, P. J., & Chervonsky, A. V. (2014). Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. *Nature*, 514(7524), 638–641. <https://doi.org/10.1038/nature13823>
- Pierce, B. Y. G. F., Mustoe, T. A., Senior, R. M., Reed, J., Griffin, G. L., Thomason, A., & Deuel, T. F. (1988). *IN VIVO INCISIONAL WOUND HEALING AUGMENTED BY RECOMBINANT c-sis GENE HOMODIMERIC PROTEINS PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR AND Platelet-derived growth factor (PDGF)' was initially identified as a potent mitogen in human serum for mesenchymally derived cel.* 167(March).
- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Griffin, G. L., Senior, R. M., & Deuel, T. F. (1989). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *Journal of Cell Biology*, 109(1), 429–440. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.429>
- Pierce, G. F., Vande Berg, J., Rudolph, R., Tarpley, J., & Mustoe, T. A. (1991). Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *American Journal of Pathology*, 138(3), 629–646.
- Pierce, Glenn F., Mustoe, T. A., Altrock, B. W., Deuel, T. F., & Thomason, A. (1991). Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45(4), 319–326.

- <https://doi.org/10.1002/jcb.240450403>
- Pierce, J. H., Di Marco, E., Cox, G. W., Lombardi, D., Ruggiero, M., Varesio, L., Wang, L. M., Choudhury, G. G., Sakaguchi, A. Y., Di Fiore, P. P., & Aaronson, S. A. (1990). Macrophage-colony-stimulating factor (CSF-1) induces proliferation, chemotaxis, and reversible monocytic differentiation in myeloid progenitor cells transfected with the human c-fms/CSF-1 receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(15), 5613–5617. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5613>
- Platt, A. M., Bain, C. C., Bordon, Y., Sester, D. P., & Mowat, A. M. (2010). An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. *The Journal of Immunology*, *184*(12), 6843–6854. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903987>
- Platt, A. M., & Mowat, A. M. I. (2008). Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunology Letters*, *119*(1–2), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.05.009>
- Platt, N., Haworth, R., da Silva, R. P., & Gordon, S. (1999). Scavenger receptors and phagocytosis of bacteria and apoptotic cells. *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*, *5*(C), 71–85. [https://doi.org/10.1016/S1874-5172\(99\)80028-5](https://doi.org/10.1016/S1874-5172(99)80028-5)
- Playford, R. J., & Ghosh, S. (2008). What is the role of growth factors in IBD? *Inflammatory Bowel Diseases*, *14 Suppl 2*, 119–120. <https://doi.org/10.1097/00054725-200810001-00058>
- Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., McGuckin, M. A., & Florin, T. H. J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *American Journal of Gastroenterology*, *105*(11), 2420–2428. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>
- Poller, W. C., Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2020). Hematopoiesis and cardiovascular disease. *Circulation Research*, *126*(8), 1061–1085. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315895>
- Pons, V., & Rivest, S. (2020). Beneficial Roles of Microglia and Growth Factors in MS, a Brief Review. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*(September), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00284>
- Pontén, F., Ren, Z., Nistér, M., Westermarck, B., & Pontén, J. (1994). Epithelial-stromal interactions in basal cell cancer: the PDGF system. *Journal of Investigative Dermatology*, *102*(3), 304–309. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371787>
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Barcomb Caddle, L., & Coffman, R. L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*, *1*(7), 553–562. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90045-0)
- PRESTRELSKI, S. J., ARAKAWA, T., DUKER, K., KENNEY, W. C., & NARHI, L. O. (1994). The conformational stability of a non-covalent dimer of a platelet-derived growth factor-B mutant lacking the two cysteines involved in interchain disulfide bonds. *International Journal of Peptide and Protein Research*, *44*(4), 357–363. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1994.tb01020.x>
- Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M. K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C. R., & Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *159*(5), 2222–2231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278310>
- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., & Stappenbeck, T. S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(1), 99–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405979102>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Qiu, F. H., Ray, P., Brown, K., Barker, P. E., Jhanwar, S., Ruddle, F. H., & Besmer, P. (1988). Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *The EMBO Journal*, *7*(4), 1003–1011. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02907.x>
- Qiu, P., Ishimoto, T., Fu, L., Zhang, J., Zhang, Z., & Liu, Y. (2022). The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.733992>
- Qiu, Y., Ma, X., Yang, X., Wang, L., & Jiang, Z. (2017). Effect of sodium butyrate on cell proliferation and cell cycle in porcine intestinal epithelial (IPEC-J2) cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, *53*(4), 304–311. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0119-9>
- Quatrini, L., & Ugolini, S. (2021). New insights into the cell- and tissue-specificity of glucocorticoid actions. *Cellular and Molecular Immunology*, *18*(2), 269–278. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00526-2>

