

# **Der Einfluss von epitheliale HMGB1 auf Entzündungsprozesse im murinen Darm**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Elisabeth Lucia Maria Maaß (geb. Zierz)

aus Berlin

Hamburg, 2024



Diese Dissertation wurde von PD Dr. med. Peter Hübener betreut und an der I. Medizinischen Klinik in der Abteilung für molekulare Immunologie und Gastroenterologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Zeitraum von April 2020 bis April 2023 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Herkel

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hoth

Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie

Molekulare Pflanzenphysiologie

Tag der Disputation: 25.04.2025

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>II. Abbildungsverzeichnis</b> .....	7
<b>III. Tabellenverzeichnis</b> .....	8
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	9
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	11
<b>VI. Abstract</b> .....	13
<b>1. Einleitung</b> .....	15
1.1. Grundlagen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen .....	15
1.2. Aufbau und Funktion des Darms.....	16
1.3. Das mukosale Immunsystem .....	19
1.4. HMGB1: Funktion und Struktur .....	21
1.5. HMGB1: Rolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	23
1.6. Zielsetzung .....	24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	26
2.1. Materialien .....	26
2.1.1. Geräte .....	26
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.1.3. Kits .....	30
2.1.4. Software .....	30
2.1.5. Puffer und Lösungen .....	31
2.2. Methoden.....	35
2.2.1. Tierversuche .....	35
2.2.2. Mauslinien .....	35
2.2.3. Tamoxifen-Injektion .....	36
2.2.4. Natrium-Dextransulfat (DSS) induzierte Colitis .....	37
2.2.5. Organentnahme .....	37
2.2.6. Isolation von Immunzellen aus dem Kolon .....	38
2.2.7. Epithelzell-Isolation aus dem Kolon .....	38
2.2.8. FACS-Analyse .....	39
2.2.9. RNA-Isolation .....	41
2.2.10. cDNA-Synthese.....	41
2.2.11. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	42
2.2.12. RNA-Sequenzierung .....	43

2.2.13.	Proteinisolation.....	44
2.2.14.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	44
2.2.15.	Semi-Dry Blot.....	45
2.2.16.	Histologie .....	46
2.2.17.	Immunhistochemie .....	47
2.2.17.1.	Alcianblau-Hämatoxylin-Färbung.....	47
2.2.17.2.	Ki67-Färbung.....	47
2.2.17.3.	BrdU-Färbung .....	47
2.2.18.	Mikroskopie .....	49
2.2.19.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	49
2.2.20.	Proteome-Profiler.....	49
2.2.21.	Zellkultur .....	50
2.2.22.	CRISPR-Cas9 Knockout des <i>Hmgb1</i> -Gens in MC38-Zellen .....	50
2.2.23.	Scratch-Assay.....	51
2.2.24.	Transendothelialer Permeabilitäts-Assay .....	51
2.3.	Intestinale Organoide.....	52
2.3.1.	Isolation und Kultur intestinaler Organoide.....	52
2.3.2.	Isolation intestinaler Krypten .....	52
2.3.3.	Primäre Organoid-Kultur isolierter intestinaler Krypten .....	53
2.3.4.	Passagieren intestinaler Organoide .....	53
2.3.5.	Kryokonservierung intestinaler Organoide .....	54
2.3.6.	DSS-Behandlung intestinaler Organoide im <i>in vitro</i> CED-Modell.....	54
2.4.	Statistische Auswertung.....	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
3.1.	Vorarbeiten.....	56
3.2.	Der Einfluss des epithelialen HMGB1-Knockouts in der murinen DSS-induzierten Colitis 56	59
3.3.	Der Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Proliferation von Epithelzellen ...	59
3.4.	Der Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Apoptose, Proliferation und Autophagie 61	61
3.5.	Etablierung einer intestinalen Organoid-Zellkultur mit effektiver HMGB1-Deletion aus <i>Hmgb1</i> <sup>ΔIEC</sup> .....	64
3.6.	Die HMGB1-Defizienz intestinaler Organoide aus <i>Hmgb1</i> <sup>ΔIEC</sup> beeinflusst weder das Wachstumsverhalten noch die Stammzellsignatur .....	66
3.7.	Etablierung einer intestinalen Organoid-Zellkultur nach Tamoxifen-induzierter HMGB1- Deletion in <i>Hmgb1</i> <sup>fl/fl</sup> UBC cre+ .....	69
3.8.	Charakterisierung von <i>Hmgb1</i> <sup>+/+</sup> UBC cre+ Organoiden .....	71

3.9. Der Einfluss der HMGB1-Deletion intestinaler Organoide auf die DSS-induzierte systemische Entzündungsreaktion .....	73
3.10. Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Permeabilität der intestinalen Barriere. 74	
3.11. Der Einfluss von intrazellulärem HMGB1 auf die <i>in vitro</i> Wundheilung .....	78
3.12. Epitheliales HMGB1 beeinflusst das extrazelluläre Matrix-Remodelling.....	81
3.13. Extrazelluläres HMGB1 besitzt eine Signaling-Funktion im Kontext der Colitis .....	86
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>88</b>
4.1. Einordnung zu den Vorarbeiten .....	88
4.2. Die epitheliale HMGB1-Deletion hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der Epithelzellen.....	89
4.3. Intrazelluläres HMGB1 hat keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion von intestinalen Organoiden.....	90
4.4. Die epitheliale HMGB1-Deletion hat keinen Einfluss auf die Colitis assoziierte Barriere-Dysfunktion .....	92
4.5. Epitheliales HMGB1 beeinflusst den Umbau der extrazellulären Matrix bei Entzündungsprozessen .....	94
4.6. Extrazelluläres HMGB1 besitzt eine Signaling Funktion auf Epithelzellen und myeloide Zellen .....	96
4.7. Ausblick .....	97
<b>A. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>B. Publikationsliste .....</b>	<b>114</b>
<b>C. Danksagung.....</b>	<b>115</b>
<b>D. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>116</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intestinale Epithelzellen fungieren als Regulatoren der Barriere zwischen dem mikrobiell besiedelten Darmlumen und dem mukosalen Immunsystem. ....	18
Abbildung 2: Intra- und extrazelluläre Funktionen von HMGB1 .....	22
Abbildung 3: Die funktionelle Aktivität von HMGB1 wird durch den Redoxstatus bestimmt. ....	23
Abbildung 4: Ablauf der murinen Tamoxifen Injektion und Induktion. ....	36
Abbildung 5: Versuchsablauf der murinen DSS-Colitis. ....	37
Abbildung 6: FACS-Gating-Strategie aus FlowJo zur Analyse und zum Sorting der dargestellten Immunzell-Fraktionen.....	40
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung des in vitro CED-Modells an intestinalen Organoiden. ....	55
Abbildung 8: Der Einfluss des epithelialen HMGB1-Knockouts in der murinen DSS-induzierten Colitis. ....	58
Abbildung 9: Gewebestruktur der Mukosa nach induzierter DSS-Colitis bei Hmgb1 <sup>ff</sup> und Hmgb1 <sup>ΔIEC</sup> Mäusen.....	59
Abbildung 10: Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Ki-67- und BrdU-positive Zellen intestinaler Krypten. ....	60
Abbildung 11: Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Marker-Proteine der Apoptose, Proliferation und Autophagie.....	63
Abbildung 12: Etablierung einer intestinalen 3D-Organoid Zellkultur aus Hmgb1 <sup>ff</sup> und Hmgb1 <sup>ΔIEC</sup> Mäusen.....	65
Abbildung 13: Charakterisierung von intestinalen Organoiden aus Hmgb1 <sup>ff</sup> und Hmgb1 <sup>ΔIEC</sup> . ....	68
Abbildung 14: Etablierung einer intestinalen 3D-Organoid-Zellkultur aus Hmgb1 <sup>+/+</sup> UBC cre+ und Hmgb1 <sup>ff</sup> UBC cre+ Mäusen. ....	70
Abbildung 15: Charakterisierung von intestinalen Organoiden aus Hmgb1 <sup>+/+</sup> UBC cre+ und Hmgb1 <sup>ff</sup> UBC cre+ Mäusen. ....	72
Abbildung 16: Einfluss der HMGB1-Deletion intestinaler Organoiden auf die DSS-induzierte systemische Entzündungsreaktion.....	74
Abbildung 17: Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Permeabilität der intestinalen Barriere im Mausmodell und in Organoiden. ....	77
Abbildung 18: Permeabilität von HMGB1 +/+ und MC38 HMGB1 -/- Zellen für FITC Dextran (FD4). ....	78
Abbildung 19: Der Einfluss von intrazellulärem HMGB1 auf die Wundheilung in vitro. ....	80
Abbildung 20: Effekt der epithelialen HMGB1-Deletion in Epithelzellen auf die Genexpression der frühen Phase in der murinen DSS-induzierten Colitis. ....	82
Abbildung 21: Effekt der epithelialen HMGB1-Deletion in Epithelzellen auf die Genexpression im Normalzustand. ....	83
Abbildung 22: Effekt der myeloiden HMGB1-Deletion auf die Genexpression der frühen Phase in der murinen DSS-induzierten Colitis. ....	84
Abbildung 23: Auswirkung der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Kollagenakkumulation und Genexpression pro-fibrogener Schlüssel-Gene.....	85
Abbildung 24: Einfluss von extrazellulärem HMGB1 auf Kinase Phosphorylierungen von Downstream-Targets.....	87

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte .....	26
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien.....	27
Tabelle 3: Liste kommerzieller Kits.....	30
Tabelle 4: Software .....	30
Tabelle 5: DTT Puffer .....	31
Tabelle 6: Collagenase Puffer .....	31
Tabelle 7: RIPA Puffer .....	31
Tabelle 8: RNase Puffer.....	32
Tabelle 9: MACS Puffer.....	32
Tabelle 10: Lämmli Puffer.....	32
Tabelle 11: 6% Sammelgel Stock (SDS-Page).....	32
Tabelle 12: 12% Trenngel Stock (SDS-Page).....	33
Tabelle 13: 10x Laufpuffer (Westernblot) .....	33
Tabelle 14: 10x Blotpuffer (Westernblot) .....	33
Tabelle 15: 1x Blotpuffer .....	33
Tabelle 16: Tris-buffered saline (TBS) Puffer .....	34
Tabelle 17: 1x TBST Puffer .....	34
Tabelle 18: Citratpuffer .....	34
Tabelle 19: Chelation Stock Puffer für die Organoid-Kultur.....	34
Tabelle 20: Krypten Isolations Puffer für die Organoid-Kultur .....	35
Tabelle 21: Standard Zellkultur Medium.....	35
Tabelle 22: FACS-Antikörper Panel .....	39
Tabelle 23: Reaktionsansatz der reversen Transkription.....	41
Tabelle 24: cDNA-Transkriptionsprogramm des Thermo-Cyclers .....	42
Tabelle 25: Liste der verwendete TaqMan™ Sonden für die qPCR.....	42
Tabelle 26: qPCR-Programm des Viiia™ 7 Systems .....	43
Tabelle 27: Westernblot Primär- und Sekundärantikörper .....	45
Tabelle 28: Entwässerungsprotokoll der Pathologie.....	46
Tabelle 29: Protokoll zur Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydratation von Paraffinschnitten.....	47
Tabelle 30: verwendete Primärantikörper der Immunhistochemie.....	48
Tabelle 31: verwendete Sekundär- und Tertiärantikörper der Immunhistochemie .....	48
Tabelle 32: Sequenzen der Guide-RNA (gRNA) zum CRISPR-Cas9-Knockout von Hmgb1 .....	51
Tabelle 33: Matrigel- und Intesticult Volumen der Organoid Kultur .....	54

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid DNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmkrankungen
Ctrl	<i>Control</i>
CU	Colitis Ulcerosa
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAO	Diaminoxidase
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	<i>dextran sulfate sodium salt</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated activated Cell cell Sortingsorting</i>
FAM	Fluorescein amidite
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FD4	Fluorescein Isothiocyanat
FDR	<i>False discovery rate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gravitationsbeschleunigung
GO	<i>Gene ontology</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	<i>High-mobility group box protein 1</i>
i.p.	intraperitoneal
IBD	Inflammatory Bowel Disease

IFABP	<i>Intestinal-fatty acid binding protein</i>
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MC	Morbus Crohn
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NDR	NOD-like-receptor
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sac.	<i>sacrificed</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TGF- $\beta$	<i>Ttransforming growth factor beta</i>
TLR	Toll-like-receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
UBC	<i>human ubiquitin C Promotor</i>
Wt	Wildtyp

## V. Zusammenfassung

Das Darmepithel spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktion und Integrität des Darms. Es dient als physische Barriere zwischen dem Inhalt des Lumens und dem darunter liegenden Gewebe. Gleichzeitig ist es an der Nährstoffaufnahme und der Immunantwort beteiligt. Zelleigene Alarmine, die auch als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet werden, und pathogen assoziierte Struktur motive, *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), treffen hier aufeinander. Eine effiziente Wundheilung und die Induktion von Entzündungsreaktionen bei Störungen der Homöostase oder Gewebsschädigungen der Darmbarriere sind für den Organismus lebensnotwendig. Ein Schlüsselmolekül, das an der Entzündungsreaktion während einer Schädigung oder Entzündung des Darmepithels beteiligt ist, ist *High-mobility group box 1* (HMGB1). In den letzten Jahren wurde dieses Protein zunehmend als wichtiger Faktor in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sowie Darmkrebs beschrieben. HMGB1 wird sowohl während entzündlicher Darmerkrankungen als auch in Darmkrebsgewebe überexprimiert. Zudem korreliert die HMGB1-Konzentration in Serum und Stuhl von CED-Patienten mit einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung.

In Vorarbeiten zu diesem Projekt konnte bereits gezeigt werden, dass eine genetische HMGB1-Defizienz in Darmepithelzellen den Krankheitsverlauf bei der chemisch induzierten DSS-Colitis der Maus signifikant verschlechtert, während diese keine Auswirkungen im Rahmen der bakteriellen *C.rodentium* oder chronischen T-Zell-induzierten Kolitis hat. Im Modell der spontanen Karzinogenese führte die epitheliale HMGB1-Deletion jedoch zu einer verstärkten Tumorbildung. In dieser Arbeit wurde primär die kontextabhängige Funktion von epitheliale HMGB1 im DSS-geschädigten Darm untersucht, um die Reaktionen des Wirtes auf Darmverletzungen besser zu charakterisieren und potenziell eine Grundlage für weitere Therapieansätze zu schaffen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine genetische epitheliale HMGB1-Defizienz keinen Einfluss auf die Funktionalität sowie die Proliferation und Migrationskapazität des Epithels in der frühen Phase der DSS-Colitis hat. Dies konnte durch BrdU- und Ki-67-Färbungen sowie durch *Scratch-Assays* verdeutlicht werden. Eine DSS-induzierte Entzündung an Organoiden *in vitro* führte zu einer vergleichbaren Induktion von Genen, die an der Entzündung beteiligt sind, sowie einem unveränderten Wachstumsverhalten. Dies weist auf eine unveränderte zelluläre Grundfunktionalität und Reaktionsfähigkeit in Abwesenheit von intrazellulärem HMGB1 hin. Die Integrität der Darmbarriere wird durch eine epitheliale HMGB1-Defizienz nicht beeinträchtigt. Dies konnte durch einen vergleichbaren Anstieg der Permeabilitätsmarker IFABP, DAO und

Zonulin im Serum nach 7 Tagen DSS-Behandlung gezeigt werden. Weiterhin war das Genexpressionsniveau von *tight junctions* zwischen *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* und *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* vergleichbar, was auf vergleichbare Barriereeigenschaften bei Abwesenheit von epithelialelem HMGB1 hindeutet. Die Analyse der epithelialen Sequenzierungsdaten zeigte eine stark abweichende Programmierung der Epithelzellen und in einem geringeren Maße eine transkriptionelle Veränderung der myeloiden Immunzellen in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* in der frühen Phase der DSS-Colitis. Die Reprogrammierung der Epithelzellen ist durch Veränderungen von Signalwegen charakterisiert, die mit dem Umbau der extrazellulären Matrix und ihrer Organisation assoziiert sind, was sich in einer veränderten Wundheilung oder einer veränderten Zell-Zell-Verbindung bei der Heilung der Läsionen ausdrücken könnte. Die veränderte Signalgebung an Epithelzellen und myeloiden Zellen steht vermutlich in Zusammenhang mit der Signalwirkung durch weitere PAMPs wie Lipopolysaccharid (LPS) und anderen Pathogenen im Rahmen der Colitis.

## VI. Abstract

The intestinal epithelium plays a crucial role in maintaining the function and integrity of the gut. It serves as a physical barrier between luminal contents and underlying tissues. Simultaneously, it is involved in nutrient absorption and immune responses. This is also the location where endogenous alarmins, damage-associated molecular patterns (DAMPs), and exogenous structural motifs, pathogen-associated molecular patterns (PAMPS), converge. Efficient wound healing and induction of inflammatory reactions in response to disrupted homeostasis or tissue damage to the intestinal barrier are essential for the organism. A key molecule involved in the inflammatory response during damage or inflammation of the intestinal epithelium is High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1). In recent years, the protein has been identified as an important factor in the pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases (IBDs) and colorectal cancer. HMGB1 is overexpressed in inflammatory bowel diseases as well as in various bowel tumours. In addition, HMGB1 levels in serum and faeces of IBD patients are correlated with the severity of the disease.

Preliminary work on this project has already shown that genetic HMGB1 deficiency in intestinal epithelial cells significantly worsens the course of disease in chemically induced DSS colitis in mice, whereas it has no effect in bacterial *C. rodentium* or chronic T-cell-induced colitis. However, in the model of spontaneous carcinogenesis, epithelial HMGB1 deletion led to increased tumor formation. This work primarily investigated the context-dependent function of epithelial HMGB1 in the DSS-injured intestine to better characterize host responses to intestinal injury and potentially provide a basis for further therapeutic approaches.

In summary, this study showed that genetic epithelial HMGB1 deficiency has no effect on the functionality, proliferation, and migratory capacity of the epithelium in the early phase of DSS-colitis. This was demonstrated by BrdU- and Ki-67-stainings as well as scratch assays. DSS-induced inflammation on organoids *in vitro* resulted in comparable induction of genes involved in inflammation. Additionally, it results in unaltered growth behaviour, indicating unaltered baseline functionality and responsiveness in the absence of intracellular HMGB1. The integrity of the intestinal barrier is not impaired by epithelial HMGB1 deficiency, as demonstrated by a comparable increase of the permeability markers IFABP, DAO and zonulin in serum after 7 days of DSS-treatment. Furthermore, gene expression levels of tight junction genes was comparable between *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> and *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup>. Analysis of epithelial sequencing data revealed aberrant reprogramming of enterocytes and transcriptional changes of myeloid cells in *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> in the early phase of DSS-colitis. Enterocyte reprogramming was characterised by changes in signalling

pathways related to extracellular matrix remodelling and organisation, which could be expressed in altered wound healing or altered cell-cell junctions during lesion healing. The altered signalling to enterocytes and myeloid cells is probably associated with the signalling effect of lipopolysaccharide (LPS) and other pathogens in the context of colitis.