- Rajilić-Stojanović, M., Shanahan, F., Guarner, F., & De Vos, W. M. (2013). Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflammatory Bowel Diseases*, *19*(3), 481–488. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31827fec6d>
- Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019). Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(1), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.09.013>
- Rechkemmer, G., & von Engelhardt, W. (1988). Concentration- and pH-dependence of short-chain fatty acid absorption in the proximal and distal colon of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, *91*(4), 659–663. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)90944-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)90944-9)
- Reed, K. K., & Wickham, R. (2009). Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Seminars in Oncology Nursing*, *25*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2008.10.002>
- Reese, T. A., Liang, H., Tager, A. M., Luster, A. D., Van, N., Voehringer, D., & Locksley, R. M. (2007). Associated with Allergy. *Nature*, *447*(7140), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature05746>. Chitin
- Reyhani, V., Tsioumpekou, M., Van Wieringen, T., Rask, L., Lennartsson, J., & Rubin, K. (2017). PDGF-BB enhances collagen gel contraction through a PI3K-PLC γ -PKC-cofilin pathway. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08411-1>
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, *47*(2), 241–259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funai, K., & Heldin, C. H. (1992). Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors*, *7*(4), 261–266. <https://doi.org/10.3109/08977199209046408>
- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., & Kelsall, B. L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(1), 139–155. <https://doi.org/10.1084/jem.20101387>
- Roediger, W. E. W. (1980). The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease. *The Lancet*, 712–715.
- Rönstrand, L., Arvidsson, A. K., Kallin, A., Rorsman, C., Hellman, U., Engström, U., Wernstedt, C., & Heldin, C. H. (1999). SHP-2 binds to Tyr763 and Tyr1009 in the PDGF β -receptor and mediates PDGF-induced activation of the Ras/MAP kinase pathway and chemotaxis. *Oncogene*, *18*(25), 3696–3702. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202705>
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., & Harker, L. (1974). A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(4), 1207–1210. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1207>
- Ross, Russell, Raines, E. W., & Bowen-pope, D. F. (1986). *The Biology of Platelet-Derived Growth Factor*. *46*, 155–169.
- Ross, Russell, & Vogel, A. (1978). *The Platelet-Derived Growth Factor Review*. *14*(June), 203–210.
- Ruder, B., Atreya, R., & Becker, C. (2019). Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081887>
- Sallusto, B. F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(August), 389–400.
- Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkilä, P., Jääskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., Von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K., & Joensuu, H. (1998). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *American Journal of Pathology*, *153*(1), 103–108. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65550-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65550-2)
- Salyers, A. A., West, S. E. H., Vercellotti, J. R., & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, *34*(5), 529–533. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.529-533.1977>
- Sartor, R. B., & Wu, G. D. (2017). Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*, *152*(2), 327–339.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.012>
- Sasahara, M., Fries, J. W. U., Raines, E. W., Gown, A. M., Westrum, L. E., Frosch, M. P., Bonthron, D. T., Ross, R., & Collins, T. (1991). PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell*, *64*(1), 217–227. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90223-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90223-L)
- Sauer, C. G., & Kugathasan, S. (2010). Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Highlighting Pediatric Differences in IBD. *Medical Clinics of North America*, *94*(1), 35–52. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2009.10.002>