## 1. Einleitung

### 1.1. Grundlagen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind durch chronische Entzündungen des Gastrointestinaltraktes gekennzeichnet und umfassen zwei idiopathische gastrointestinale Erkrankungen, die als Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) bekannt sind. Eine weitere Form der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die weder CU noch MC zugeordnet werden kann, wird als Colitis indeterminata bezeichnet. Bei der CU sind die Mukosa und Submukosa des Dickdarms chronisch entzündet und weisen eine abnorme Aktivität des Immunsystems auf. Bei MC dagegen kann jeder Teil des gastrointestinalen Traktes entzündet sein. Oft sind jedoch einzelne Segmente (sog. *patchy lesions*) des Ileums oder Kolons betroffen. Im Gegensatz zur CU ist bei MC die gesamte Darmwand entzündet, was zum Auftreten von Fibrose und Fisteln führt (Kobayashi et al., 2020; Tavakoli et al., 2021). Durch die chronische Entzündung bei CEDs kommt es zu intestinalen Schädigungen, die sich in Symptomen wie Übelkeit, Durchfall, rektalen Blutungen, Erbrechen sowie Schmerzen und Empfindlichkeit im Unterleib äußern (Baumgart & Sandborn, 2007; Strober et al., 2007). Obwohl CEDs im Fokus intensiver Forschung stehen, ist die Ätiologie von CU und MC noch nicht vollständig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren und Änderungen der immunologischen Konstitution an der Entstehung von CEDs beteiligt sind. Diese Faktoren beeinträchtigen die Interaktion zwischen der Darmschleimhaut, den Bakterien des Darmlumens und Nahrungsbestandteilen, welches zu einem Zusammenbruch der geordneten Immunreaktion der Mukosa auf Darmpathogene führt. Zusammenfassend sind UC und MC somit chronische Erkrankungen mit remittierendem und rezidivierendem Charakter, die durch eine abnorme Inflammationsreaktion und gestörte Regulation der Immunantwort gekennzeichnet sind (Hibi & Ogata, 2006; Manthey et al., 2021). CED Patienten weisen zudem ein erhöhtes Risiko auf, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Colitis-assoziiertes Karzinome sind ein mit CED assoziierter Subtyp von Darmkrebs, der schwer zu behandeln ist und eine hohe Sterblichkeit von ca. 50% aufweist. Mehr als ein Fünftel der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen entwickeln innerhalb von 30 Jahren nach Ausbruch der Krankheit ein kolorektales Karzinom (Terzic et al., 2010). Die chronische Entzündung des Darmes bei CED begünstigt die Entstehung von Neoplasien, die zu dysplastischen Vorläuferläsionen führen. Diese werden als Übergangsform von gutartigem zu bösartigem Tumorgewebe angesehen (Sato et al., 2023; Shah & Itzkowitz, 2022).

Im 20. Jahrhundert waren chronisch entzündliche Darmerkrankungen hauptsächlich in den Ländern Nordamerikas, Europas und Ozeaniens verbreitet. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts

entwickelten sich CEDs zu einem global auftretenden Krankheitsbild, mit zunehmender Inzidenz in den Ländern Asiens, Südamerikas und Afrikas, in denen sich die Gesellschaften stärker verwestlichen. Die geschätzte Prävalenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen nimmt in Nordamerika, vielen europäischen Ländern sowie in Australien und Neuseeland weiter zu. In Schwellenländern ist die Prävalenz noch gering, wird aber aufgrund der steigenden Inzidenz in diesen Ländern voraussichtlich weiter zunehmen (Kaplan & Ng, 2017; Molodecky et al., 2012; Ng et al., 2017). In China haben sich CEDs in den letzten 25 Jahren von einer seltenen Erkrankung zu einem weit verbreiteten Krankheitsbild entwickelt und sind für ein Viertel der gastroenterologischen und kolorektalchirurgischen Bettenbelegung verantwortlich (Kamm, 2017; Zhao et al., 2013).

Die zunehmende globale Belastung durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen stellt die Gesundheitssysteme weltweit vor große Herausforderungen bei der Behandlung dieser komplexen und kostenintensiven Erkrankung. In den Industrieländern wird das Gesundheitssystem mit einer Zunahme von CED aufgrund der alternden Gesellschaft konfrontiert sein und entsprechende Ressourcen für die Versorgung einplanen müssen. Schwellenländer müssen sich auf einen raschen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz vorbereiten. Es wird geschätzt, dass die absolute Zahl der CED-Patienten in diesen Ländern bis 2025 der in den westlichen Ländern entsprechen wird (Kaplan, 2015; Ng et al., 2017; Zhou et al., 2018).

## 1.2. Aufbau und Funktion des Darms

Der Gastrointestinaltrakt umfasst sämtliche Organe des Verdauungstraktes von dem Mund bis hin zum Anus. Der obere Teil des Verdauungstrakts besteht aus Mund, Rachen, Ösophagus, Magen, Zwölffingerdarm, Jejunum und Ileum. Der darauffolgende Dickdarm wird weiterhin in den Blinddarm als Anhangsorgan, das Kolon und das Rektum unterteilt, welches in den Anus mündet. Histologisch besteht der Magen-Darm-Trakt aus vier konzentrischen Schichten: der Mukosa, der Submukosa, der Muscularis und der Adventitia. Bei Ösophagus und Rektum ist die Adventitia jedoch nicht ausgebildet (del Rocio Encarnacion-Garcia, 2022; G. et al., 2015) .

Der Magen-Darm-Trakt stellt eine einzigartige Herausforderung für das Immunsystem von Säugetieren dar. Das Immunsystem gewährleistet, dass die Anwesenheit der luminalen Mikrobiota toleriert wird, ohne auf deren Stoffwechselprodukte zu reagieren. Gleichzeitig schützt das Immunsystem jedoch die Darmschleimhaut vor potenziell schädlichen Antigenen aus der Nahrung und eindringenden Pathogenen (Allaire et al., 2019). Das Darmepithel ist die größte Schleimhautoberfläche des Körpers, besteht aus einer einzigen Zellschicht und trennt das

intestinale Lumen von dem darunter liegenden sterilen Gewebe. Es ist für die Aufrechterhaltung der Darmhomöostase von großer Bedeutung (Zhang et al., 2015). Das Darmepithel ist in Krypten und Zotten organisiert und wird durch pluripotente Stammzellen, die sich an der Basis der Krypten befinden, stetig erneuert. Diese Struktur wird auch als intestinale Stammzellnische bezeichnet. Hier wird die Proliferation und Differenzierung der epithelialen Vorläuferzellen reguliert (Clevers, 2013). Intestinale Epithelzellen wandern nach ihrer Differenzierung entlang der Krypten-Zotten-Achse in Richtung des Darmlumens. Dieser Prozess ermöglicht beim Menschen eine vollständige Epithelerneuerung innerhalb von 3-5 Tagen (Chang et al., 2013). Das intestinale Epithel besteht aus verschiedenen Zelltypen mit spezifischen Funktionen (vgl. Abb. 1). Die Mehrheit der Darmlumen begrenzenden Zellen sind Enterozyten, welche Wasser und Nährstoffe absorbieren und so Stoffwechsel- und Verdauungsfunktionen besitzen. Paneth-Körnerzellen, die sich vorwiegend in der Basis der Krypten des Dünndarms befinden, produzieren antimikrobielle Peptide zum Schutz benachbarter intestinaler Stammzellen (Allaire et al., 2019). Ein weiterer Zelltyp sind enteroendokrine Zellen, die in mindestens acht unterschiedlichen Subtypen klassifiziert werden. Diese produzieren je nach Art unterschiedliche Schlüsselhormone der Verdauung und Absorption wie Sekretin oder Gastrin (Gribble & Reimann, 2019). Die primäre Funktion von Goblet- oder Becherzellen ist die Synthese und Sekretion von Mucin-Glykoproteinen, welche wichtige Bestandteile des Mucus sind (Ma et al., 2018). Zusammenfassend bilden die verschiedenen Funktionen der Darmepithelzellen eine dynamische Barriere gegenüber der Umwelt, die den Wirt vor Infektionen und einer ständigen Exposition gegenüber potenziell entzündlichen Reizen schützt (Peterson & Artis, 2014; Zhang et al., 2015).

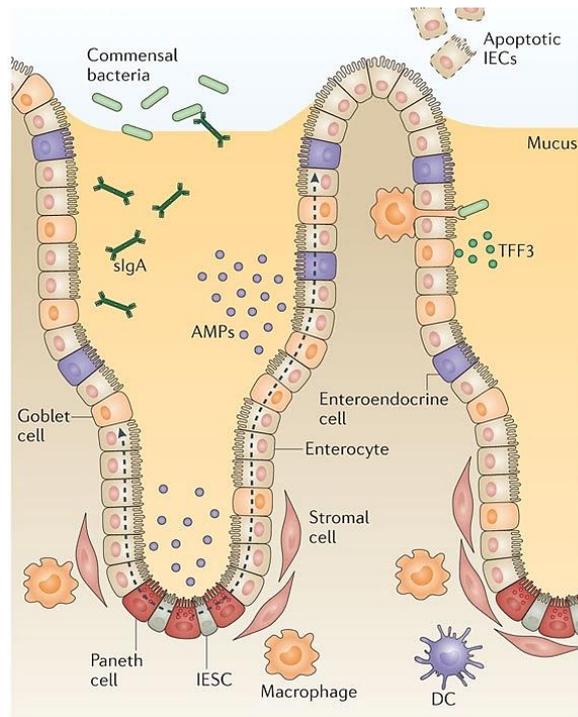


Abbildung 1: Intestinale Epithelzellen fungieren als Regulatoren der Barriere zwischen dem mikrobiell besiedelten Darmlumen und dem mukosalen Immunsystem.

Die intestinale Stammzellnische enthält Epithel-, Stroma- und hämatopoetische Zellen und kontrolliert die kontinuierliche Erneuerung der Epithelzellschicht durch in der Krypta ansässige intestinale Stammzellen (IESCs). Ausdifferenzierte Intestinale Epithelzellen (IECs) wandern entlang der der Krypten-Villus-Achse in Richtung des Darmlumens (vgl. gestrichelter Pfeil). Sekretorische Becherzellen und Paneth-Zellen sezernieren Mucus und antimikrobielle Proteine (AMPs), um die Elimination von Bakterien an der Epitheloberfläche zu bewirken. Die Transzytose und die luminalen Freisetzung von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) tragen ebenfalls zu dieser Barrierefunktion bei. Gobletzellen transportieren luminalen Antigene und lebende Bakterien über die Epithelbarriere zu dendritischen Zellen (DCs) (Peterson & Artis, 2014).

Die intestinale Barrierefunktion des Epithels ist neben der kontrollierten Proliferation und Apoptose von der adäquaten Funktion und Regulierung der *tight junctions* abhängig. *Tight junctions* koordinieren den Prozess der intestinalen Permeabilität, in dem der parazelluläre Spalt verengt oder seine Durchlässigkeit für Moleküle gezielt reguliert wird. Die zwei Proteinfamilien *tight junction-associated MARVEL protein* (TAMP) und Claudine steuern diese Barriere- und Passagefunktion. Die TAMP-Familie besteht aus Occludin, Marvel3D und Tricellulin. Die Claudine bestehen aus einer Superfamilie von 27 Proteinen, die z.T. selektive Kanäle für Kationen, Anionen oder Wasser bilden oder barrierebildende Eigenschaften besitzen (del Rocio Encarnacion-Garcia, 2022; Su et al., 2009). Durch pathophysiologische Konditionen wie intestinale Entzündungen und Infektionen oder die Interaktion von Pathogenen kann die Zusammensetzung oder Häufigkeit von *tight junctions* verändert werden (Gunzel & Fromm, 2012; Martini et al., 2017). So wird z.B. bei Patienten mit CED eine veränderte Tight Junction Expression beobachtet (Takeuchi et al., 2004).

Dies kann zum Verlust der Barriereintegrität, dem sog. *leaky gut*, als charakteristisches Merkmal von CED beitragen und eine initiale entzündliche Signalkaskade durch das Eindringen von Bakterien in die Mukosa bewirken (Chelakkot et al., 2018).

Worin genau der Beitrag von *tight junctions* zur Krankheitspathologie besteht, wird in der Forschung noch diskutiert. Es gibt allerdings Hinweise, dass Anomalien der *tight junction*-Proteine trotz einer funktionalen Immunantwort bereits zu CED führen können (Arnott et al., 2000). Einige Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Mutationen von *tight junction* assoziierten Proteinen mit der Entwicklung von CED und Zöliakie auf (van Bodegraven et al., 2006; Wapenaar et al., 2008). Die Mitwirkung von *tight junction*-Proteinen zur Pathogenese von CEDs wurde auch im Mausmodell und der murinen DSS-Colitis identifiziert (Chelakkot et al., 2017; Madsen et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  die Permeabilität von *tight junctions* erhöhen, was zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere und Entzündung der Mukosa führt (Ma et al., 2005; Su et al., 2013).

### 1.3. Das mukosale Immunsystem

Das Immunsystem des Darms kann in die angeborene und adaptive Immunabwehr unterteilt werden, die beide in der Immunantwort bei CED eine wichtige Rolle spielen. Angeborene Immunzellen wie Neutrophile, Makrophagen, Dendritische Zellen oder natürliche Killer T-Zellen bilden die erste Verteidigungslinie der Mukosa und lösen schnelle und unspezifische Reaktionen aus.

Unter den Darmepithelzellen befindet sich die Lamina propria, eine Bindegewebsschicht, in der sich verschiedene Arten von myeloiden und lymphoiden Zellen befinden und den Großteil des intestinalen Immunsystems ausmacht (Shi et al., 2017). Diese Immunzellen steuern das Immunsystem des Darms durch Zytokinproduktion oder durch Kommunikation mit Zell-Zell-Kontakten (Okumura & Takeda, 2016). Zusammen mit mesenterialen und caudalen Lymphknoten bildet sie eine Gruppe organisierter lymphatischer Gewebe, die als darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut-associated lymphatic tissue*, GALT) bezeichnet werden (Murphy et al., 2017). Peyer-Patches sind Lymphknoten, die sich direkt in der Schleimhautwand des Dünndarms befinden und ebenfalls zu den GALT gehören. Sie besitzen direkten Zugang zum Darmlumen und sind als Ausstülpungen der Oberfläche des Darms zu erkennen. Zwischen den Epithelzellen befinden sich zudem CD8<sup>+</sup> intraepitheliale T-Lymphozyten. Zusammen mit den Immunzellen der Lamina propria bilden sie die Effektorzellen des GALT und sind für die Aufrechterhaltung der Toleranz

gegenüber harmlosen Antigenen als auch für die Immunität gegen Krankheitserreger verantwortlich (Leung et al., 2011).

Seit den 1950er Jahren dominierte die *self-non-self*-Theorie von F. M. Burnet die immunologische Forschung (Burnet, 1969; Burnet & Fenner, 1949). Nach dieser These unterscheidet das angeborene Immunsystem zwischen eigenen und körperfremden Strukturen. Während endogene Strukturen nicht vom Immunsystem erkannt und toleriert werden, werden exogene Entitäten erkannt und eine Immunantwort eingeleitet. Trotz mehrerer Überarbeitungen dieser These blieben immunologische Fragen in Bezug auf die Abstoßung von transplantierten Organen, das Vorkommen von Autoimmunerkrankungen, die Toleranz eines Fetus während der Schwangerschaft oder das Dulden kommensaler Bakterien bis in die 1990er Jahre ungeklärt (Cohn, 2017; Pradeu & Cooper, 2012). Dies führte zur Entwicklung der *danger model*-Theorie von P. Matzinger (Matzinger, 1994, 2001). Demnach wird eine Immunreaktion vor allem durch das Vorhandensein einer Gefahr durch die Erkennung von Alarmsignalen initiiert, unabhängig davon, ob sie exogenen oder endogenen Ursprungs sind. Zur Erkennung dieser Alarmine besitzen dendritische Zellen und Makrophagen *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRRs) wie *toll-like*-Rezeptoren (TLRs) und *NOD-like*-Rezeptoren (NLRs) (Boyapati et al., 2016). Die Bindung von sog. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oder *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) an diese Rezeptoren führt zu einer Aktivierung mehrerer Signalwege und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, sowie der Auslösung der Komplementkaskade, Initiierung der Phagozytose oder der adaptiven Immunität durch die Präsentation von Antigenen (Lu et al., 2022) (Saez et al., 2023).

PAMPs sind hochkonservierte Strukturbestandteile von Pathogenen und können vom Immunsystem erkannt werden. Dazu zählen LPS, Flagellin, virale RNA oder Peptidoglykan (Matsuoka et al., 2007). DAMPs bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher, körpereigener Moleküle, die durch Nekrose oder durch Zellschaden freigesetzt werden. Dazu zählen intrazelluläre oder aus der extrazellulären Matrix stammende Moleküle wie HMGB1, S-100-Proteine, Hitzeschockproteine, Zellstoffwechselprodukte oder Nukleinsäuren aus geschädigtem Gewebe (Boyapati et al., 2016; Nanini et al., 2018). Unter physiologischen Bedingungen befinden sich DAMPs intrazellulär oder sind in der extrazellulären Matrix gebunden. Nach Gewebeschäden werden diese extrazellulär freigesetzt und signalisieren dem Wirt eine Gefahr, um Entzündungs- und Reparaturprozesse zu initiieren (Boyapati et al., 2016). Werden DAMPs freigesetzt, können sie von anderen Zellen über die Interaktion mit zellulären Rezeptoren, den *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), erkannt werden. Die PRR-Aktivierung führt zur Initiation intrazellulärer Signalkaskaden, zur transkriptionellen Hochregulierung inflammatorischer Gene, zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ-I Interferonen sowie zur Rekrutierung

von Entzündungszellen wie Neutrophilen (Boyapati et al., 2016; Murao et al., 2021). Während die Bedeutung von DAMPs bei akuten Entzündungen gut dokumentiert sind, ist die Rolle bei chronisch entzündlichen Krankheiten weniger verstanden. Bei CEDs liegen erhöhte Level an DAMPs wie S-100-Proteinen, Interleukin 1 $\alpha$  und HMGB1 vor, wodurch sie auch als Biomarker verwendet werden (Schoepfer et al., 2008; Tibble et al., 2000; Vitali et al., 2011).

#### 1.4. HMGB1: Funktion und Struktur

*High-mobility group box 1* (HMGB1) ist ein evolutionär stark konserviertes Protein, das je nach zellulärer Lokalisation unterschiedliche Funktionen hat und in nahezu allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Im Nukleus fungiert HMGB1 als ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression verschiedener Gene reguliert. Bei Gewebeschäden und Nekrose wird HMGB1 passiv extrazellulär freigesetzt und bewirkt als prototypisches DAMP die Rekrutierung inflammatorischer Zellen und die Mediation von Signalen zwischen dendritischen Zellen, Makrophagen und NKT-Zellen (Lotze & Tracey, 2005). HMGB1 kann auch aktiv von Immunzellen freigesetzt werden (vgl. Abb. 2). Extrazelluläres HMGB1 ist in verschiedenen Prozessen wie Entzündung, Immunität, Migration, Proliferation oder Wundheilung involviert (Kang et al., 2014). Ist HMGB1 aus Zellen freigesetzt, bindet es an Oberflächenrezeptoren. Die am besten beschriebenen HMGB1-Rezeptoren sind *receptor for advanced glycation end products* (RAGE), TLR2 und TLR4 (Bianchi, 2009; Yuan et al., 2020). Die Signalübertragung durch RAGE führt zur Aktivierung des Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Signalwegs sowie zur Signaltransduktion durch *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) und p38, welches zur Produktion der Zytokine TNF, IL-6 und IFN- $\gamma$  führt. Die Aktivierung von TLR2 und TLR4 führt zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung über das *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88) (Lotze & Tracey, 2005; Zhong et al., 2020).

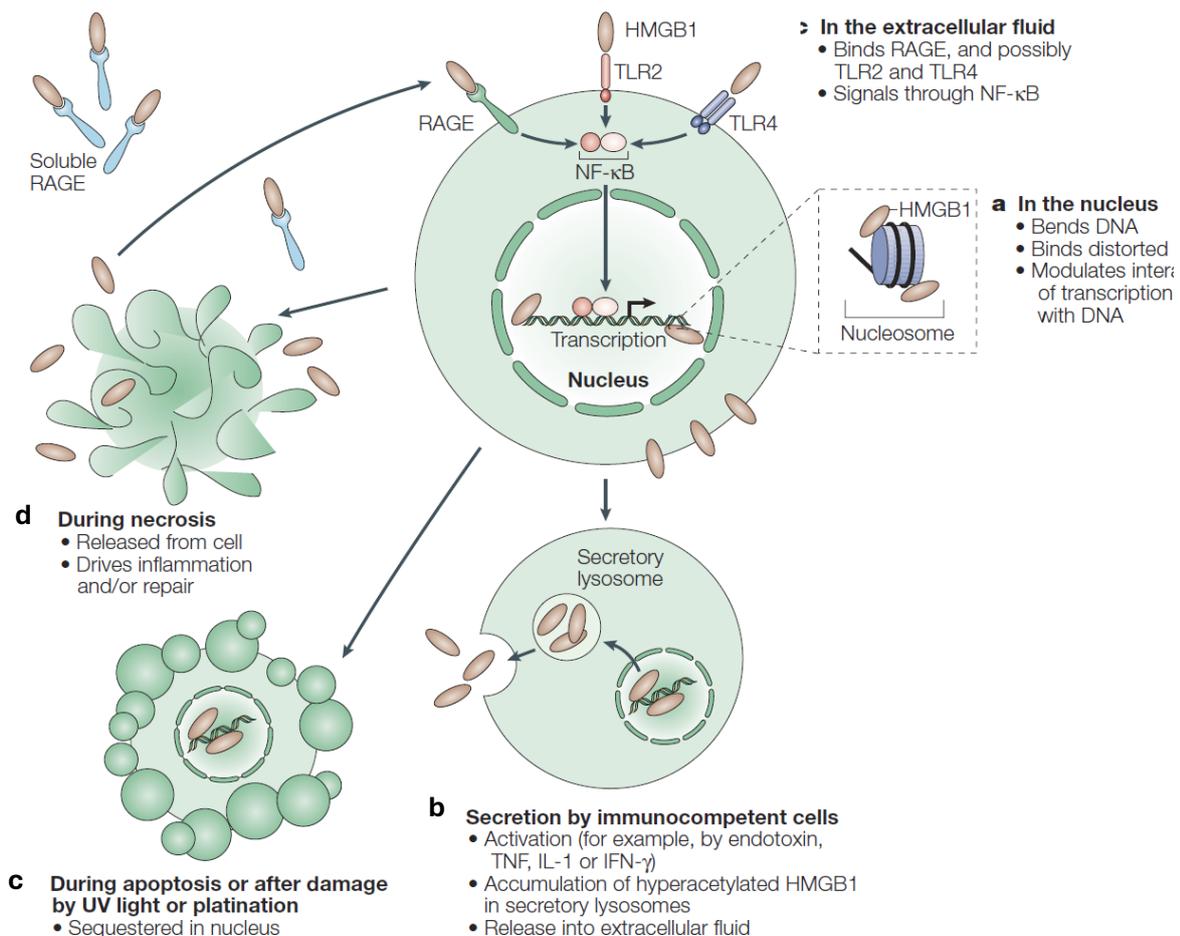


Abbildung 2: Intra- und extrazelluläre Funktionen von HMGB1

Nukleäres HMGB1 ist vorübergehend und lose mit Nucleosomen verbunden, die aus fest gebundenem Chromatin und DNA bestehen (a). Hier ist es für die Steuerung der DNA-Transkription von Bedeutung. (d) HMGB1 kann von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen nach Aktivierung durch bakterielle Produkte, wie Endotoxin, oder proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) oder Interferon-γ (IFN-γ) sezerniert werden. (c) Während des programmierten Zelltods, der Apoptose, verbleibt HMGB1 durch die DNA-Bindung im Zellkern und wird nicht freigegeben. (d) Während der Nekrose hingegen wird HMGB1 passiv aus der Zelle freigesetzt und initiiert Entzündungs- und Reparaturprozesse. Adaptiert nach (Lotze & Tracey, 2005)

Humanes HMGB1 besteht aus 215 Aminosäuren, die in zwei aufeinanderfolgenden DNA-Bindungsdomänen, der HMG-A-Box und der HMG-B-Box-Domäne, gefolgt von einem C-terminalen Schwanz und einer funktionell bedeutsamen N-terminalen Region unterteilt werden. Die nukleäre Lokalisation von HMGB1 ist auf zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) zurückzuführen, die als NLS1 und NLS2 bezeichnet werden. Durch posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung und Deacetylierung von NLS1 und NLS2 kann HMGB1 zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma shuttlen bzw. hin und her wandern (Chen et al., 2022). Insgesamt ist die Struktur von HMGB1 über alle Spezies hinweg evolutionär stark konserviert. Je nach zellulärer Lokalisation, tritt HMGB1 in drei verschiedenen Isoformen auf und interagiert mit

unterschiedlichen Rezeptoren. Im Zellinneren liegt HMGB1 überwiegend in der vollständig reduzierten Redoxform (*fully reduced*) vor, während es im Zytoplasma durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu sulfonyl HMGB1 oxidiert wird. Während reduziertes HMGB1 eine Zellmigration-induzierende Aktivität ähnlich eines *Chemoattractants* besitzt, weist disulfid HMGB1 stattdessen eine Zytokin-induzierende Funktion (vgl. Abb. 3) auf. Sulfonyl HMGB1 hat weder eine Zellmigration-induzierende noch eine Zytokin-induzierende Aktivität (Antoine et al., 2014).

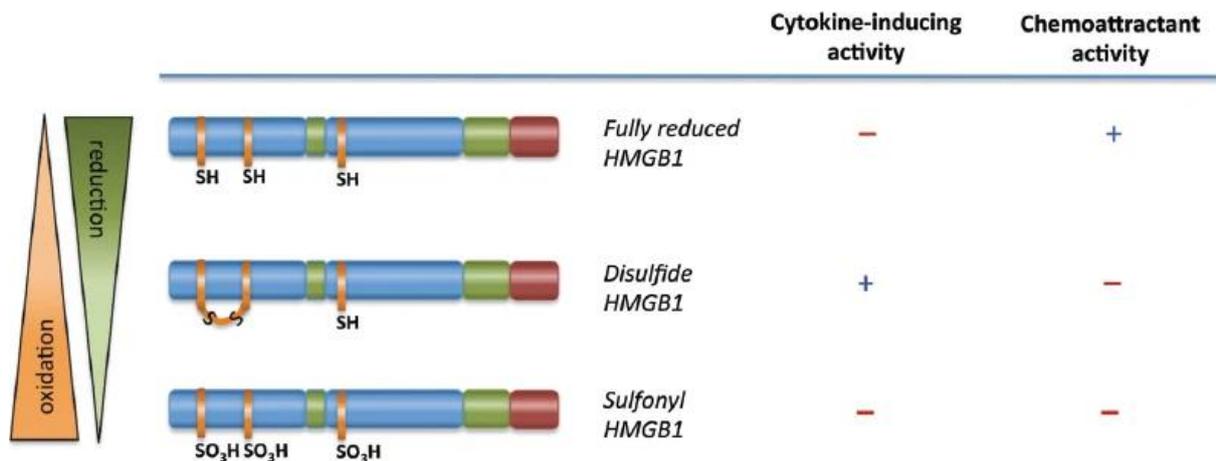


Abbildung 3: Die funktionelle Aktivität von HMGB1 wird durch den Redoxstatus bestimmt.

In seiner vollständig reduzierten Form hat HMGB1 eine Zellmigration-induzierende Aktivität, aber keine Zytokin-induzierende Aktivität. In der teilweise oxidierten Form hat disulfid HMGB1 keine Zellmigration-induzierte Aktivität, besitzt jedoch eine Zytokin-induzierende Aktivität. Die terminal oxidierte Form, Sulfonyl, hat keine bekannte Funktion. Adaptiert nach (Antoine et al., 2014).

### 1.5. HMGB1: Rolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Verschiedene Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass HMGB1 bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt ist. So wurden anti-HMGB1-Antikörper im Serum von CU-Patienten gefunden, welche auch in signifikantem Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität standen (Takaishi et al., 2012). Zudem korreliert die HMGB1-Konzentration im Stuhl und Serum von CED-Patienten mit dem Schweregrad der entzündeten Mukosa (Hu et al., 2015; Liu et al., 2006). Daher kann HMGB1 auch als Biomarker zur Überwachung des Krankheitsverlaufes von CEDs verwendet werden.

In der Vergangenheit wurde die Untersuchung der Funktionen von HMGB1 im Tiermodell durch die frühe postnatale Letalität von globalen HMGB1-Knockout Mäusen behindert (Calogero et al., 1999). In den letzten Jahren wurden jedoch Mäuse mit konditionellem HMGB1-Knockout einzelner Gewebe entwickelt, die neue Forschungsmöglichkeiten bieten. In mehreren Studien wurde

festgestellt, dass die Anwendung eines Anti-HMGB1-Antikörpers oder eines HMGB1-Inhibitors zu einer Verringerung der Entzündung, einer Verringerung der Dickdarmpermeabilität und einer Verringerung des Gewichtsverlusts bei DSS-behandelten Mäusen führte (Chen et al., 2020; Dave et al., 2009; Lin et al., 2009; Maeda et al., 2007). Dagegen berichteten Zhu et al., dass ein genetischer HMGB1-Knockout in intestinalen Epithelzellen zu einer erhöhten Apoptoserate und der Verschlechterung einer chemisch-induzierten Colitis im DSS-Mausmodell führt (Zhu et al., 2015).

## 1.6. Zielsetzung

HMGB1 ist ein ubiquitär vorkommendes Nukleoprotein, das proinflammatorische Funktionen besitzt, wenn es zellulär freigesetzt wird. Das Protein wird bei der Gewebsnekrose als DAMP passiv freigesetzt, kann aber auch aktiv von Immunzellen sezerniert werden. HMGB1-Spiegel im Stuhl und im Serum wurden als Marker für die Aktivität entzündlicher Darmerkrankungen und der Invasivität von Darmkrebs verwendet. Die genauen Mechanismen, durch die HMGB1 an der Pathogenese von CED beteiligt ist, sind bisher noch unklar und benötigen weitere Forschung.

In Vorarbeiten dieses Projektes wurde bereits gezeigt, dass eine genetische HMGB1-Defizienz in intestinalen Epithelzellen den Krankheitsverlauf während einer chemisch induzierten murinen DSS-Colitis signifikant verschärft. Dagegen konnte in diesem Modell kein Einfluss einer HMGB1-Defizienz in myeloiden Zellen beobachtet werden. Erstaunlicherweise beeinflusste weder die epitheliale noch myeloide HMGB1-Defizienz den Krankheitsverlauf während der murinen infektiösen *Citrobacter rodentium*- oder der chronischen T-Zell-induzierten Colitis. In Anbetracht des Zusammenhangs von CEDs und einem damit einhergehenden erhöhten Risiko von kolorektalen Karzinomen wurden epitheliale und myeloide HMGB1-Defizienzen in Mausmodellen der spontanen und inflammatorischen kolorektalen Karzinogenese untersucht. Im *ApcMin* Modell der spontanen Karzinogenese wurde ein erhöhtes Auftreten von Tumoren im Zusammenhang einer epithelialen HMGB1-Defizienz nachgewiesen. Im Gegensatz dazu hatte eine myeloide HMGB1-Defizienz keine Auswirkungen auf die Tumorentwicklung oder das -wachstum. Die Kombination von Azoxymethan (AOM) mit einer anschließenden wiederholten DSS-Behandlung zur Nachahmung der Colitis-assoziierten Karzinogenese führte zu einer verringerten Tumorlast in myeloiden HMGB1-Defizienten Versuchstieren, während eine epitheliale HMGB1-Defizienz keinen Einfluss auf die Tumorgenese hatte (Fölsch, 2021). Gemeinsam deuten diese Vorarbeiten auf verschiedene zell- und kontextabhängige Funktionen von HMGB1 an der verletzten Darmbarriere hin.

In der vorliegenden Arbeit soll vor allem der starke Phänotyp der epithelialen HMGB1-Deletion im DSS-Modell der akuten Entzündung untersucht und die Reaktionen des Wirtes auf Darmverletzungen weiter charakterisiert werden. Dazu werden Mäusen mit zellspezifischem genetischem HMGB1-Knockout in Epithelzellen im chemisch induzierten DSS-Colitis Modell untersucht. Die Analyse konzentriert sich hier vor allem auf die Charakterisierung der intestinalen Barriere in Bezug auf die Proliferation und Permeabilität sowie auf die Wundheilung und Aktivierung mechanistischer Signalwege in An- und Abwesenheit von intra- und extrazellulärem HMGB1. Ergänzt wird die Untersuchung durch die Sequenzierung HMGB1-defizienter Epithelzellen sowie der Analyse HMGB1-defizienter, intestinaler Organoide unter Normalbedingungen und während einer akuten Entzündung. Somit soll ein Rahmen für nachfolgende mechanistische und therapeutische Untersuchungen geschaffen werden, die neue Ansätze für die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bieten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
BD BD FACSAria™ II Cell Sorter	BD Biosciences, USA
BD LSRFortessa™	BD Biosciences, USA
Biowizard Xtra Line Clean Bench	Kojair®, Finnland
ChemiDoc XRS+ System	BioRAD Laboratories, USA
CO <sub>2</sub> Incubator KM-CC17RU2	Panasonic Industry Europe GmbH, Deutschland
Cooled Incubator MIR-154-PE	Panasonic Industry Europe GmbH, Deutschland
EASYstrainer Zellsiebe 40 µm und 70 µm	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
ELx50/8 Microplate Strip Washer	BioTek Instruments, Inc., USA
Fusion FX Imager	Vilber Lourmat, Frankreich
Horizontale Gelkammer	Hartenstein, Deutschland
Improved Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Deutschland
Infinite® F50 Mikroplatten Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Microtome Blades C53	Feather, Japan
Microtome HM 550	Thermo Scientific™, USA
Microwave HMT882L	Bosch, Deutschland
Mikroskop BZ-9000 (Biorevo)	Keyence, Japan
Multipette® E3	Eppendorf AG, Deutschland
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, USA
OP Besteck	Fine Science Tools, Inc., 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
Semi-dry Blotter	nan, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific™, USA

Thermomixer Comfort	Biometra®, Deutschland
Tissue Cool Plate COP 20	MEDITE, Deutschland
Tuberoller RS-TR5	Phoenix Instrument, Deutschland
Viiia™ 7 System	Applied Biosystems™, USA
Vortex-Mixer PV-1	Grant Instruments, UK
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Deutschland

### 2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/ Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Fluoreszeinisothiocyanat–Dextran, FD4-100MG, average mol wt 3,000-5,000	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dextran sulfate sodium salt, approx. M.W. 500,000	Thermo Scientific™, USA
DMEM	Gibco™, USA
1-beta-D-arabinofuranosyl-5-azacytosine (C6645)	Sigma-Aldrich, Deutschland
BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), Thymidine analog	Abcam, USA
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco™, USA
1,4-Dithioerythritol (DTE, D8255)	Sigma-Aldrich, Deutschland
10x MM (B71)	Thermo Scientific™, USA
Acrylamid (T802.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Advanced DMEM/F12	Gibco™, USA
Alcian-Blue Staining Solution	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammonium Persulfat (APS)	PanReac AppliChem
Antibody Diluent	Dako North America, Inc., USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deutschland
BD Matrigel Growth Factor reduced; Phenol red free	BD Biosciences, USA
Benzamidine	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Deutschland

CD326 (EpCAM) MicroBeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Collagenase Typ I (C0130) ≥ 125 CDU/mg	Sigma-Aldrich, Deutschland
Corn oil	Sigma-Aldrich, Deutschland
CryoStor™ CS10	Stemcell Technologies, Kanada
Dako EnVision+ System- HRP Labelled Poly-mer Anti-Rabbit (K4003)	Dako North America, Inc., USA
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468)	Dako North America, Inc., USA
Dextran-Natriumsulfat (DSS) M.W.=36.000-50.000 Da	MP biomedicals
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (4984.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
DNase I recombinant (A3778,0050) 5278 U/mg	PanReac AppliChem
dNTPs (R72501)	Invitrogen, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Calcium und Magnesium (D8537-500ML)	Sigma-Aldrich, Deutschland
EDTA – Solution pH 8.0 (A3145,1000)	PanReac AppliChem
Entellan® new (1.07961.0100)	Merck GKAA, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ethanol, vergällt ≥99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS), heat inactivated	Gibco™, USA
Formaldehyde solution (F8775-25ML)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glycerol (G7757-1L)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Goat Serum (X0907)	Dako North America, Inc., USA
Hämalaun Lösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
HBSS 10X (14065-056)	Gibco™, USA
HEPES (H4034-500G)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Intesticult™ Organoid Growth Medium (Mouse)	Stemcell Technologies, Kanada
Kaliumchlorid (6781.1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (1.04873.1000)	Merck GKAA, Deutschland
LE Agarose (84004)	Biozym Scientific GmbH
Leupeptin (L2884)	Sigma-Aldrich, Deutschland
LPS aus E. coli	Sigma-Aldrich, Deutschland
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH, Germany

Methanol (1437.2511)	ChemSolute® (Th. Geyer)
Midori Green (MG08)	Nippon Genetics Europe GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumorthovanadat (S6508-10g)	Sigma-Aldrich, Deutschland
PageRule™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 - 250 kDa	Thermo Scientific™, USA
Percoll	GE Healthcare Life Sciences, UK
PMSF (P-7626)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Polybrene	
Protein Block Serum-Free Ready-to-Use (C0909)	Dako North America, Inc., USA
Proteinase K, recombinant (03115828001)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Puromycin, 10 mg/ml in destilliertem Wasser	Thermo Scientific™, USA
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
RPMI-1640-Medium	Gibco™, USA
RPMI-1640-Medium + GlutaMAX™	Gibco™, USA
Sodium dodecyl sulfate (SDS), ultra pure (2326.2)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tamoxifen (10540-29-1)	Sigma-Aldrich, Deutschland
TaqMan™ Fast Advanced PCR Master Mix	TaqMan™ Fast Advanced PCR Master Mix
Taq-Polymerase	Thermo Scientific™, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (1.06448.1000)	Merck GKA, Deutschland
Triton™ X-100 (T8787-100ML)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trizma® base (T1503-1KG) (Tris base)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trizma® hydrochloride (T5941-500G) (Tris HCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypan Blue solution 0.4% for microscopy	Sigma-Aldrich, Deutschland
TrypLE™ Express Enzyme 1x, no phenol red	Life Technologies
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot	Gibco™, USA
Tween® 20 (A4974,0250)	PanReac AppliChem
UltraPure™ Distilled Water (10977-035)	Invitrogen™, USA
Wasserstoffperoxid (1.07209.1000)	Merck GKA, Deutschland
Xylol	ChemSolute® (Th. Geyer), Deutschland
Y-27632 (Ab120129)	Abcam, USA

### 2.1.3. Kits

Tabelle 3: Liste kommerzieller Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Fabp2 PicoKine™ ELISA (EK1622)	Boster Biological Technology, USA
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (4368814)	Thermo Scientific™, USA
IBL International HMGB1 ELISA	IBL International/ Tecan, Deutschland
Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Mouse Zonulin (ZUN) ELISA Kit (MBS93634444)	MyBiosource, USA
NucleoSpin® RNA Mini Kit	Macherey Nagel GmbH und Co. KG, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay kit (23227)	Thermo Scientific™, USA
Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Panel A	R&D Systems, USA
Proteome Profiler™ Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Sandwich ELISA Kit for Amiloride Binding Protein 1 (ABIN6962868)	antibodies-online GmbH, Deutschland
Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate (34075)	Thermo Scientific, USA

### 2.1.4. Software

Tabelle 4: Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Magellan™	Tecan Trading AG, Schweiz
BD FACSDiva™ Software	BD Biosciences, USA
Evolution Capt	Vilber Lourmat, France
FlowJo Software	Tree Star, USA
GraphPad Prism 10	GraphPad, USA
ImageJ	Wayne Rasband (National Institutes of Health), USA

QuantityOne Software

BioRAD Laboratories, USA

ViiA™ 7 System

Applied Biosystems™, USA

## 2.1.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 5: DTT Puffer

Menge	Reagenz
10 ml	10ml 10x HBSS
10 ml	10ml 10x HEPES
10 ml	10ml FCS heat-inactivated
70 ml	70ml VE-H2O
15,4 mg	DTT; frisch hinzugeben

Tabelle 6: Collagenase Puffer

Menge	Reagenz
5 ml	fRPMI
50 µl	Collagenase (100mg/ml)
50 µl	Collagenase (100mg/ml)