- Savage, D. W. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews Microbiology*, 31, 107–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20793-0>
- Schlessinger, J. (2014). Receptor tyrosine kinases: Legacy of the first two decades. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(3), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008912>
- Schneeberger, M., Everard, A., Gómez-Valadés, A. G., Matamoros, S., Ramírez, S., Delzenne, N. M., Gomis, R., Claret, M., & Cani, P. D. (2015). Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*, 5(October), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep16643>
- Schonherr, E., Jarvelainen, H. T., Sandell, L. J., & Wight, T. N. (1991). Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17640–17647. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)47419-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)47419-x)
- Schreiber, S. (1997). Interleukin-10 in the intestine. *Gut*, 41(2), 274–275. <https://doi.org/10.1136/gut.41.2.274>
- Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00455>
- Schulthess, J., Pandey, S., Capitani, M., Rue-Albrecht, K. C., Arnold, I., Franchini, F., Chomka, A., Ilott, N. E., Johnston, D. G. W., Pires, E., McCullagh, J., Sansom, S. N., Arancibia-Cárcamo, C. V., Uhlig, H. H., & Powrie, F. (2019). The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity*, 50(2), 432–445.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.018>
- Segain, J. P., Galniche, J. P., Raingeard De La Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., & Blottière, H. M. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NF κ B inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut*, 47(3), 397–403. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>
- Sehgal, A., Donaldson, D. S., Pridans, C., Sauter, K. A., Hume, D. A., & Mabbott, N. A. (2018). The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche. *Nature Communications*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03638-6>
- Seifert, R. A., Hart, C. E., Phillips, P. E., Forstrom, J. W., Ross, R., Murray, M. J., & Bowen-Pope, D. F. (1989). Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8771–8778. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)81860-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)81860-9)
- Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N. A., Mitchell, J., Baxter, N. T., Zhao, L., Schloss, P. D., Martens, E. C., Eaton, K. A., & Chen, G. Y. (2017). Erratum: NLRP6 Protects Il10 $^{-/-}$ Mice from Colitis by Limiting Colonization of Akkermansia muciniphila (Cell Reports (2017) 19(4) (733–745) (S2211124717304576) (10.1016/j.celrep.2017.03.080)). *Cell Reports*, 19(10), 2174. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.074>
- Sharma, D., & Kanneganti, T. D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*, 213(6), 617–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>
- Sheikh, H., Yarwood, H., Ashworth, A., & Isacke, C. M. (2000). Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *Journal of Cell Science*, 113(6), 1021–1032. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.6.1021>
- Shi, J., Hua, L., Harmer, D., Li, P., & Ren, G. (2018a). Cre driver mice targeting macrophages. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1784, pp. 263–275). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_24
- Shi, J., Hua, L., Harmer, D., Li, P., & Ren, G. (2018b). Cre driver mice targeting macrophages. *Methods in Molecular Biology*, 1784(1), 263–275. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_24
- Shimokado, K., Raines, E. W., Madtes, D. K., Barrett, T. B., Benditt, E. P., & Ross, R. (1985). A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*, 43(1), 277–286. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90033-9)
- Shortman, K., & Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, 2(3), 151–161. <https://doi.org/10.1038/nri746>
- Shulman, T., Sauer, F. G., Jackman, R. M., Chang, C. N., & Landolfi, N. F. (1997). An antibody reactive with domain 4 of the platelet-derived growth factor β receptor allows BB binding while inhibiting proliferation by impairing receptor dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17400–17404. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17400>
- Sichien, D., Lambrecht, B. N., Williams, M., & Scott, C. L. (2017). Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal*