Tabelle 7: RIPA Puffer

Menge	Reagenz
5 mM	EDTA
0.1%	SDS
150 mM	NaCl
50 mM	Tris HCl
1,0%	Triton-X 100
0,5 %	Natrium Deoxycholat

pH mit HCl auf 7,4 einstellen

Tabelle 8: RNase Puffer

Menge	Reagenz
0,363 g	Tris base
0,0876 g	EDTA
Ad 300ml	VE-H <sub>2</sub> O lösen

pH 8,0 einstellen

Tabelle 9: MACS Puffer

Menge	Reagenz
Ad 100 ml	1x PBS
1 ml	FCS heat-inactivated
0,1 %	EDTA

Tabelle 10: Lämmli Puffer

Menge	Reagenz
1,5 g	250 mM Tris/HCl
5 ml	10% SDS
25 ml	50% Glycerol
3,86 g	0,5 M DTT
Ad 50 ml	VE-H <sub>2</sub> O

Tabelle 11: 6% Sammelgel Stock (SDS-Page)

Menge	Reagenz
12,5 ml	40% Acrylamid
12,5 ml	1,5 M Tris pH 6,8
	10 % SDS
74 ml	VE-H <sub>2</sub> O

Tabelle 12: 12% Trenngel Stock (SDS-Page)

Menge	12% Trenngel (SDS-Page)
30 ml	40% Acrylamid
25 ml	1,5 M Tris pH 8,8;
1 ml	10 % SDS
20 ml	Glycerol
24 ml	VE-H20

Tabelle 13: 10x Laufpuffer (Westernblot)

Menge	Reagenz
30 g	30g Tris-base
144 g	144g Glycerol
100 ml	10% SDS
ad 1000 ml	VE-H20

Tabelle 14: 10x Blotpuffer (Westernblot)

Menge	Reagenz
30,3 g	Tris-base
144 g	Glycerol
ad 1000 ml	VE-H20

Tabelle 15: 1x Blotpuffer

Menge	Reagenz
100 ml	10x Blotpuffer-Stock
200 ml	Methanol
ad 1000 ml	VE-H20

Tabelle 16: Tris-buffered saline (TBS) Puffer

Menge	Reagenz
24,22 g	Tris Base
175,32 g	NaCl
ad 2000 ml	VE-H <sub>2</sub> O

pH auf 7,6 einstellen

Tabelle 17: 1x TBST Puffer

Menge	Reagenz
100ml	10x TBS
500µl	Tween® 20
ad 1000 ml	VE-H <sub>2</sub> O

Tabelle 18: Citratpuffer

Menge	Reagenz
2,94 g	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
0.05 %	Tween20
Ad 1000 ml	ml VE-H <sub>2</sub> O

pH auf 6,0 einstellen

Tabelle 19: Chelation Stock Puffer für die Organoid-Kultur

Menge	Reagenz
1,97 g	Dinatriumhydrogenphosphat
2,7 g	Kaliumdihydrogenphosphat
14 g	Natriumchlorid
0,3 g	Kaliumchlorid
Ad 500 ml	VE-Wasser

Tabelle 20: Krypten Isolations Puffer für die Organoid-Kultur

Menge	Reagenz
4 ml	Chelation stock buffer 5x
16 ml	VE-Wasser
100 µL	[0.5 mM] DL- dithiothreitol
200 µL	[5 mM] EDTA

Tabelle 21: Standard Zellkultur Medium

Menge	Reagenz
500 ml	DMEM
5 ml	Penicillin-Streptomycin
50 ml	FCS

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Tierversuche

Die Tierversuche wurden durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der freien Hansestadt Hamburg in den Tierversuchsanträgen ORG\_1034 und G124/17 genehmigt. Die Versuchstiere wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gezüchtet und gehalten. Die Versuchstiere wurden in Gruppen mit einem 12 Stunden Tag- und Nacht-Rhythmus sowie Standardfutter *ad libitum* gehalten.

### 2.2.2. Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien haben einen C57BL/6J-Hintergrund und wurden ursprünglich von *Jackson Laboratory* bezogen. Die *Hmgb1*-gefloxten Mäuse (*Hmgb1<sup>ff</sup>*) stammen von Robert Schwabe aus der Columbia Universität, USA (Huebener et al., 2014). Durch Kreuzung der *Hmgb1<sup>ff</sup>*-Mäuse mit Villin *cre/+* Mäusen wird HMGB1 als konditioneller Knockout gezielt in den epithelialen Zellen des Gastrointestinaltraktes deletiert (*Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*). Während den Versuchen dienten Cre-negative Geschwistertiere, die keine Cre-Rekombinase exprimieren, als Kontrollen. Weiterhin wurde die Tamoxifen induzierbare *Hmgb1<sup>ff</sup>*-UBC-Cre/ERT2 Mauslinie verwendet (Ruzankina et al., 2007). Diese Linie erlaubt es, die *Hmgb1*-Expression in verschiedenen

Gewebetypen zugleich zeitlich zu deaktivieren. Weitere Informationen zu der Tamoxifen-Induktion der transgenen UBC-Cre-ERT2-Linie sind in dem nachfolgenden Abschnitt zu finden.

### 2.2.3. Tamoxifen-Injektion

Zur Tamoxifen-induzierbaren *Hmgb1*-Deletion in der *Hmgb1<sup>ff</sup>*-UBC-Cre/ERT2 Linie wurden *Hmgb1<sup>+/+</sup>* UBC cre+ (Kontrolle) bzw. *Hmgb1<sup>ff</sup>* UBC cre+ (KO) Mäuse mit Tamoxifen behandelt (Sohal et al., 2001). Die Mauslinie wurde durch Rückkreuzung von *Hmgb1<sup>ff</sup>* auf die B6.Cg-*Ndor1<sup>Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb/1J</sup>* Linie erzeugt. Durch die Applikation von Tamoxifen wird *Hmgb1* in allen Zellen deletiert. Das Tamoxifen wurde in Maisöl in einer Konzentration von 20 mg/ml lichtgeschützt durch Schütteln über Nacht bei 37°C gelöst und für die Dauer der Injektionen bei 4°C gelagert. Für die Auslösung der Rekombination wurden je 100 µl Tamoxifen-Lösung durch intraperitoneale Injektion alle 24 Stunden über 5 Tage verabreicht. Die Injektionsstelle wurde vor der Injektion mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Es folgte eine Wartezeit von 8-12 Wochen, in denen die Mäuse engmaschig auf unerwünschte Reaktionen auf die Behandlung überwacht wurden (Madisen et al., 2010; Sohal et al., 2001). Zur Überprüfung einer effizienten *Hmgb1*-Deletion wurden, wie nachfolgend in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, verschiedene Gewebetypen entnommen und auf RNA und Proteinebene auf *Hmgb1*-Expression bzw. HMGB1-Proteinmenge untersucht. Nach 8 Wochen zeigen *Hmgb1<sup>ff</sup>* UBC cre+ Mäuse eine Reduktion der *Hmgb1*-Expression im Darm um ca. 90%.

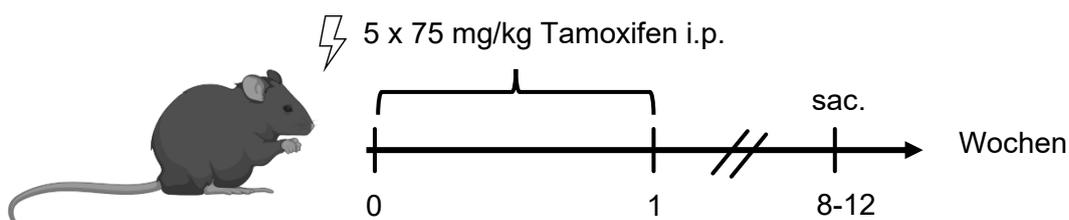


Abbildung 4: Ablauf der murinen Tamoxifen Injektion und Induktion.

Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich mit 5 x 75 mg/kg Tamoxifen i.p. behandelt. Nach einer Wartezeit von 8-12 Wochen wurden die Tiere sakrifiziert und die Organe entnommen. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung einer effizienten HMGB1-Deletion auf RNA- und Protein-Ebene.

#### 2.2.4. Natrium-Dextransulfat (DSS) induzierte Colitis

Das DSS-Modell wurde angewendet, um eine akute Colitis im Mausmodell zu untersuchen. Dazu wurde den Versuchstieren 1.5 % DSS m/V (36-50kDa) im Trinkwasser für einen Zeitraum von maximal 7 Tagen verabreicht und anschließend wieder auf normales Trinkwasser umgestellt. Während der Versuchslaufzeit wurden die Tiere täglich gewogen und über Score Sheets überwacht. Ein Gewichtsverlust von mehr als 20% sowie ein stark verändertes Verhalten nach den Kriterien der Belastungstabellen führte zum Abbruch des Versuches. Der Mechanismus, durch den DSS eine Darmentzündung auslöst, ist noch unklar. Es ist wahrscheinlich das Ergebnis einer Schädigung der Dickdarm auskleidenden Epithelschicht, welche die Verbreitung von entzündungsfördernden Darminhaltsstoffen (z.B. Bakterien und deren Produkte) in das darunter liegende Gewebe ermöglicht. Das DSS-Colitismodell ist in der CED-Forschung aufgrund seiner Schnelligkeit, Einfachheit, Reproduzierbarkeit und Kontrollierbarkeit sehr verbreitet (Chassaing et al., 2014).



Abbildung 5: Versuchsablauf der murinen DSS-Colitis.

Die Versuchstiere erhielten über das Trinkwasser 1,5 % (m/V) Natrium-Dextransulfat (DSS) über einen Zeitraum von 7 Tagen. An Tag 8 wurden die Tiere sakrifiziert und Organe entnommen. Die Kontrollgruppe erhielt zur gleichen Zeit normales Trinkwasser.

#### 2.2.5. Organentnahme

Zur Entnahme der Organe wurden die Versuchstiere zunächst mit einem  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Gemisch betäubt und daraufhin mit  $\text{CO}_2$  euthanasiert. Die Tiere wurden dann mit Ethanol desinfiziert und das Abdomen zur finalen Blutentnahme aus der *Vena cava* geöffnet. Das Blut wurde für die Serumgewinnung 10 Minuten bei  $2000 \times g$  zentrifugiert, bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert und später für ELISA-Analysen verwendet. Anschließend wurde das Kolon freipräpariert und von Zäkum bis Anus vermessen. Die Stuhlproben wurden gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Darm wurde mit DPBS gespült und für weiterfolgende Analysen wie folgt segmentiert: Für histologische Analysen wurde ca. 1 cm des distalen Kolons geschnitten und in 4% Paraformaldehyd in *phosphate-buffered saline* (PBS) transferiert. Je 0.5 cm des darauffolgenden

proximalen Stückes wurde für RNA- und Protein-Analysen abgetrennt. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und langfristig bei -80°C oder kurzfristig bei -20°C gelagert. Das restliche Kolonsegment wurde für durchflusszytometrische Analysen verwendet. Dazu wurde das Kolon bis zur Zellisolation in eiskaltem RPMI-1640-Medium gelagert.

#### 2.2.6. Isolation von Immunzellen aus dem Kolon

Für die Immunzell-Isolation aus dem Kolon wurde das gewonnene Gewebe in 0,5 cm große Stücke zerteilt und für 20 Minuten schüttelnd bei 37°C in der frisch angesetzten DTE-Lösung inkubiert. Anschließend wurden Gewebestücke in einer Petrischale mit einer Schere weiter zerkleinert, bis eine homogene Mischung entstand. Der Rest der DTE-Lösung wurde in einem 50 ml-Falcon mit kaltem PBS/1%FCS aufgefüllt und 5 Minuten bei 400xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in kaltem PBS/1%FCS resuspendiert und auf Eis gelagert. Parallel wurde das zerkleinerte Kolongewebe in frisch angesetzter Kollagenase-Lösung (60 µl Kollagenase 100 mg/ml and 12 µl DNase 5000 U/ml) bei 37°C für 45 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Kollagenase Mischung durch ein 100 µm-Zellsieb gefiltert und mit den zuvor gewonnenen Zellen in einem 50 ml-Falcon zusammengeführt. Größere Gewebestücke wurden im Zellsieb zerrieben und in den 50 ml-Falcon gespült. Zuletzt wurde die Zellsuspension mit PBS/1%FCS auf 50 ml aufgefüllt und bei 400xg 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 4 ml 40%-Percoll resuspendiert und auf 4 ml 67%-Percoll in einem 15 ml-Falcon geschichtet. Der Gradient wurde dann bei 400xg 20 Minuten (Beschleunigung und Bremse auf Stufe 1) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die daraus entstehende, Zellen beinhaltende, Interphase wurde mit einer 1ml Pipette vorsichtig entnommen und in einem 50 ml-Falcon auf 30 ml PBS/1%FCS aufgefüllt. Die Immunzellsuspension wurde ein weiteres Mal bei 400xg 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in ca. 500 µl FACS-Puffer (PBS/2,5 % FCS) resuspendiert.

#### 2.2.7. Epithelzell-Isolation aus dem Kolon

Zur Isolation von Epithelzellen wurden die Gewebestücke zunächst wie in 2.2.6 beschrieben in der DTE-Lösung inkubiert und der Falcon mit PBS/1%FCS aufgefüllt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Dann folgte eine Zentrifugation bei 300xg für 10 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl TrypLE™ Express Enzym (ThermoFisher) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 8 Minuten bei 37°C, wobei eine Probe der Lösung regelmäßig unter dem

Mikroskop auf den Fortschritt der Gewebe-Dissoziation untersucht wurde. Dann wurde der Verdau mit PBS/2%FCS gestoppt und die Suspension durch ein 70µm-Zellsieb gefiltert und die Gewebestücke zerrieben. Zwischenzeitlich wurde das Sieb mit PBS/2%FCS gespült und danach bei 300xg 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Aus dem gewonnenen Zellpellet wurden im Anschluss unter Verwendung von CD326 (EpCAM) MicroBeads (Miltenyi Biotec) die intestinalen Epithelzellen gewonnen. Durch positive Selektion CD326-exprimierender Zellen können die Epithelzellen aus der Zellsuspension separiert werden. Dazu wurde das Zellpellet in 100 µl der MicroBeads-Lösung (10 µl Beads und 90 µl MACS-Puffer) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der magnetischen MACS-Säulen, indem sie je drei Mal mit MACS-Puffer gespült wurden. Dann wurde die Zellsuspension auf die durchfeuchtete Säule gegeben und drei Mal mit MACS-Puffer gespült. Zuletzt erfolgte die Eluierung der Epithelzellen mittels der magnetischen MACS-Säulen. Der Flow-Through der gespülten MACS-Säulen wurde aufbewahrt und zur Isolation der darin enthaltenen Immunzellen, wie in 2.2.6 beschrieben, verwendet.

#### 2.2.8. FACS-Analyse

Zur Färbung von Oberflächenmarkern der isolierten Immunzellen wurde die Zellsuspension in FACS-Tubes resuspendiert und mit dem Totzellen-Farbstoff Zombie Aqua™ (1:1000) für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Tubes je 6 Minuten bei 350xg und 4°C zentrifugiert, mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und 60 Minuten bei 4°C mit der angesetzten Antikörpermischung (vgl. Tabelle 22) im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Tubes wieder mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert, durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Tabelle 22: FACS-Antikörper Panel

Antikörper	Hersteller	Klon	Ursprung	Konzentration	Verdünnung
Zombie-Aqua	Biolegend	n.a.	n.a.	0,2 mg/ml	1:1000
FitC CD3	Biolegend	17A2	Ratte	0,5 mg/ml	1:600
Pecy7 Cd11b	Biolegend	M1/70	Ratte	0,2 mg/ml	1:600
ApcCy7 CD19	Biolegend	6D5	Ratte	0,2 mg/ml	1:200
BUV395 CD45	Biolegend	30-F11	Ratte	0,2 mg/ml	1:400

Die gefärbten Immunzellen wurden am BD FACSAria™ II (*Cell Sorter*) analysiert und in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes mit vorgelegtem RNA-Lyse-Puffer sortiert. Die *Gating*-Strategie einer beispielhaften Messung ist in Abbildung 6 dargestellt. Nachdem durch das *Gating* der Parameter FSC-H und FSC-A Dubletten ausgeschlossen wurden, wurde aus der Gruppe der Einzelzellen die lebende Zellpopulation bestimmt. Aus dieser wurde dann durch die Kombination von CD3+ und CD19 die T-Zell Fraktion (CD3+) bestimmt. Durch die Anwendung eines invertierten *Gates* (*not-gate*) wurden im letzten Schritt die T-Zellen exkludiert und durch Kombination von CD11b und CD19 zuletzt die myeloide (CD11b+) sowie die B-Zell (CD19+)-Population bestimmt. Alle drei Populationen wurden in die vorbereiteten Tubes mit Lysepuffer sortiert. Die erforderliche Mindestmenge wurde auf 10.000 sortierte Zellen pro Fraktion festgesetzt, um genügend RNA für weitere Analysen zu erhalten. Die Daten wurden mit der BD FACSDiva-Software aufgezeichnet und mit Hilfe des *FlowJo*-Programms analysiert.

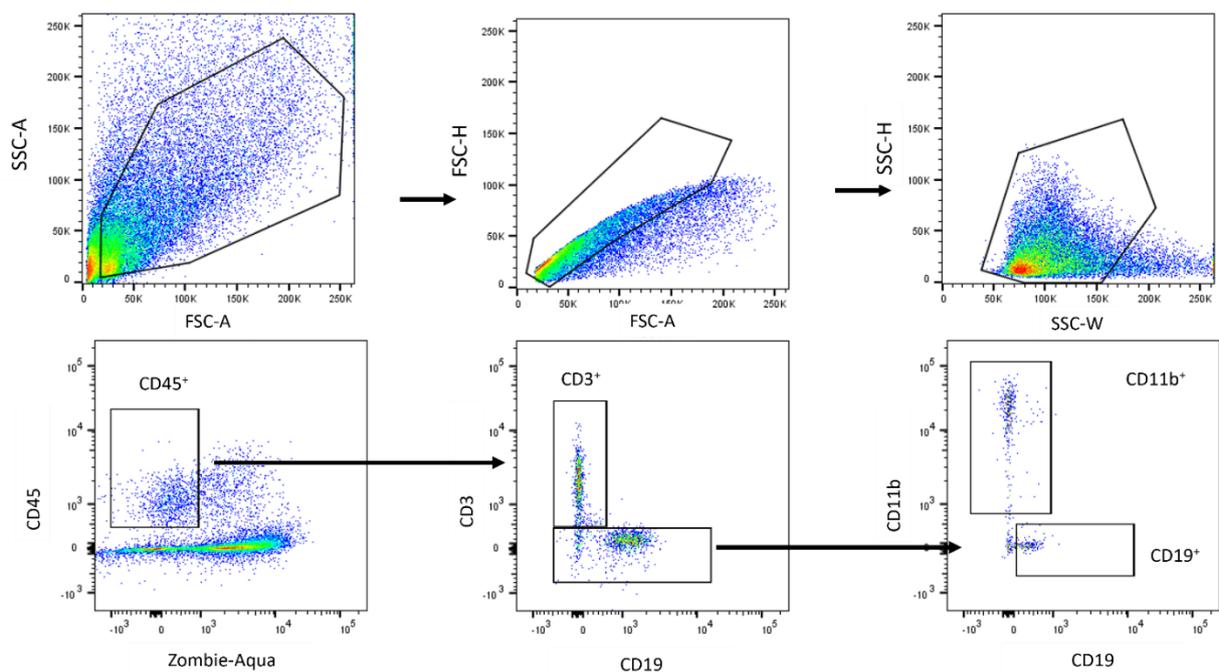


Abbildung 6: FACS-*Gating*-Strategie aus *FlowJo* zur Analyse und zum Sorting der dargestellten Immunzellfraktionen.

Analysiert wurden myeloide Zellen (CD11b+), T-Zellen (CD3+) und B-Zellen (CD19+) am *BD FACSAria™ II*, die aus 4 Tagen DSS-behandelten oder unbehandelter Mäuse isoliert wurden. Aus den Immunzellen wurden mit den gesetzten *Gates* zunächst die Einzelzellen und dann die lebenden Zellen bestimmt. Aus CD45+ Leukozyten wurden CD3+ T-Zellen bestimmt und *gesorted*. Durch Anwendung eines invertierten *Gates* wurden im letzten Schritt alle CD3+ Zellen ausgeschlossen und weiter nach CD11b+ myeloiden Zellen und CD19+ B-Zellen separiert und *gesorted*.

### 2.2.9. RNA-Isolation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA aus Kolongewebe, primären Immunzellen, sekundären Zelllinien oder Organoiden isoliert. Die RNA wurde stets mit dem NucleoSpin® RNA-Kit von Macherey und Nagel nach Herstelleranweisung isoliert. Dabei wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert. RNA aus Kolongewebe wurde in 40 µl Wasser, RNA aus Organoiden und Zellkulturversuchen sekundärer Zellen in 20 µl und RNA aus isolierten Immunzellen in 10 µl Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop Spektrometer (*Peqlab*, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der aufgereinigten RNA wurde anhand des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt. Werte von 1,8 bis 2,0 wurden als optimal angesehen. Als Referenzwert diente Wasser. Bis zur Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 2.2.10. cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels des *High-Capacity cDNA Reverse Transkription*-Kits von Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben. Es wurde je nach Ausgangsmaterial 2 µg (Kolongewebe) oder 500 ng (Zellen und Organoiden) RNA in 20 µl cDNA-Synthese-Ansatz umgeschrieben. Der Reaktionsansatz der reversen Transkription sowie das verwendete PCR-Programm des Thermo-Cyclers sind in nachstehenden Tabellen 23 und 24 aufgeführt.

Tabelle 23: Reaktionsansatz der reversen Transkription

Reagenz	Volumen [µl]
10x RT Buffer	2
dNTPs (100mM)	0,8
10x Random Primer	2
Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1
RNase freies Wasser	4,2

Tabelle 24: cDNA-Transkriptionsprogramm des Thermo-Cyclers

Schritt/Zyklus	Temperatur [°C]	Dauer [Min]
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

### 2.2.11. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurden 10 µl Reaktionsansätze verwendet. Jeder Ansatz bestand aus 5 µl TaqMan™ Fast Advanced PCR Master Mix, 3.5 µl Nuklease freiem Wasser, 1 µl der zuvor umgeschriebenen cDNA und 0.5 µl TaqMan™ Sonden (vgl. Tabelle 25). TaqMan™ Sonden mit einer VIC-Farbstoffmarkierung wurden für die Housekeeper-Gene *18S* und *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt)* verwendet. Die restlichen Sonden der Gene von Interesse besaßen eine FAM-Markierung. Die Proben wurden in Duplikaten in 96-Well-Platten pipettiert, versiegelt und im Viia™ 7 System von Applied Biosystems (vgl. Tabelle 26) gemessen. Der Mittelwert der jeweiligen Probe wurde zur nachfolgenden quantitativen Bestimmung der Genexpression verwendet.

Tabelle 25: Liste der verwendete TaqMan™ Sonden für die qPCR

Zielgen	Nummer
<i>18S</i>	4319413E
<i>Acta2</i>	Mm00725412_s1
<i>Cldn1</i>	Mm01342184_m1
<i>Cldn2</i>	Mm00516703
<i>Cldn4</i>	Mm00515514_s1
<i>Col1a</i>	Mm00801666_g1
<i>Cxcl1</i>	Mm04207460_m1
<i>Fn1</i>	Mm01256744_m1
<i>Gnai</i>	Mm01165301_mH
<i>Hmgbl</i>	Mm04205650_gH

<i>Hprt</i>	Mm00446968_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Lgr5</i>	Mm00438890_m1
<i>Lyz1</i>	Mm00657323_m1
<i>MMP10</i>	Mm01168399_m1
<i>MMP3</i>	Mm00440295_m1
<i>Mmp9</i>	Mm01341361_m1
<i>Muc2</i>	Mm01276676_m1
<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1
<i>Ocln</i>	Mm00500910
<i>Olfm4</i>	Mm01320260_m1
<i>Olf78</i>	Mm00453733
<i>Sox9</i>	Mm00448840_m1
<i>Stat1</i>	Mm01257286_m1
<i>Tgfb</i>	Mm01178820_m1
<i>Timp1</i>	Mm01341361_m1
<i>Tjp/ZO-1</i>	Mm01320638_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1
<i>UBD</i>	Mm01972246_s1
<i>Villin</i>	Mm00494146_m1

Tabelle 26: qPCR-Programm des Viia™ 7 Systems

Stufe	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [Min]	Zyklen
Hold Stage	UNG Aktivierung	50	2	1
	Taq Polymerase Aktivierung	95	10	
PCR Stage	Denaturierung	95	0,25	40
	<i>Annealing</i> und Extension	60	1	

### 2.2.12. RNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierende RNA wurde wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben isoliert und mindestens 100 ng je Probe aliquotiert, bei -80°C aufbewahrt und an den Dienstleister versendet. Nach einer

Qualitätskontrolle durch Novogene Co, Ltd (UK) wurde die eukaryotische RNA-Sequenzierung des gesamten Transkriptoms mit der Illumina Novaseq 6000 PE (paired-end) 150 durchgeführt. Für den Datensatz der myeloiden Zellen wurde aufgrund der geringen RNA-Ausbeute eine Low-Input-Sequenzierungsmethode verwendet. Die durch Novogene Co, Ltd (UK) bereitgestellten Daten wurden mit Hilfe der Bioinformatikabteilung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durch Minyue Qi und Malik Alawi ausgewertet. Für die *Pathway Enrichment* Analyse wurde die internationale biologische *Gene Ontology*-Datenbank als Grundlage verwendet.

### 2.2.13. Proteinisolation

Proteine wurden aus Kolongewebe, aus Zellkultur Experimenten an MC38 Zellen oder Organoiden gewonnen. Pro 100mg Gewebe wurde 1 ml RIPA-Puffer verwendet. Kurz vor dem Hinzufügen der Probe wurde der Proteinase/Phosphatase-Inhibitor bestehend aus 10mM Benzamidin, 2mM Natriumorthovanadat, 1 µg/ml Leupeptin, 3,4 µg/ml Aprotinin und 1mM PMSF beigemischt. Zur Lyse wurde die Probe auf Eis per Hand mit einem Gewebe-Mörser homogenisiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 20 Minuten bei 2500x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Herstellerangabe mit dem Pierce™ BCA-Protein Assay Kit durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben mit VE-Wasser auf 1 mg/ml verdünnt, mit 1x Lämmli-Puffer versetzt und zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C in einem Thermoblock erhitzt. Zuletzt wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt in einer SDS-Page eingesetzt.

### 2.2.14. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zuerst wurde ein 6% Trenngel mit einem 16% Sammelgel in einem Mini-PROTEAN® Casting Stand (BIO-RAD) überschichtet. Ein 10-er Proben-Kamm wurde eingesetzt und das Gel für ca. 30 Minuten unter einem Abzug ausgehärtet. Zur nachfolgenden Gelelektrophorese wurden die Gele wasserdicht in den Elektrodenrahmen eingespannt und mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Der Proben-Kamm wurde entfernt und je 40 µl der mit Lämmli-Puffer versetzten Proteinproben aufgetragen. Als Marker wurden 7 µl des PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10- 250 kDa (Thermo Fisher) eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 Volt (konstant) gestartet und bei Erreichen der Trenngel-Front nach ca. 30 Minuten stufenweise für 50 Minuten auf 130 Volt (konstant) eingestellt.

## 2.2.15. Semi-Dry Blot

Eine 0,25 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurde vor Gebrauch für 10 Minuten in Methanol aktiviert. Das Sammelgel wurde abgetrennt und zugeschnittenes Filterpapier in Blot-Puffer getränkt. Das Gel-Sandwich wurde aus je zwei Filterpapieren, PVDF-Membran und dem Trenngel zusammengebaut. Die aufgetrennten Proteine im 16% Acrylamidgel wurden dann bei 10 Volt für 120 Minuten auf die PVDF-Membran übertragen. Im Anschluss wurde die Membran für 15 Minuten getrocknet bevor sie für eine Stunde in 5 % Milchpulver in TBS-T (TBS-Puffer mit 0,05 % Tween® 20) in einem 50 ml-Falcon geblockt wurde. Der Primärantikörper wurde ebenfalls in 5 % Milchpulver in TBS-T angesetzt und über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3x 5 Minuten in TBST gewaschen und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper eine Stunde rollend bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen für 3x 5 Minuten in TBST wurde die Membran mit Hilfe des *SuperSignal™ West Dura Dura Extended Duration Substrat Kits* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben entwickelt und im *Fusion FX Imager* belichtet und dokumentiert. Die Signalstärke der Proteinbanden wurden mit der Software *Evolution Capt (Vilber)* bestimmt und auf die Housekeeper α-Tubulin oder β-Actin normalisiert. Um die Antikörper zu entfernen und die Ladekontrolle oder weitere Antigene zu färben, wurde die Membran für 15 Minuten mit *ROTI®Free Stripping-Puffer* (Carl Roth GmbH + Co. KG) gewaschen. Eine Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnung ist in nachstehender Tabelle 27 zu finden.

Tabelle 27: Westernblot Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Artikelnummer	Hersteller	Verdünnung
Akt	4691	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:1.000
c-Jun	9165	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:1.000
cREB	9192	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:1.000
Erk1/2	sc-514302	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA	1:1.000
HMGB1	ab18256	Abcam, USA	1:1.000
HRP-linked anti-mouse IgG	7076	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:10.000
HRP-linked anti-rabbit IgG	7074	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:10.000
LC3	2775	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:500
p-Akt	4058	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:1.000
p-c-Jun	2361	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:1.000

p-CREB	9198	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:1.000
p-Erk1/2	sc-81492	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA	1:1.000
SQSTM1 / p62	ab109012	Abcam, USA	1:4.000
$\alpha$ -Tubulin	3873	Cell Signaling Technology, Inc., USA	1:5.000
$\beta$ -Actin	A5441	Sigma-Aldrich, Germany	1:5.000

## 2.2.16. Histologie

Direkt nach der Organentnahme wurde das Kolongewebe für 24 Stunden bei 4°C in Roti®-Histofix 4% (Carl Roth GmbH + Co. KG) fixiert und nach dem in Tabelle 28 angegebenen Protokoll im Institut der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf entwässert und in Paraffin eingebettet.

Tabelle 28: Entwässerungsprotokoll der Pathologie

	Formalin	Ethanol						Xylol		Paraffin				
		80%		96%		100%		I	II	I	II	III	IV	
<b>Zeit (min)</b>	60	30	40	30	40	30	40	50	40	60	20	30	40	60

Im Anschluss wurden aus den gekühlten Paraffinblöcken an einem Mikrotom 4  $\mu$ m-dünne Schnitte angefertigt, im 37°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Superfrost® Objektträger (Thermo Scientific, USA) aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht auf einer Wärmeplatte. Vor den histologischen Färbungen wurden die Schnitte mit dem in Tabelle 29 dargestellten Protokoll in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Nach den spezifischen Färbungen (vgl. Abschnitt 2.2.17) wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und einem finalen Xylol-Bad wieder dehydriert und mit Entellan® (Merck GKAA) eingedeckt. Die fertig prozessierten Schnitte wurden über Nacht unter einem Abzug abgedampft und danach mikroskopiert.

Tabelle 29: Protokoll zur Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydratation von Paraffinschnitten

	Entparaffinierung und Rehydrierung						Dehydratation				
	Xylol	Ethanol				VE-H <sub>2</sub> O	Ethanol				Xylol
		100%	90%	70%	50%		50%	70%	90%	100%	
<b>Zeit (min)</b>	3 x 4	4	4	4	4	4	Dippen	1	2	2	3 x 4

## 2.2.17. Immunhistochemie

### 2.2.17.1. Alcianblau-Hämatoxylin-Färbung

Zur Färbung der intestinalen Muzine und Glykosaminoglykanen auf Kolon-Gewebeschnitten wurde die Alcianblau-Färbung angewendet. Dazu wurden die Schnitte nach der Rehydrierung für 5 Minuten in einer *Alcian-blue staining solution* (1% Alcianblau, 3% Essigsäure, pH 2,5 von Sigma-Aldrich) inkubiert und 4 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach folgte ein kurzes Waschen in VE-Wasser und eine Gegenfärbung der Zellkerne in Hämatoxylin für 10 Minuten. Zuletzt wurden die Schnitte für 10 Minuten in laufendem Leitungswasser gebläut, wie in Tabelle 29 beschrieben dehydriert und mit Entellan® eingedeckt (Lang, 2013).

### 2.2.17.2. Ki67-Färbung

Die immunhistochemische Färbung für HMGB1 und Ki-67 wurde analog zu der nachfolgenden beschriebenen BrdU-Färbung durchgeführt. Es wurden je 100 µl anti-HMGB1 Antikörper bzw. Ki-67 (vgl. Tabelle 30) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der *anti-rabbit HRP labeled conjugate* (Dako) genutzt. Die DAB-Arbeitslösung wurde für je 1 Minute auf den Schnitten inkubiert. Die Gegenfärbung in Hämatoxylin betrug 10 Minuten und das Bläuen in Leitungswasser 15 Minuten.

### 2.2.17.3. BrdU-Färbung

Das 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) wurde nach Herstellerangaben in sterilem PBS zu einer 10 mg/ml Lösung verdünnt. Den Versuchstieren wurde 100 mg/kg der BrdU-Lösung intraperitoneal injiziert. Nach einer Wartezeit von mindestens 8 Wochen und täglicher Überwachung wurden die Mäuse wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben sakrifiziert. Das Kolon-Gewebe wurde wie in Abschnitt 2.2.16 dargestellt für die Immunhistochemie prozessiert.

Nach der Entparaffinierung und Rehydratation (vgl. Tabelle 29) wurden die Schnitte für eine Stunde einer 2 molaren HCl-Lösung inkubiert und in PBS gewaschen. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte 20 Minuten in Citrat-Puffer gekocht und nach dem Abkühlen in PBS-T gewaschen. Danach wurden die Schnitte in Peroxidase-Blocking-Lösung (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol) für 10 Minuten bei RT inkubiert und 3 x 2 Minuten in PBS-T gespült. Die Gewebeproben wurden mit einem DAKOPen umrandet und jeweils mit 1-2 Tropfen *Blocking Solution* (Dako) bedeckt und für eine Stunde in der Feuchtekammer bei RT inkubiert. Der anti-BrdU Primärantikörper (*rat monoclonal to BrdU*) wurde in *antibody-Diluent* (Dako) verdünnt (vgl. Tabelle 30) und über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte 3x 2 Minuten in PBS-T gewaschen und der verdünnte *Rabbit anti-rat IgG* Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 31) auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation bei RT erfolgte wieder der Waschschrift in PBS-T. Daraufhin erfolgte der Serumblock der Schnitte in je 100 µl 2% Ziegenserum (Dako) in PBS für 10 Minuten bei RT. Die Blocklösung wurde abgekippt und je 1-2 Tropfen des Tertiärantikörpers (*anti-rabbit HRP labeled conjugate*, Dako) auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Inkubation in der Feuchtekammer bei RT wurden die Schnitte wie oben genannt gewaschen. Im Anschluss wurde die DAB (3,3'Diaminobenzidine) Arbeitslösung aus 1 ml DAB (Dako) und einem Tropfen DAB Chromogen (Dako) hergestellt, gevortext und lichtgeschützt gelagert. Jeder Schnitt eines Experimentes wurde dann für eine feste Zeit (i. d. R. für 30 Sekunden) mit der DAB-Lösung behandelt, bis eine bräunliche Färbung sichtbar wurde. Die Farbreaktion wurde mit VEH<sub>2</sub>O gestoppt. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Dehydratation der Schnitte erfolgte, wie in 2.2.17 beschrieben.

Tabelle 30: verwendete Primärantikörper der Immunhistochemie

Antikörper	Gekoppelte Antigene	Artikelnummer & Hersteller	Verdünnung
Anti- BrdU	BU1/75 (ICR1), Rat monoclonal IgG2a	ab6326, Abcam	1:300
HMGB1	rabbit anti-mouse, polyclonal	ab18256, Abcam	1:1000
Ki-67	Rat IgG2a, Clone SolA15	Invitrogen, 14-5698-80	1:1000

Tabelle 31: verwendete Sekundär- und Tertiärantikörper der Immunhistochemie

Antikörper	Gekoppeltes Enzym	Artikelnummer & Hersteller	Verdünnung
Rabbit anti-rat IgG (H+L)	HRP-conjugated	61-9520, Thermo Fisher	1:200
Anti-rabbit Dako Envision labelled polymer	HRP-conjugated	Dako	Ready to use

### 2.2.18. Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Mikroskop BZ-9000 Bioevo (Keyence, Japan) aufgenommen. Vor jeder Sitzung wurde der Weißabgleich am Mikroskop durchgeführt. In der Regel wurden 10- und 20-fache Vergrößerungen aufgenommen. Zur Berechnung und Einfügen der Größenskala sowie der Erhöhung des Kontrastes wurde das Programm *ImageJ* verwendet.

### 2.2.19. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Aus den gewonnenen Mausseren (vgl. Abschnitt 2.2.5) wurden verschiedene ELISA gemessen. Die inflammatorischen Marker IL-6, IL-1b und Tnf- $\alpha$  wurden mit murinen *DuoSet™ ELISA*-Kits (R&D Systems, USA) nach Herstelleranweisung durchgeführt. Die Proben und Standardverdünnungen wurden bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm gemessen. Der Mouse Zonulin ELISA (MyBiosource, USA), der *Mouse Fabp2* ELISA (Boster Biological Technology, USA) und das ELISA Kit for *Amiloride Binding Protein 1* (antibodies-online™ GmbH, Deutschland) wurden bei 450 nm ausgelesen.

Alle ELISA wurden in 96-Well-Platten pipettiert, mit dem *Microplate Strip Washer* (BioTek Instruments, Inc. USA) automatisch nach Herstellerangabe gewaschen und mit dem *Infinite® F50 Mikroplatten-Reader* (Tecan Trading AG, Schweiz) ausgelesen. Die Berechnung der jeweiligen Konzentration erfolgte anhand der Standardkurve.

### 2.2.20. Proteome-Profiler

Um die relativen Level 37 verschiedener Protein-Phosphorylierungen zeitgleich zu bestimmen, wurde das *Proteome Profiler Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde jeweils 600  $\mu$ g Protein-Lysat auf die Nitrocellulose Membran aufgetragen. Die Auswertung der relativen Menge an phosphorylierten Kinase-Proteinen erfolgte mit *ImageJ*. Zur Berechnung der Pixeldichte wurde der Mittelwert der Duplikate unter Abzug des Hintergrundsignals verwendet.

### 2.2.21. Zellkultur

MC38-Zellen und intestinale Organoide wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Standardmäßig wurde in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit 10% FCS und 5 % Penicillin-Streptomycin als Kulturmedium verwendet. Das Medium der MC38-Zellen wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen bei ca. 80% Konfluenz gesplittet. Die Stimulation der MC38-Zellen erfolgte in DMEM ohne FCS in konfluenten 6-Wells mit 1 µg/ml disulfid-, reduziertem HMGB1 oder LPS über 24 Stunden. Danach erfolgte die Ernte der Zellen und Protein- oder RNA-Isolation.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Tote Zellen werden dabei bläulich angefärbt, da es durch defekte Zellmembranen ins Zellinnere eindringen kann. Es wurden jeweils vier Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \left( \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Quadrate}} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen [ml]} \times 10^4$$

### 2.2.22. CRISPR-Cas9 Knockout des *Hmgb1*-Gens in MC38-Zellen

Die MC38-Zelllinie ist ein etabliertes und gut charakterisierte Modell für die Untersuchung kolorektaler Adenokarzinome (Juneja et al., 2017). Durch die Verwendung der CRISPR-Cas9-Technologie wurde, wie nachfolgend beschrieben, *Hmgb1* aus den Zellen deletiert (Jinek et al., 2012). Das Vektor-Konstrukt wurde freundlicherweise von Irke Wassmann aus der AG Brune (Leibniz-Institut für Virologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Verwendet wurde der lentivirale pSicoR-CRISPR-Cas9 Vektor (RP-418). Dieser enthält einen EF1a-Promotor, der die Expression eines Puromycin-Resistenzgens (*puroR*) bewirkt und mit dem Cas9-Gen von *Streptococcus pyogenes* fusioniert ist.