- Immunology*, 10(4), 831–844. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.8>
- Silva, M. T. (2010). When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(1), 93–106. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809549>
- Silva, M. T., & Correia-Neves, M. (2012). Neutrophils and macrophages: The main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers in Immunology*, 3(JUL), 2008–2013. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00174>
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., & Ganapathy, V. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, 40(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
- Smith, P. D., Smythies, L. E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., & Wahl, S. M. (2011). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunology*, 4(1), 31–42. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.66>
- Smythies, L. E., Sellers, M., Clements, R. H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W. H., Orenstein, J. M., & Smith, P. D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 66–75. <https://doi.org/10.1172/JCI200519229>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Sommer, K., Wiendl, M., Müller, T. M., Heidebreder, K., Voskens, C., Neurath, M. F., & Zundler, S. (2021). Intestinal Mucosal Wound Healing and Barrier Integrity in IBD–Crosstalk and Trafficking of Cellular Players. *Frontiers in Medicine*, 8(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.643973>
- Soriano, P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β - receptor mutant mice. *Genes and Development*, 8(16), 1888–1896. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1888>
- Soriano, Philippe. (1997). The PDGF α receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development*, 124(14), 2691–2700. <https://doi.org/10.1242/dev.124.14.2691>
- Specia, S., Giusti, I., Rieder, F., & Latella, G. (2012). Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(28), 3635–3661. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i28.3635>
- Stange, E. F., Travis, S. P. L., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinskis, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B. F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S. W., Schölmerich, J., & Reinisch, W. (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Gut*, 55(SUPPL. 1), 1–15. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.081950a>
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine*, 176(1), 287–292. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287>
- Sun, Z., Wang, X., & Anersson, R. (1998). Role of Intestinal Permeability in Monitoring Mucosal Barrier Function. *Digestive Surgery*, 15, 386–397.
- Sundberg, C., Ljungström, M., Lindmark, G., Gerdin, B., & Rubin, K. (1993). Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor- β receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *American Journal of Pathology*, 143(5), 1377–1388.
- Takeyama, K., Dabbagh, K., Lee, H. M., Agustí, C., Lausier, J. A., Ueki, I. F., Grattan, K. M., & Nadel, J. A. (1999). Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 3081–3086. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3081>
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 121). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(20), 2826–2832. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i20.2826>
- Tennant, M., & McGeachie, J. K. (1991). Platelet-Derived Growth Factor and Its Role in Atherogenesis: a Brief Review. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 61(7), 482–488.

- <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1991.tb00273.x>
- Theiss, A., Fruchtmann, S., & Lund, P. (2004). Growth factors in inflammatory bowel disease: the actions and interactions of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Inflammatory Bowel Diseases*, *10*(6), 871–880. <https://doi.org/10.1097/00054725-200411000-00021>
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, *23*, 307–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843>
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, *81*(3), 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, *489*(7415), 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Tur, J., Farreras, C., Sánchez-Tilló, E., Vico, T., Guerrero-Gonzalez, P., Fernandez-Elorduy, A., Lloberas, J., & Celada, A. (2021). Induction of CIITA by IFN- γ in macrophages involves STAT1 activation by JAK and JNK. *Immunobiology*, *226*(5), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152114>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, *11*(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Vagnerová, K., Vodička, M., Hermanová, P., Ergang, P., Šrůtková, D., Klusoňová, P., Balounová, K., Hudcovic, T., & Pácha, J. (2019). Interactions Between Gut Microbiota and Acute Restraint Stress in Peripheral Structures of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and the Intestine of Male Mice. *Frontiers in Immunology*, *10*(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02655>
- van der Hee, B., & Wells, J. M. (2021). Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*, *29*(8), 700–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.001>
- Van Limbergen, J., Russell, R. K., Drummond, H. E., Aldhous, M. C., Round, N. K., Nimmo, E. R., Smith, L., Gillett, P. M., McGrogan, P., Weaver, L. T., Bisset, W. M., Mahdi, G., Arnott, I. D., Satsangi, J., & Wilson, D. C. (2008). Definition of Phenotypic Characteristics of Childhood-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, *135*(4), 1114–1122. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.081>
- Varol, C., Zigmund, E., & Jung, S. (2010). Securing the immune tightrope: Mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nature Reviews Immunology*, *10*(6), 415–426. <https://doi.org/10.1038/nri2778>
- Venegas, D. P., De La Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Vernier-Massouille, G., Balde, M., Salleron, J., Turck, D., Dupas, J. L., Mouterde, O., Merle, V., Salomez, J. L., Branche, J., Marti, R., Lerebours, É., Cortot, A., Gower-Rousseau, C., & Colombel, J. F. (2008). Natural History of Pediatric Crohn's Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology*, *135*(4), 1106–1113. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.079>
- Vernocchi, P., Chierico, F. Del, & Putignani, L. (2020). Gut microbiota metabolism and interaction with food components. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103688>
- Vighi, G., Marcucci, F., Sensi, L., Di Cara, G., & Frati, F. (2008). Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and Experimental Immunology*, *153*(SUPPL. 1), 3–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03713.x>
- Vignais, M. L., Sadowski, H. B., Watling, D., Rogers, N. C., & Gilman, M. (1996). Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(4), 1759–1769. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.4.1759>
- Villadangos, J. A., & Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity*, *29*(3), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.002>
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., & Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, *3*(10), 858–876. <https://doi.org/10.3390/nu3100858>
- Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Frontiers in Immunology*, *10*(JULY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>
- Walford, H. H., & Doherty, T. A. (2013). STAT6 and lung inflammation. *Jak-Stat*, *2*(4), e25301. <https://doi.org/10.4161/jkst.25301>
- Wallez, Y., & Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis,

- inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 794–809. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.003>
- Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 344(14), 1058–1066. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A. M., Chen, P., & Schnabl, B. (2015). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *Journal of Immunological Methods*, 421, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015>
- Wang, M., Ahrné, S., Jeppsson, B., & Molin, G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.03.012>
- Wang, S., Ye, Q., Zeng, X., & Qiao, S. (2019). Functions of macrophages in the maintenance of intestinal homeostasis. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1512969>
- Wang, X., Heazlewood, S. P., Krause, D. O., & Florin, T. H. J. (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 508–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02005.x>
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K. R., Bevins, C. L., & Stange, E. F. (2005). Mechanisms of disease: Defensins in gastrointestinal diseases. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 2(9), 406–415. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0265>
- Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols*, 2(10), 2307–2311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.315>
- Weiner, H. L. (2000). Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*, 106(8), 935–937. <https://doi.org/10.1172/JCI11348>
- Weller, A., Sorokin, L., Illgen, E. M., & Ekblom, P. (1991). Development and growth of mouse embryonic kidney in organ culture and modulation of development by soluble growth factor. *Developmental Biology*, 144(2), 248–261. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90419-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90419-4)
- Westermarck, B., & Institutet, K. (1992). Proprotein Processing. *Cell*, 118(3), 509–519.
- Wiles, S., Pickard, K. M., Peng, K., MacDonald, T. T., & Frankel, G. (2006). In vivo bioluminescence imaging of the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infection and Immunity*, 74(9), 5391–5396. <https://doi.org/10.1128/IAI.00848-06>
- Wolf, A. A., Yáñez, A., Barman, P. K., & Goodridge, H. S. (2019). The ontogeny of monocyte subsets. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01642>
- Worsøe, J., Fynne, L., Gregersen, T., Schlageter, V., Christensen, L. A., Dahlerup, J. F., Rijkhoff, N. J. M., Laurberg, S., & Krogh, K. (2011). Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system. *BMC Gastroenterology*, 11(1), 145. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-145>
- Wright, P. B., McDonald, E., Bravo-Blas, A., Baer, H. M., Heawood, A., Bain, C. C., Mowat, A. M., Clay, S. L., Robertson, E. V., Morton, F., Nijjar, J. S., Ijaz, U. Z., Milling, S. W. F., & Gaya, D. R. (2021). The mannose receptor (CD206) identifies a population of colonic macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98611-7>
- Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
- Xu, J., & Clark, R. A. F. (1996). Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *Journal of Cell Biology*, 132(1–2), 239–249. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.1.239>
- Yang, S., & Yu, M. (2021). Role of goblet cells in intestinal barrier and mucosal immunity. *Journal of Inflammation Research*, 14, 3171–3183. <https://doi.org/10.2147/JIR.S318327>
- Yang, Z., & Ming, X. F. (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533>
- Yarden, Y., Escobedo, J. A., Kuang, W. J., Yang-Feng, T. L., Daniel, T. O., Tremble, P. M., Chen, E. Y., Ando, M. E., Harkins, R. N., Francke, U., Fried, V. A., Ullrich, A., & Williams, L. T. (1986). Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, 323(6085), 226–232. <https://doi.org/10.1038/323226a0>
- Yawalkar, N., Karlen, S., Egli, F., Brand, C. U., Graber, H. U., Pichler, W. J., & Braathen, L. R. (2000). Down-regulation of IL-12 by topical corticosteroids in chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(5), 941–947. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.109825>
- Yeh, H. J., Ruit, K. G., Wang, Y. X., Parks, W. C., Snider, W. D., & Deuel, T. F. (1991). PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell*, 64(1), 209–216. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90222-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90222-K)