Zur Transduktion wurden je 3x10<sup>5</sup> MC38-Zellen in 6-Wells ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit 3,5 ml Lentivirus-Überstand (HEK293T), welcher das Guide-RNA-Vektor-Konstrukt oder eine leere Vektor-Kontrolle enthielt. Die 6-Well-Platte wurde bei 1000 x g für 30 Minuten bei 37°C zentrifugiert und das Infektionsmedium mit DMEM 10% FCS ausgetauscht. Der Transduktionsschritt wurde am Folgetag mit frisch aufgetautem Lentivirus-Überstand (HEK293T) wiederholt. Zur Selektion transduzierter Zellen wurden die Zellen von 6-Wells in T25-Zellkulturflaschen transferiert und in DMEM 10% FCS mit 2 µg/ml Puromycin (Thermo Scientific™,

USA) bis zur Konfluenz kultiviert und in T75-Zellkulturflaschen expandiert. Sobald die Konfluenz erreicht war, wurde ein *Single Clone Assay* durchgeführt.

Dazu wurden  $3 \times 10^4$  Zellen in das erste Well einer 96-Well-Platte pipettiert und seriell in der ersten Spalte und anschließend horizontal je 1:2 auf der gesamten Platte verdünnt. Das finale Volumen betrug 200  $\mu$ l DMEM 10% FCS je Well. Die Zellkulturplatten wurden regelmäßig auf Einzelzellen oder Einzelkolonien untersucht. Diese wurden gepickt und in größeren Wells stetig expandiert, bis genug Material für eine Proteinisolation vorhanden war. Mit Westernblots (vgl. 2.2.14) wurden die Klone auf eine effektive HMGB1-Defizienz untersucht und für die weiteren Experimente verwendet.

Tabelle 32: Sequenzen der Guide-RNA (gRNA) zum CRISPR-Cas9-Knockout von *Hmgb1*

<b>Oligo Sequenz gRNA</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
GAGAAGGTAAGGAGGATGACNNG	ACCGAGAAGGTAAGGAGGATGAC	AAACGTCATCCTCCTTACCTTCT

### 2.2.23. Scratch-Assay

Die Scratch-Assays wurden auf Basis eines etablierten Protokolls (Liang et al., 2007) durchgeführt. Dazu wurden MC38-Zellen bis zur Konfluenz in 12-Well-Platten in DMEM 10% FCS bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Mit einer sterilen P200-Pipettenspitze wurde in einer geraden Linie ein Kratzer in den Zell-Monolayer gesetzt. Der entstandene Zelldebris wurde mit sterilem PBS beseitigt und mit DMEM 2% FCS ersetzt. Die Fläche wurde über eine Periode von 24 Stunden unter einem Phasenkontrast-Mikroskop fotografiert. Die Distanz beider Fronten wurden mit *ImageJ* vermessen. Für jedes Experiment wurden mindestens 100x Abstandsmessungen vorgenommen und jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt. In einigen Experimenten wurde Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich) zugesetzt, um die Proliferation zu unterdrücken.

### 2.2.24. Transendothelialer Permeabilitäts-Assay

Zur Untersuchung des Einflusses von HMGB1 auf die Permeabilität wurde ein transendothelialer Permeabilitäts-Assay nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Ni et al., 2017). MC38-Wildtyp und MC38-HMGB1-Knockout (HMGB1  $-/-$ ) Zellen wurden in 24-Well-Platten mit Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von 3,0  $\mu$ m (Fisher Scientific, 353096) bis zur Konfluenz in DMEM 10% FCS mit Penicillin-Streptomycin kultiviert. Jeder Transwell Einsatz wurde einmal mit HBSS

gewaschen und in eine frische 24-Well-Platte übertragen. Dann wurden 200 µl HBSS mit 1 µg/ml FITC-Dextran in die obere und 600 µl HBSS in die untere Kammer pipettiert. Die 24-Well-Platte mit Transwell-Einsätzen wurde über 6 Stunden lang bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> unter leichtem Schütteln inkubiert. Jede Stunde wurde eine Probe zur späteren Messung entnommen und bei 4°C im dunklen gelagert. Die Konzentration des in die untere Kammer übertragenen FITC-Dextrans wurde mit einem Mikroplatten-Lesegerät (Infinite® F50 Mikroplatten Reader, Tecan) mit Anregungs- und Emissionswellenlängen von 492 nm bzw. 520 nm gemessen. Als Standardkurve diente eine selbst angesetzte Standardreihe bekannter FITC-Dextran-Konzentrationen. In Voruntersuchungen wurde ausgeschlossen, dass die verwendete Konzentration an FITC-Dextran toxische Effekte auf die Zellen hat. Die Permeations-Rate wurde mit folgender Formel berechnet (vgl. (Ni et al., 2017)):

$$\frac{\text{FD4 basolateral (t = 6h) } [\mu\text{g}]}{\text{FD4 apical (t = 0h) } [\mu\text{g}]}$$

## 2.3. Intestinale Organoide

### 2.3.1. Isolation und Kultur intestinaler Organoide

Durch Fortschritte in der Stammzellforschung unter maßgeblicher Beteiligung von Clevers und Sato ist es gelungen, intestinale epitheliale Stammzellen als Organoide zu kultivieren (Sato et al., 2009). Unter gewissen Kulturbedingungen können Lgr5+ intestinale Stammzellen oder ganze Krypten effizient in 3D-Strukturen kultiviert werden. Intestinale Organoide werden in einer Laminin- und Collagenreichen künstlichen extrazellulären Matrix, dem Matrigel, kultiviert. Das Kulturmedium beinhaltet spezifische Wachstumsfaktoren des *in vivo* vorkommendes intestinales Epithel. Dazu gehören der *epidermal growth factor* (EGF) für die intestinale Proliferation, Bone Morphogenetic Protein (BMP), der Signalinhibitor Noggin zur Expansion der Krypten und der Wnt Antagonist Wnt3a (Mizutani & Clevers, 2020). Um die Anoikis der Organoide zu verhindern, wurde der Rho-kinase-inhibitor (Y-27632) zugegeben. Das Protokoll zur intestinalen Organoid-Isolation und -Kultur wurde in Anlehnung an die Publikation von Mizutani und Clevers (Mizutani & Clevers, 2020) etabliert und ist im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

### 2.3.2. Isolation intestinaler Krypten

Zunächst wurde das Matrigel (Growth Factor reduced & Phenol red free, BD Biosciences, USA) bei 4°C aufgetaut und ein Kolon, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, präpariert. Das Kolon wurde mit DPBS gespült und longitudinal geöffnet. Mit einem Deckglas wurde der luminale Inhalt sowie die

Villi entfernt und das Kolon dreimal mit DPBS in einer Petrischale gewaschen. Das Gewebe wurde anschließend in 10 mm-große Stücke geteilt und in einen Flacon mit 20 ml kaltem DPBS überführt. Mit einer befeuchteten, serologischen 10 ml-Pipette wurden die Kolonstücke mehrmals auf und ab pipettiert und nach deren Absetzen am Boden mit frischem DPBS versetzt. Dieser Waschschrift wurde ca. 10-mal wiederholt, bis der Überstand klar wurde. Die Gewebestücke wurden in je 20 ml *Crypt Isolation Buffer* transferiert und 30 bis 60 Minuten bei 4°C rollend inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gewebestücke in je 10 ml DPBS 10% FCS resuspendiert. Durch kräftiges Schütteln des Falcon wurden die Krypten gelöst und in den Überstand gelöst, dies wurde stets unter dem Mikroskop kontrolliert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, um die Krypten Ausbeute zu erhöhen. Der Überstand wurde durch einen 70 µm-Easystrainer gefiltert und in einem mit FCS-gecoateten Falcon gesammelt. Die Krypten wurden bei 100 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und in 10 ml kaltem Advanced DMEM/F12 (Gibco™, USA) resuspendiert. Zur Entfernung von Einzelzellen wurde wiederholt bei 100 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zuletzt in 10 ml Advanced DMEM/F12 resuspendiert und 25 µl zum Zählen der Krypten unter dem Mikroskop entnommen.

### 2.3.3. Primäre Organoid-Kultur isolierter intestinaler Krypten

Mit einer P200-Pipette wurden ca. 200 isolierte Krypten in 20 µl Matrigel resuspendiert und kuppelförmig auf vorgewärmte 48-Well-Platten platziert. Das Matrigel wurde für 10 Minuten in einem Inkubator (5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C) ausgehärtet. Pro Well wurde 250 µl vorgewärmtes Intesticult™ (Stemcell Technologies, Kanada) hinzugefügt. Um die Anoikis zu verhindern, wurde das Intesticult™ in den ersten beiden Tagen mit 10 µmol/L Y-27632 (Abcam, USA) supplementiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Je nach Wachstumsfortschritt wurden die Organoide nach 5-10 Tagen in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gesplittet.

### 2.3.4. Passagieren intestinaler Organoide

Zum routinemäßigen Passagieren der Organoide wurde das Intesticult™ aus den Wells entfernt, das Matrigel in 500 µl kaltem DPBS gelöst und in einen 15 ml-Falcon überführt. Durch Zugabe von 10 ml kaltem Advanced DMEM/F12 wurde das Matrigel durch sanftes auf und ab pipettieren vollständig gelöst. Die Organoide wurden bei 300 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml kaltem Advanced DMEM/F12 resuspendiert. Um die Dissoziation der Organoide zu erreichen, wurden sie 10–20-mal mit einer Pasteur Pipette auf und

ab pipettiert, bis die Organoide in einzelne Krypten-Fragmente zerfielen. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 Minuten bei 4°C wurde das Pellet in Matrigel resuspendiert und auf einer vorgewärmten Well-Plate ausgehärtet (vgl. Tabelle 33). Die Organoide wurden mit Intesticult™ für 5-7 Tage im Inkubator kultiviert.

Tabelle 33: Matrigel- und Intesticult Volumen der Organoid Kultur

Zellkultur- Platte	Matrigel-Volumen [µl]	Anzahl Tropfen	Matrigel	Intesticult™ Volumen je Well [µl]
48-Well	20-25	1		250
24-Well	40-45	2-3		500
12-Well	100-120	5-7		1000

### 2.3.5. Kryokonservierung intestinaler Organoide

Die Kryokonservierung wurde nach mindestens 2 Passagen an reifen, 7-10 Tage alten Organoiden durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und je 500 µl kaltes Advanced DMEM/F12 in die Wells pipettiert. Die Matrigel-Kultur wurde darin resuspendiert und in einen 15 ml-Falcon überführt. Der Falcon wurde bis 10 ml mit kaltem Advanced DMEM/F12 aufgefüllt und bei 300 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Medium verworfen und das Organoid-Pellet in 500 µl CryoStor™ CS10 (Stemcell, Kanada) resuspendiert. Die Suspension wurde in Cryotubes überführt und über Nacht bei -80°C in CoolCell™ Gefrierbehältern (Corning, Inc, USA) kontrolliert eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Cryotubes zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 2.3.6. DSS-Behandlung intestinaler Organoide im *in vitro* CED-Modell

Durch Behandlung von Organoiden mit DSS wurde ein *in vitro* Organoid-CED-Modell generiert (Rallabandi et al., 2020; Tian et al., 2023). Dazu wurde 500 kDa DSS (Thermo Scientific, USA) in sterilem Intesticult™ Medium gelöst, um eine 0,05 %ige DSS-Lösung herzustellen (Nikolaev et al., 2020). Ausgereifte Organoide wurden in 24-Well-Platten für 24 Stunden mit der DSS-Lösung behandelt. Unbehandelte und mit DSS-behandelte Organoide wurden im Anschluss zur RNA-Isolation und qPCR-Analyse verwendet (vgl. 2.2.9-10) Die Liste der verwendeten *Taqman*™ Sonden ist der Tabelle 24 zu entnehmen.

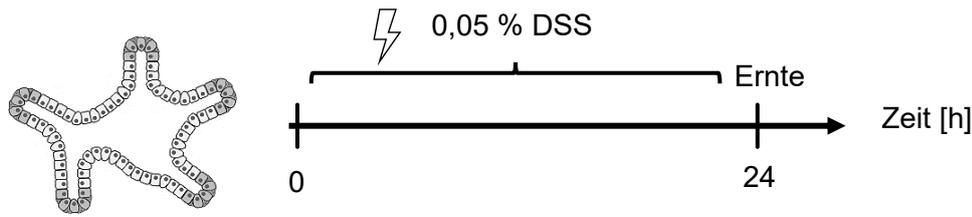


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung des *in vitro* CED-Modells an intestinalen Organoiden.

Reife intestinale Organoide wurden für 24 Stunden mit 0,05 % DSS (500 kDa) behandelt und anschließend geerntet. Das Zellmaterial wurde im Anschluss für RNA- oder Proteinanalysen verwendet.

#### 2.4. Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Software GraphPad Prism 10 (Graphpad Software Inc.) wurden anhand der erhobenen Daten statistische Analysen durchgeführt. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test angewendet, da eine Normalverteilung der Daten u. a. aufgrund der geringen, teilweise gepoolten, Stichprobengröße (i. d. R. kleiner 10) ausgeschlossen werden konnte. Beim Vergleich von 3 oder mehr Gruppen wurde daher der nicht-parametrischer Kruskal- Wallis Test mit anschließendem Dunn's Post- hoc Test verwendet. In den Graphiken wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau der statistischen Analysen wird anhand des p-Wertes wie folgt angegeben:

p-Wert > 0,05: ns (nicht signifikant); p<0,05: \*; p<0,01: \*\*; p<0,001: \*\*\*; p<0,0001: \*\*\*\*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vorarbeiten

Die vorliegende Arbeit schließt thematisch und experimentell an die bereits veröffentlichte Thesis von Katharina Fölsch an (Fölsch, 2021). In Anbetracht des Zusammenhangs zwischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und einem damit einhergehenden erhöhten Risiko, an kolorektalem Krebs zu erkranken, wurde in Mausmodellen sowohl die spontane als auch die durch entzündliche Prozesse ausgelöste kolorektale Karzinogenese in Abhängigkeit von epithelialen und myeloiden HMGB1-Defizienzen untersucht. Dabei wurde im *ApcMin* Modell der spontanen Karzinogenese eine erhöhte Tumorlast im Zusammenhang mit einer epithelialen HMGB1-Defizienz nachgewiesen. Demgegenüber führte eine myeloide HMGB1-Defizienz zu einer unveränderten Tumorentwicklung und -wachstum im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Kombination aus Azoxymethan (AOM) mit einer anschließenden wiederholten DSS-Behandlung zur Nachahmung der Colitis-assoziierten Karzinogenese führte zu einer verringerten Tumorlast in myeloiden HMGB1-defizienten Versuchstieren, während eine epitheliale HMGB1-Defizienz keinen Einfluss auf die Tumorgenese hatte (vgl. auch Abschnitt 1.6). In der Thesis konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine genetische HMGB1-Defizienz in intestinalen Epithelzellen aus *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* zu einem schwereren Krankheitsverlauf während der murinen DSS-induzierten Colitis führt. *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäuse wiesen im Vergleich zu *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* eine stärkere Gewebsschädigung, einen höheren Gewichtsverlust und eine erhöhte Genexpression pro-inflammatorischer Gene im Kolongewebe auf. RNA-Sequenzierungsanalysen deuteten darauf hin, dass die Zellzyklusaktivität in epithelialen HMGB1-defizienten Mäusen verändert ist. Im Kontrast dazu konnten im DSS-Modell keine Auswirkungen einer myeloiden HMGB1-Defizienz auf den Verlauf der Colitis, der Expression immunmodulierender Gene sowie der Infiltration von Immunzellen nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, den beschriebenen epithelialen Phänotyp weiter zu charakterisieren und den HMGB1-abhängigen und zellspezifischen Pathomechanismus der DSS-Colitis experimentell näher zu untersuchen.

#### 3.2. Der Einfluss des epithelialen HMGB1-Knockouts in der murinen DSS-induzierten Colitis

Mit Hilfe des DSS-Modells wurde eine akute Colitis in *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* (WT) und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* (KO) Mäusen hervorgerufen. Dazu wurde den Versuchstieren 1.5 % DSS m/V (36-50kDa) im Trinkwasser für

einen Zeitraum von 7 Tagen verabreicht und an Tag 8 wieder auf reguläres Trinkwasser umgestellt (vgl. Abschnitt 2.2.4). Die Veränderung des Gewichtes diente in diesem Modell als etablierter Parameter für den Schweregrad der intestinalen Entzündung. Anhand der Gewichtskurve (vgl. Abb. 8A) war zu erkennen, dass Wurfgeschwister beider Genotypen aus den unbehandelten Kontrollgruppen über den Zeitraum an Gewicht zunahm (+4% bezogen auf das Ausgangsgewicht). Bis zum Tag vier unterschieden sich die prozentualen Gewichtsveränderungen beider Genotypen unter DSS-Behandlung nicht signifikant. Ab Tag 5 zeigte sich jedoch, dass *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäuse einen signifikant höheren Gewichtsverlust aufwiesen als die Gruppe der *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* Mäuse (Tag 5: p=0,0074; Tag 6: p=0,005; Tag 7: p= 0,0067). Als ein zusätzlicher Parameter für den Schweregrad der intestinalen Entzündung diente im DSS-Modell die Verkürzung des Kolons. In Abbildung 8 B ist die Kolonlänge der verschiedenen Gruppen an Tag 8 nach Versuchsende dargestellt (*Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Wasser= 9,2 cm, *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>*= 8,5 cm, *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*= 7,7 cm). Die Länge des Kolons bei *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen war mit einer gemittelten Differenz von 1,7 cm signifikant stärker verkürzt (p=0,035) als bei den *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* Mäusen.

Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der Entzündungsmarker Interleukin 1β (IL-1β), Tumornekrosefaktor α (Tnf-α) und Interleukin 6 (IL-6) per ELISA im Serum der Versuchstiere gemessen (vgl. Abb. 8 C bis 8 E). Bei allen drei Parametern unterschieden sich die gemessenen Proteinkonzentrationen in der Kontrollgruppe (Wasser) oder an Tag 4 nach DSS-Behandlung nicht signifikant zwischen *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*. An Tag 7 nach der DSS-Gabe zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentrationen der Entzündungsmarker in der *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Gruppe im Vergleich zu *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* (IL-1β: p=<0,041; Tnf-α: p= 0,006; IL-6: p=0,04). Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass eine HMGB1-Defizienz in Epithelzellen den Krankheitsverlauf einer chemisch induzierten DSS-Colitis verschlimmert.

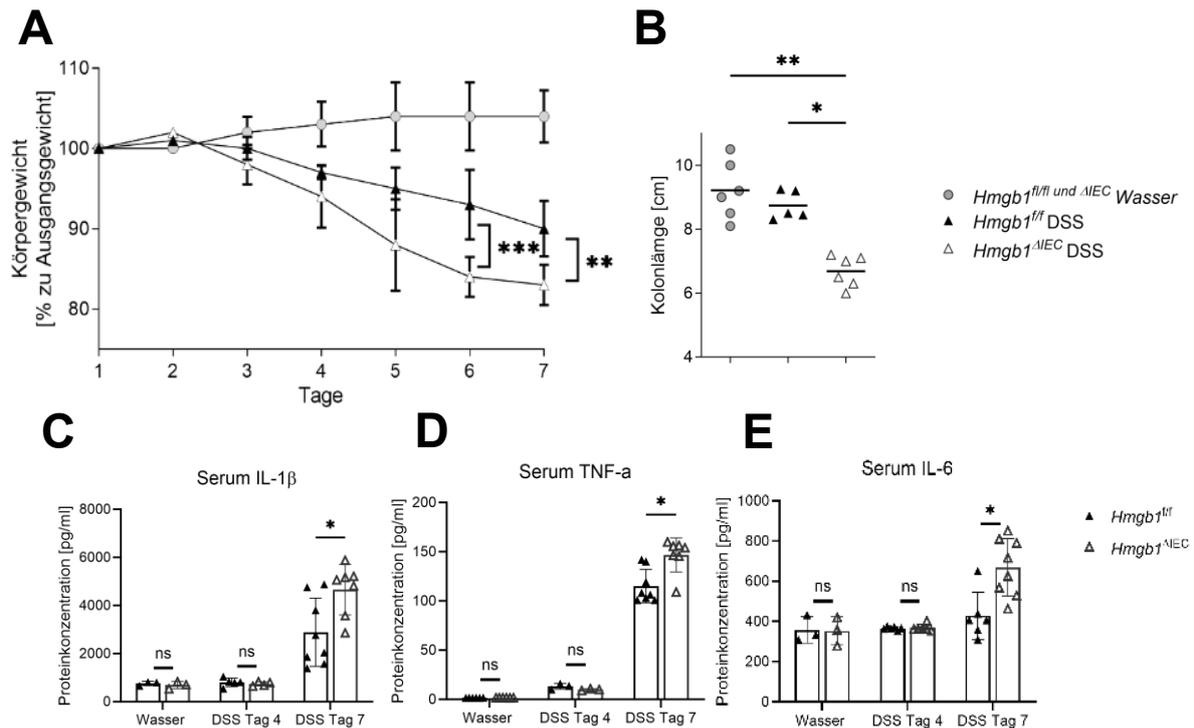


Abbildung 8: Der Einfluss des epithelialen HMGB1-Knockouts in der murinen DSS-induzierten Colitis.

*Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* (WT) und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* (KO) Mäuse wurden 7 Tage mit 1.5 % DSS m/V im Trinkwasser behandelt, um eine DSS-induzierte Colitis auszulösen. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Wurfgeschwister beider Genotypen. A) Gewichtskurve aller getesteter Gruppen über 7 Tage; B) gemessene Kolonlängen aller Versuchsgruppen an Tag 8 nach Versuchsende; C) bis E) Serum-ELISA der proinflammatorischen Marker IL-1 $\beta$ , Tnf- $\alpha$  und IL-6 an Tag 4 und Tag 7 der DSS-Behandlung sowie der unbehandelten Kontrollgruppe. ns= nicht signifikant.

Zur genaueren Untersuchung der Gewebestruktur und der Mucinschicht unter Einfluss von DSS wurde eine Alcianblau-Hämatoxylin-Färbung an Paraffinschnitten durchgeführt. Hierbei werden saure Mucine und Glykoproteine tiefblau und Zellkerne rötlich eingefärbt. In den repräsentativen Aufnahmen der unbehandelten *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Gewebeproben war die Krypten- und Zottenstruktur anhand der Kolonquerschnitte eindeutig zu erkennen. Die äußere Mucinschicht war gleichermaßen intakt. Auch an Tag 4 nach DSS-Behandlung war die Gewebestruktur beider Genotypen noch vergleichbar. Nach 7 Tagen DSS-Gabe waren die Krypten bei beiden Genotypen deutlich aufgelöst und das Epithel stark verdickt. Während bei *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* noch vereinzelte Krypten erkennbar waren, waren diese bei *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* durch den schwereren Colitis-Verlauf nahezu aufgelöst.

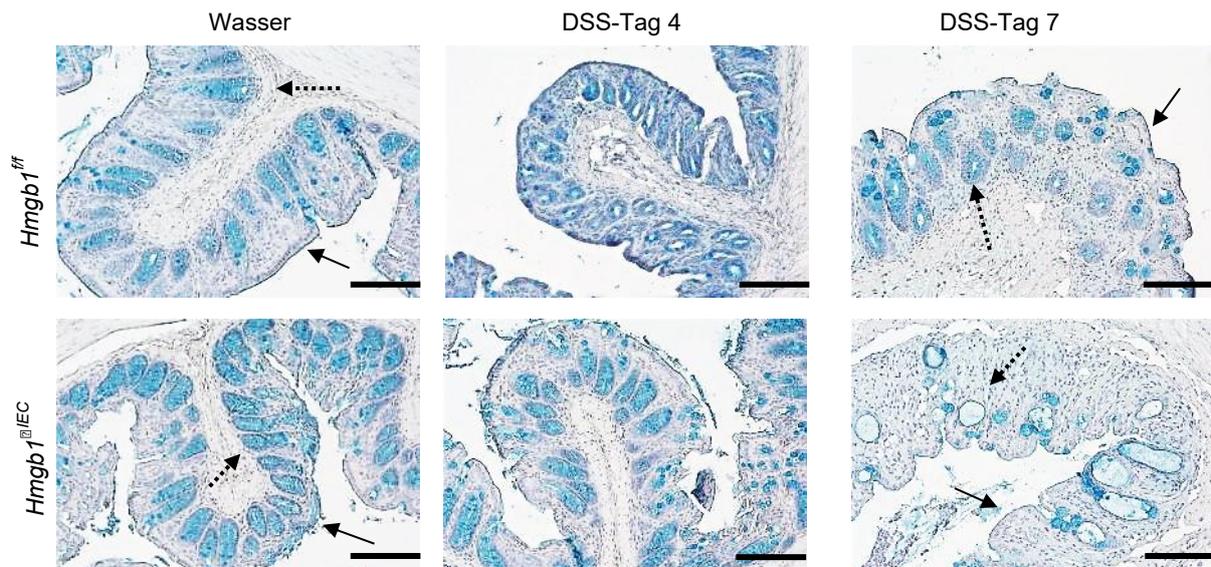


Abbildung 9: Gewebestruktur der Mukosa nach induzierter DSS-Colitis bei *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen.

Alcianblau-Hämatoxylin-Färbung muriner Kolonquerschnitte unbehandelter und für 4 oder 7 Tage DSS-behandelter *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäuse. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Gepunkteter Pfeil: Goblet-Zellen und transmembrane Mucinschicht; gerader Pfeil: äußere Mucinschicht. Skalierung: 100  $\mu$ m.

### 3.3. Der Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Proliferation von Epithelzellen

Um zu untersuchen, ob in den epithelialen HMGB1-defizienten Mäusen Probleme bei der Zellproliferation vorliegen, die sich auf eine veränderte Regeneration des Darmepithels unter Einfluss von DSS auswirken können, wurde eine immunhistochemische Ki-67- und BrdU-Färbung an Kolonquerschnitten von *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen durchgeführt. Dabei wurde die Zellproliferation in intestinalen Krypten der Wasser-Kontrollgruppe beider Genotypen mit der an Tag 4, direkt bevor der phänotypische schwerere Zellschaden bei *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* auftrat, nach DSS-Gabe verglichen (vgl. Abb. 9). Ki-67 und BrdU sind gut untersuchte Marker der Proliferation im Darm. Während Ki-67 als nukleäres Protein in sich teilenden Zellen während des gesamten mitotischen Prozesses (G1, S, G2, M Phase, nicht in G0) exprimiert wird, kann BrdU als Thymidin Analog nur in der S-Phase neu synthetisierter DNA in sich aktiv teilenden Zellen eingebaut werden (Eminaga et al., 2016; Kee et al., 2002; Parker et al., 2017). Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, unterschieden sich der Anteil Ki-67+ Zellen weder in der Kontrollgruppe noch an DSS-Tag 4 zwischen den untersuchten Genotypen. Auch bei der Quantifikation BrdU+ Zellen zwischen den gleichen Gruppen und Genotypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 10C und 10D). An DSS-Tag 7 war keine Auswertung der Proliferationsmarker Ki-67 und BrdU möglich, da die Krypten durch die DSS-induzierte Colitis und zunehmender Entzündung bereits zu stark

aufgelöst waren. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die HMGB1-Defizienz der Epithelzellen die Proliferationskapazität der intestinalen Mukosa nicht beeinflusst.

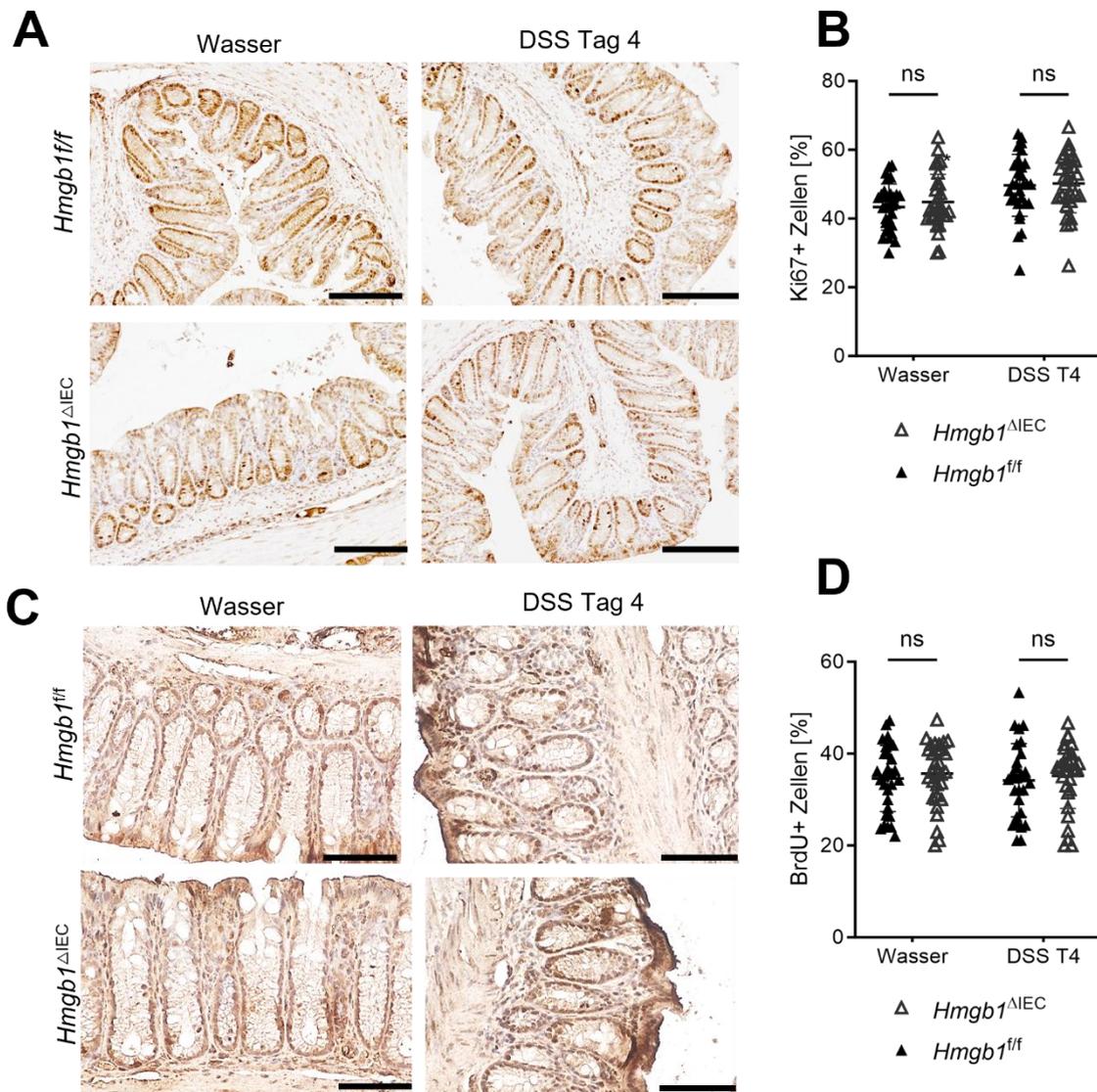


Abbildung 10: Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Ki-67- und BrdU-positive Zellen intestinaler Krypten.

In *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* wurde durch die Gabe von DSS im Trinkwasser eine Colitis ausgelöst. A) Ki-67 immunhistochemische Färbung an Kolonquerschnitten von *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Wasser Kontrolle vs. DSS-Tag 4; B) Quantifizierung Ki-67-positiver Zellen je Krypte in Prozent; C) BrdU-immunhistochemische Färbung an Kolonquerschnitten von *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Wasser Kontrolle vs. DSS-Tag 4; D) Quantifizierung BrdU-positiver Zellen je Krypte in Prozent. Skalierung: A) 100 µm; C) 50 µm. ns= nicht signifikant

### 3.4. Der Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Apoptose, Proliferation und Autophagie

Da eine Störung der Proliferation in HMGB1 defizienten Epithelzellen als Ursache für den schwereren Colitisverlauf in *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> ausgeschlossen werden konnte, wurden im nächsten Schritt mögliche Störungen in der Autophagie und Apoptose untersucht. Dies geschah insbesondere vor dem Hintergrund, dass HMGB1 wiederholt mit Autophagie und Apoptose in Verbindung gebracht wird, wie auch von Zhu et al. dargelegt (Zhu et al., 2015). Dazu wurden Westernblots mit Protein-Lysaten von Kolon-Gesamtgewebe aus *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> oder *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> aus Kontroll- und 7-Tage-DSS-behandelter Gruppen angefertigt. Die Autophagie dient als lebenswichtiger Stoffwechselprozess dem Abbau und Recycling langlebiger oder fehlgefalteter Proteine und Organellen durch das Lysosom (Dikic & Elazar, 2018). Erkrankungen wie CED gehen häufig mit einer Störung der epithelialen Barriere einher. Im Darm spielen autophagische Prozesse eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Darmbarriereintegrität und der Regulation des Immunsystems. Es ist bekannt, dass eine Störung der Autophagie mit der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen einhergehen kann (Hooper et al., 2019; Jin et al., 2024).

Zur Analyse der Autophagie wurden die Markerproteine *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (LC3) und *se-questosome 1* (p62) gefärbt. LC3 ist ein lösliches Protein, welches während der Autophagie von seiner zytosolischen LC3-I Form durch das Lysosom und Autophagosomen in LC3-II umgewandelt wird. Durch die Analyse der Konversionsrate von LC3-I zu LC3-II kann die Autophagie untersucht werden, da die Menge von LC3-II mit der Menge der Autophagosomen korreliert (Mizushima & Yoshimori, 2007; Tanida et al., 2008). Im Westernblot (vgl. Abb. 11 A) konnte kein signifikanter Unterschied des LC3-II/LC3-I Verhältnisses auf Proteinebene zwischen den Genotypen in den Wasserkontrollen oder an Tag 7 der DSS-Behandlung dokumentiert werden. Ein weiterer nützlicher Indikator zur Bestimmung der Autophagie-Aktivität ist das multifunktionelle Adaptor- und Autophagosomen-Frachtprotein p62 (Bjorkoy et al., 2005). Da sich p62 anreichert, wenn die Autophagie gehemmt wird, und die Menge von p62 sinkt, wenn die Autophagie induziert wird, kann p62 als Marker zur Untersuchung des Autophagie Prozesses verwendet werden (Bjorkoy et al., 2009; Kumar et al., 2022). Auch für diesen Marker konnte in den untersuchten Protein-Lysaten keine Signifikanz zwischen den Genotypen in der Wasserkontrollgruppe oder nach 7 Tagen DSS-Behandlung festgestellt werden (vgl. Abb. 11 A). Die Defizienz von Epithelialem HMGB1 zeigt also keinen Einfluss auf Autophagie-Prozesse im Darm.

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm ist die Apoptose. Eine gestörte Apoptose, wie sie bei CED auftritt, kann zu einer Störung des

Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Zelltod von Darmepithelzellen und zu Defekten der intestinalen Barriere führen (Blander, 2018; Zhang et al., 2021). Zur Analyse der Apoptose-Aktivität auf Proteinebene wurden die Marker Caspase-3 und cleaved-Caspase-3 im Westernblot untersucht. Caspasen spielen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Apoptose (Zhou et al., 2018). Innerhalb dieser Enzymfamilie ist Caspase-3 für die Initiierung und Durchführung des geordneten Zellabbaus verantwortlich. Nach der Aktivierung durch Initiator Caspasen wird Caspase-3 proteolytisch gespalten, wodurch die aktive Form des cleaved-Caspase-3 entsteht, die weitere kritische Proteine in der Zelle spaltet und schließlich zur Apoptose führt (Galluzzi et al., 2016). Für die Proteinmenge der inaktiven Form Caspase-3 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen in den Wasser-Proben oder Tag 7 der DSS-Proben im Kolon gemessen werden. Auch für die aktive cleaved-Caspase-3 zeigt sich kein Unterschied in der Proteinmenge zwischen den untersuchten Genotypen in der Wasser- bzw. DSS-behandelten Gruppe. Auffallend war, dass die Menge der inaktiven Caspase-3 in der Kontrollgruppe höher lag als unter DSS-Behandlung (vgl. Abb. 11). Zur Überprüfung der Westernblot-Daten wurde auf RNA-Ebene die Expression von *Caspase-3* und der Initiator *Caspase-9* der gleichen Gruppen und Genotypen im Kolongewebe überprüft. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* oder *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurde durch die Messung des Proliferationsmarkers *Proliferating cell nuclear Antigen* (PCNA) zudem die Hypothese aus Abschnitt 3.3 bestätigt, dass die HMGB1-Defizienz keinen Einfluss auf die Proliferation des Darmepithels hat. Zusammenfassend ließ sich anhand der Daten schlussfolgern, dass die intestinale epitheliale HMGB1-Defizienz im gezeigten Mausmodell keinen Einfluss auf die Authophagie- oder Apoptoseaktivität unter *steady state*-Bedingungen oder nach 7 Tagen DSS-Behandlung hatte.

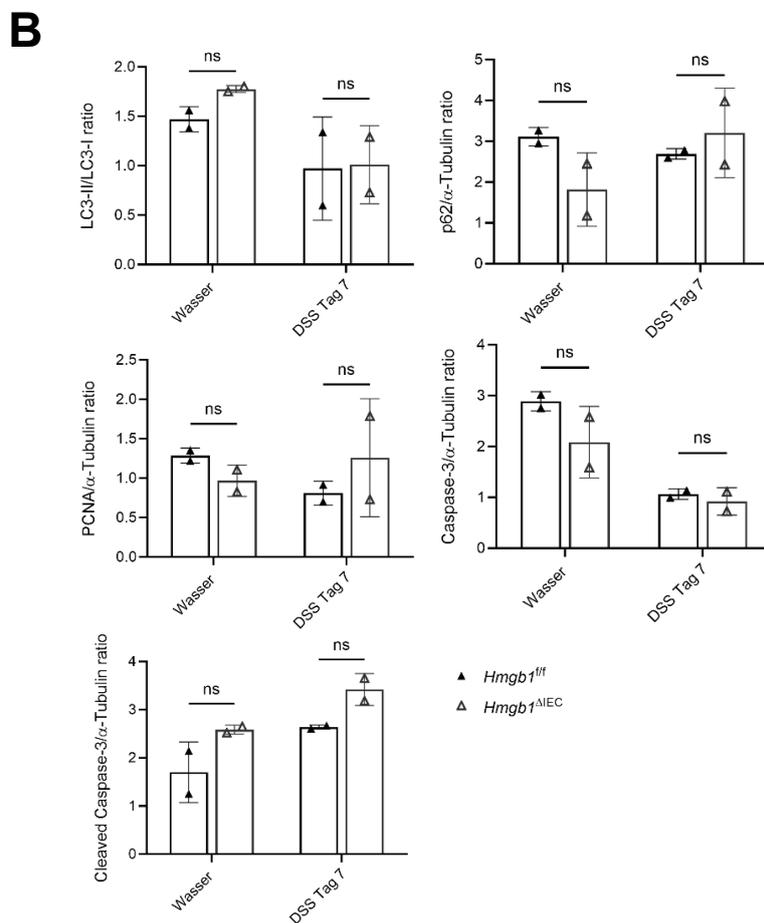
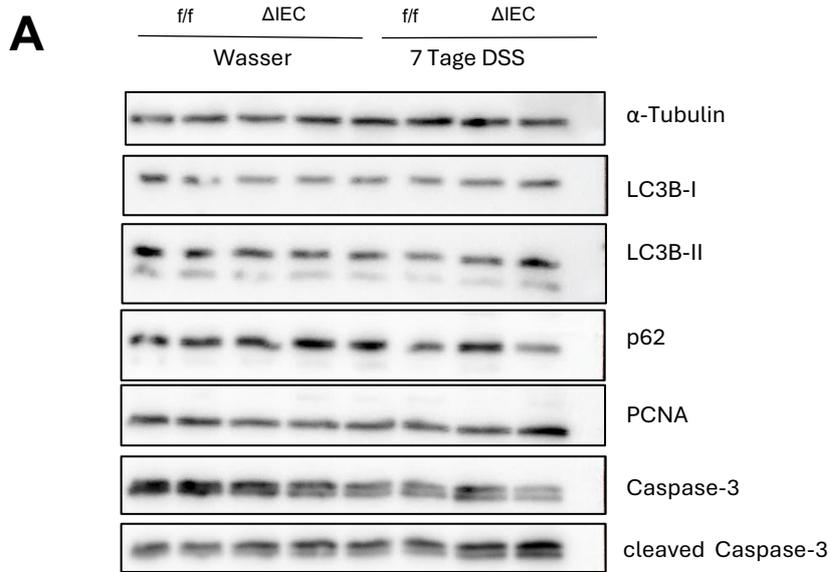


Abbildung 11: Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf Marker-Proteine der Apoptose, Proliferation und Autophagie.