- Ying, H. Z., Chen, Q., Zhang, W. Y., Zhang, H. H., Ma, Y., Zhang, S. Z., Fang, J., & Yu, C. H. (2017). PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 7879–7889. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7641>
- Young, V. B. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: An introduction for clinicians. *BMJ (Online)*, 356. <https://doi.org/10.1136/bmj.j831>
- Yu, T., Gan, S., Zhu, Q., Dai, D., Li, N., Wang, H., Chen, X., Hou, D., Wang, Y., Pan, Q., Xu, J., Zhang, X., Liu, J., Pei, S., Peng, C., Wu, P., Romano, S., Mao, C., Huang, M., ... Xiao, Y. (2019). Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12384-2>
- Zasloff, M. (2002). *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. 415(January), 389–395.
- Zhang, F., Wang, H., Wang, X., Jiang, G., Liu, H., Zhang, G., Wang, H., Fang, R., Bu, X., Cai, S., & Du, J. (2016). TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 7(32), 52294–52306. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10561>
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>
- Zheng, L., Ishii, Y., Tokunaga, A., Hamashima, T., Shen, J., Zhao, Q. L., Ishizawa, S., Fujimori, T., Nabeshima, Y. I., Mori, H., Kondo, T., & Sasahara, M. (2010). Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved. *Journal of Neuroscience Research*, 88(6), 1273–1284. <https://doi.org/10.1002/jnr.22302>
- Zhou, Q., Zhang, Y., Wang, X., Yang, R., Zhu, X., Zhang, Y., Chen, C., Yuan, H., Yang, Z., & Sun, L. (2020). Gut bacteria *Akkermansia* is associated with reduced risk of obesity: evidence from the American Gut Project. *Nutrition and Metabolism*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00516-1>
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
- Zundler, S., Becker, E., Schulze, L. Lou, & Neurath, M. F. (2019). Immune cell trafficking and retention in inflammatory bowel disease: Mechanistic insights and therapeutic advances. *Gut*, 68(9), 1688–1700. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317977>

V. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei Dr. med. Carolin Manthey für die Betreuung meiner Promotion, die Bereitstellung dieses tollen Themas, die wunderbare Zusammenarbeit in unserer kleinen Arbeitsgruppe und letztlich das mir entgegengebrachte Vertrauen herzlich bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Johannes Herkel für die Übernahme des Erstgutachters und Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Streit für das kurzfristige Einspringen als Zweitgutachter bedanken. Weiterhin gilt Prof. Dr. med. Samuel Huber großer Dank, für die Möglichkeit, die Doktorarbeit an der I. Medizinischen Klinik am UKE anfertigen zu können als auch für die Mitbetreuung meiner Doktorarbeit.

Anschließend möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Huber, AG Hübener, AG Bosurgi und AG Gagliani für ihre Unterstützung im Labor bedanken. Hier gelten Mustafa, Sandra, Tasos, Annika, Kati und Elisabeth besonderer Dank. Zudem möchte ich mich bei der gesamten Forschungstierhaltung des UKE, insbesondere Sabrina, Daniel und Nadine, für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe bedanken.

Ebenfalls gilt Cäcilia für das Lesen & Korrigieren meiner Doktorarbeit sowie das hilfreiche Feedback großer Dank. Abschließend möchte ich mich noch herzlich bei Thomas für seine Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken.

VI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass die Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Ort, Datum

Unterschrift