Aus Kolongewebe von *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1 <sup>$\Delta$ IEC</sup>* wurden Proteine nach 7 Tagen DSS-Behandlung oder der Wasser-Kontrollgruppe isoliert und im Westernblot analysiert. A) Färbung der Markerproteine LC3B-I, LC3B-II, p62, PCNA, Caspase-3 und cleaved-Caspase-3,  $\alpha$ -Tubulin dient als Housekeeper. N=2 je Gruppe; B) Quantifizierung der Marker-Proteine LC3B-I, LC3B-II, p62, PCNA, Caspase-3 und cleaved-Caspase-3 mit Normalisierung auf  $\alpha$ -Tubulin, Quantifizierung von LC3I als Verhältnis von LC3I zu LC3II. ns= nicht signifikant.

### 3.5. Etablierung einer intestinalen Organoid-Zellkultur mit effektiver HMGB1-Deletion aus *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup>

Um *in vitro* zu untersuchen, warum eine epitheliale HMGB1-Defizienz im murinen DSS-Colitis Modell zu einem schwereren Verlauf führt, wurde eine intestinale 3D-Organoid-Zellkultur etabliert. Dafür wurden intestinale Stammzellen aus frisch isolierten Krypten von Kolonstücken unbehandelter *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> und *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> Mäuse isoliert. Die Krypten wurden in Matrigel und unter dem Zusatz von spezifischen Wachstumsfaktoren wie EGF und BMP, dem Signal Inhibitor Noggin sowie dem Wnt Agonisten von Lgr5 R-spondin1 kultiviert. Dadurch wuchsen die Zellen schnell und effizient in sphärische 3D-Strukturen und ähneln morphologisch wie funktionell intestinaler Krypten- und Zotten Strukturen (vgl. 2.2.23) In den folgenden Versuchen wurden die intestinalen Organoide verwendet, um die Stammzellfunktion, die Zell-Differenzierung, Proliferation und den Einfluss von DSS in An- und Abwesenheit von HMGB1 (*Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> oder *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup>) zu untersuchen.

Zunächst wurden intestinale Organoide aus mehreren *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> und *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> Mäusen isoliert, expandiert und die Menge an HMGB1 auf Proteinebene via Westernblot bestimmt. In Abbildung 12 C und D wird die effektive HMGB1-Deletion in *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> Organoiden im Vergleich zu *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> deutlich. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des Organoid-Wachstums beider Genotypen, fielen keine morphologischen Unterschiede zwischen Tag 1 und 8 auf. In den Phasenkontrastaufnahmen (vgl. Abb. 12 A) erkannte man anhand der granulohaltigen Strukturen an Tag 2 bis 8 Paneth Zellen. Das dunkler werdende Lumen beider Organoid Genotypen deutete ab Tag 7 auf das Voranschreiten apoptotischer Prozesse hin. Bis Tag 7 bildeten sich bei Organoiden beider Genotypen die für intestinale Organoide typischen Fortsätze aus.

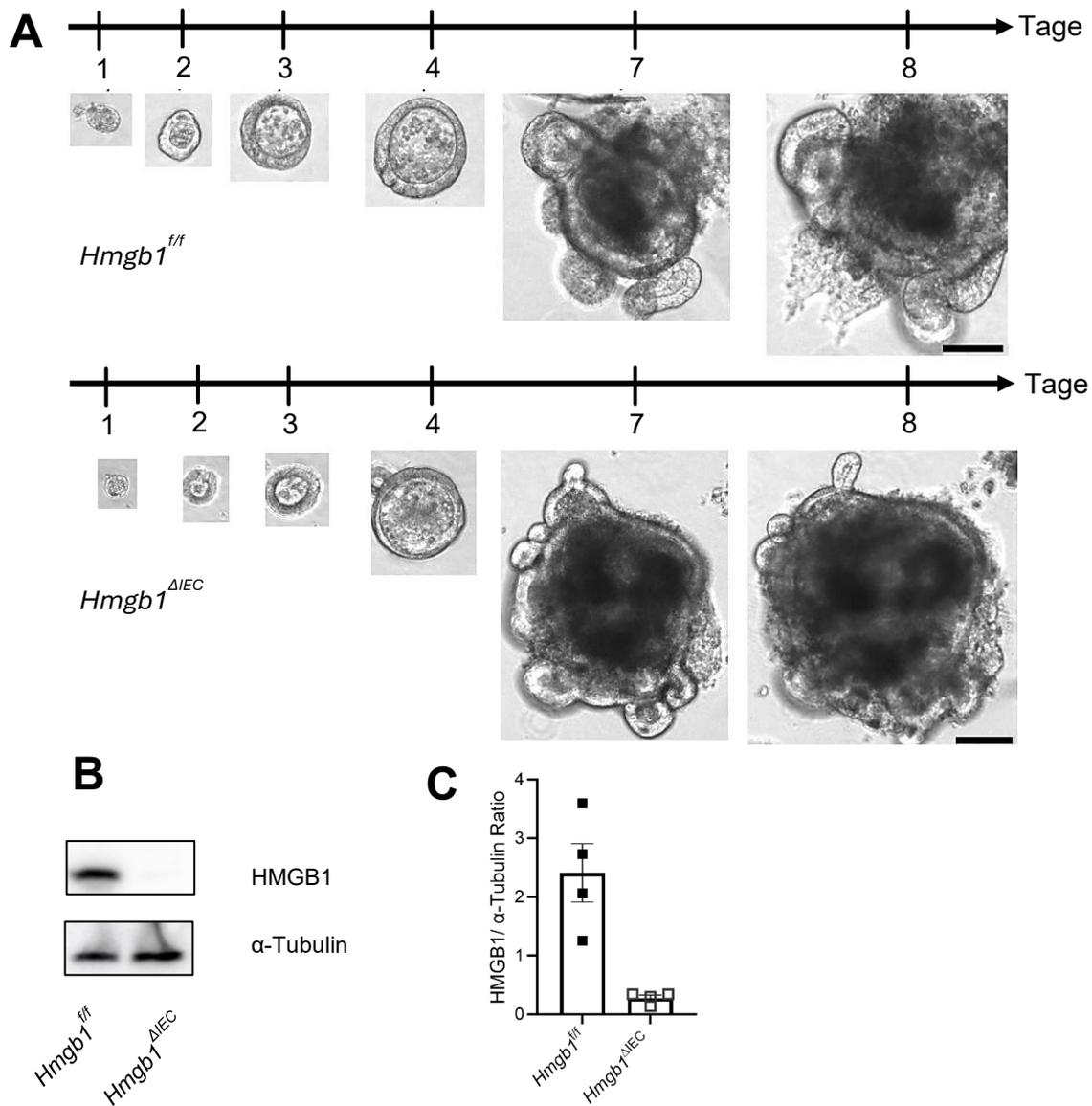


Abbildung 12: Etablierung einer intestinalen 3D-Organoid Zellkultur aus *Hmgb1<sup>f/f</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen.

Wachstumsverlauf (A) einzelner repräsentativer Organoiden aus intestinalen Stammzellen von *Hmgb1<sup>f/f</sup>* oder *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Tieren. Mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen zeigen ein effizientes Wachstum sowie Reifung der Organoiden über einen Zeitraum von 8 Tagen, granulohaltige Strukturen weisen auf Paneth-Zellen hin; das dunkler werdende Lumen zeigt die zunehmende Apoptose an. B) Westernblot der effektiven HMGB1-Deletion in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* auf Proteinebene; C) Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität (Mehrfachmessung gesammelter Proben); Skalierung A) und B): 100  $\mu$ m. ns= nicht signifikant

### 3.6. Die HMGB1-Defizienz intestinaler Organoide aus *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> beeinflusst weder das Wachstumsverhalten noch die Stammzellsignatur

Um den Einfluss der HMGB1-Defizienz auf das Wachstum der Organoide weiter zu charakterisieren, wurde der Durchmesser verschiedener einzelner Organoide aus *Hmgb1*<sup>ff</sup> oder *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> über einen Zeitraum von 8 Tagen gemessen. Die Zunahme des Durchmessers unterschied sich an keinem der gemessenen Zeitpunkte signifikant voneinander. Der mittlere Durchmesser an Tag 1 betrug bei *Hmgb1*<sup>ff</sup> 84 μm und bei *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> 71,2 μm (p= 0,60). Am letzten gemessenen Zeitpunkt war der mittlere Durchmesser bei *Hmgb1*<sup>ff</sup> 533 μm und bei *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> 521 μm (p= 0,89). Als ein weiterer Parameter zur Bestimmung des Organoid-Wachstums beider Genotypen wurde die Expansion der Organoide in einer Region von Interesse über einen Zeitraum von 8 Tagen gemessen (vgl. Abb. 13B). Nach der Aussaat (Tag 0) wurde die markierte Stelle alle 24 Stunden am Mikroskop mit Phasenkontrast aufgezeichnet. Bei der Auswertung mit *ImageJ* wurde der Flächenwert des Hintergrundes von der Organoid-Fläche abgezogen und mit der Funktion *Analyze Particles* gemessen. Auch hier zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen *Hmgb1*<sup>ff</sup> oder *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup>. Die *Hmgb1*-Defizienz in *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> scheint keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten sowie der Proliferationskapazität der Organoide zu haben.

Um die aus *Hmgb1*<sup>ff</sup> oder *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> stammenden intestinalen Organoide weiter zu charakterisieren, wurde aus reifem, unbehandeltem Zellmaterial RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse (vgl. Abschnitt 2.2.11) wurde die Transkription von *Hmgb1*, den Markern intestinaler Stammzellen *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5)* und *Olfactomedin-4 (Olfm4)*, *Olfactory receptor-78 (Olfr78)*, dem Proliferationsmarker *Sox9* und dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor *Guanine nucleotide-binding protein (Gnai)* untersucht (vgl. Abb. 13C). Die *Hmgb1* Expression war in *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> im Vergleich zu *Hmgb1*<sup>ff</sup> signifikant reduziert (p=0,029) und verdeutlicht auch auf RNA-Ebene die effektive Deletion von *Hmgb1*. Der Genotyp der isolierten Organoide stimmt mit den *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> oder *Hmgb1*<sup>ff</sup> Spendermäusen überein und ist auf das Organoid-Modell übertragbar.

Die Selbsterneuerung des Darmepithels wird durch die Proliferation von Stammzellen, die sich in der Nähe des Kryptenbodens befinden, gelenkt. Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth-Zellen werden durch sich selbst erneuernde Stammzellen in den Krypten neu gebildet, wandern entlang der Krypten-Zotten Struktur entlang und gehen an den Zottenspitzen durch zunehmende Apoptose verloren (Sato et al., 2009). Das Gen *Lgr5* ist einer der am besten charakterisierten intestinalen Stammzell-Marker (Dame et al., 2018; Sato et al., 2011). Die *Lgr5*-Transkription unterschied sich nicht signifikant zwischen *Hmgb1*<sup>ff</sup> oder *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup>. Ein weiterer gut untersuchter Stammzellmarker ist *Olfm4*, welcher wie *Lgr5* am Boden der Krypten exprimiert

wird (van der Flier et al., 2009). Auch die *Olfm4* Transkription unterschied sich nicht signifikant zwischen *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Organoiden. Weiterhin wurde die Transkription von *Olf78* beider Genotypen verglichen. *Olf78* dient als gut untersuchter Marker enteroendokriner Zellen und ist als Modulator intestinaler Entzündungsprozesse beschrieben worden (Fleischer et al., 2015; Kotlo et al., 2020). Wie in Abbildung 13 C ersichtlich, unterschied sich die Expression von *Olf78* nicht signifikant zwischen beiden Genotypen. Auch die Genexpression des Transkriptionsfaktors *Sox9* variierte nicht signifikant zwischen den beobachteten Gruppen. *Sox9* wird in Stamm- und Vorläuferzellen intestinaler Krypten und Organoide exprimiert und kann anhand der Expressionsmenge mit der Proliferationsrate dieser Zellen korreliert werden (Burclaff et al., 2022; Ramalingam et al., 2012). Die *Sox9* regulierte Zellproliferation scheint hier unabhängig von der *Hmgb1*-Defizienz intestinaler Organoide zu sein. Zuletzt wurde die *Gnai* Transkription zwischen beiden Genotypen verglichen. Diese unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant voneinander. GNAI kann als G-Protein in zahlreichen Signalkaskaden als *Transducer* fungieren, die GPCRs nachgeschaltet sind. Dazu gehören Prozesse wie die Zellteilung oder Regulation des Zellzyklus (Canals et al., 2019; Soundararajan et al., 2008).

Zusammenfassend kann anhand der Daten gezeigt werden, dass die *Hmgb1* Defizienz im *steady state* keinen Einfluss auf die Stammzellaktivität- und Funktionalität, die Expression der gezeigten Proliferationsmarker sowie auf das Wachstumsmuster intestinaler Organoide aus *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* im Vergleich zu *Hmgb1<sup>ff</sup>* hat.

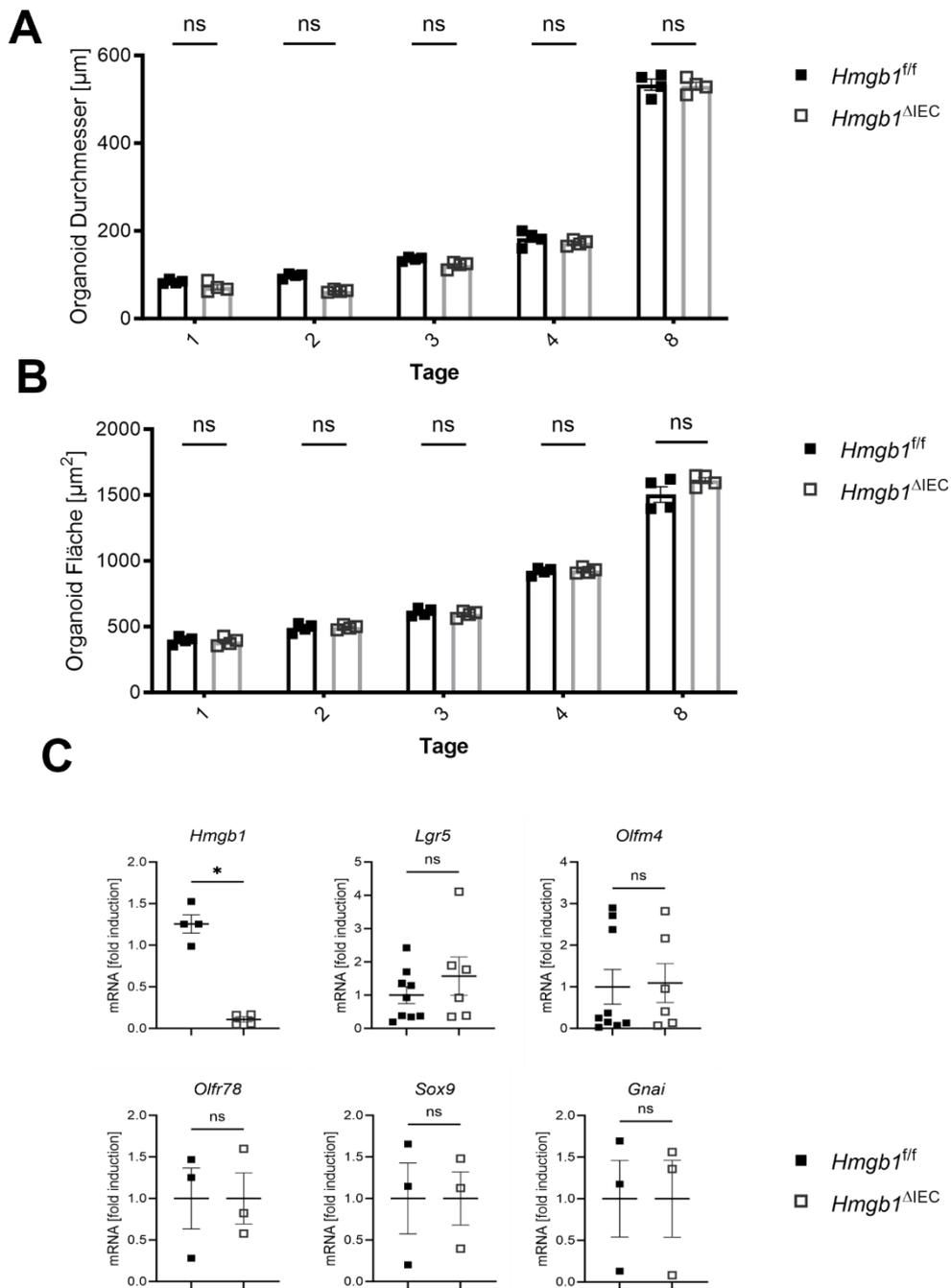


Abbildung 13: Charakterisierung von intestinalen Organoiden aus *Hmgb1*<sup>f/f</sup> und *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup>.

A) Veränderung des Durchmessers einzelner Organoiden beider Genotypen über einen Zeitraum von 8 Tagen;  
 B) Zunahme der bewachsenen Matrigel-Fläche einer Region von Interesse über einen Zeitraum von 8 Tagen;  
 C) mRNA-Menge (fold induction) der Gene *Hmgb1*, *Lgr5*, *Olfm4*, *Olf78*, *Sox9* und *Gnai* gemessen in unterschiedlichen, aus *Hmgb1*<sup>f/f</sup> und *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> gewonnenen, intestinalen Organoiden. ns= nicht signifikant

### 3.7. Etablierung einer intestinalen Organoid-Zellkultur nach Tamoxifen-induzierter HMGB1-Deletion in *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+*

Im nächsten Schritt wurden intestinale Organoide aus Tamoxifen-induzierten *Hmgb1*-Knockout-Mäusen (*Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+*) generiert, um die voranstehenden Organoid-Daten aus *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* zu bestätigen. Die angewendete Tamoxifen-induzierte Deletionsstrategie bei der *Hmgb1<sup>ff</sup>-UBC-Cre/ERT2* Linie ist in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Als Kontrolle dienten parallelisierte Organoide aus *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre+* Spendermäusen. Analog zu den bereits dargestellten Versuchen wurde die effektive Deletion von *Hmgb1* über Westernblots (vgl. Abb. 14B) nachgewiesen. Intestinale Organoide aus *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+* weisen eine signifikante Reduktion von HMGB1 im Vergleich zu *Organoiden aus Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre+* auf ( $p=0,028$ ) (vgl. Abb. 14C). Wird der zeitlichen Verlauf des Organoidwachstums beider Genotypen betrachtet, fallen keine morphologischen Unterschiede zwischen Tag 1 bis 8 auf. In den Phasenkontrastaufnahmen (vgl. Abb. 14A) sind anhand der granulohaltigen Strukturen ab Tag 1 Paneth-Zellen ersichtlich. An Tag 7 bilden sich bei beiden Genotypen die charakteristischen Fortsätze aus. Das dunkler werdende Lumen beider Organoid Linien deutet ab Tag 7, wie bei *Hmgb1<sup>ff</sup>* oder *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Organoiden, auf das baldige Absterben der Organoide hin.

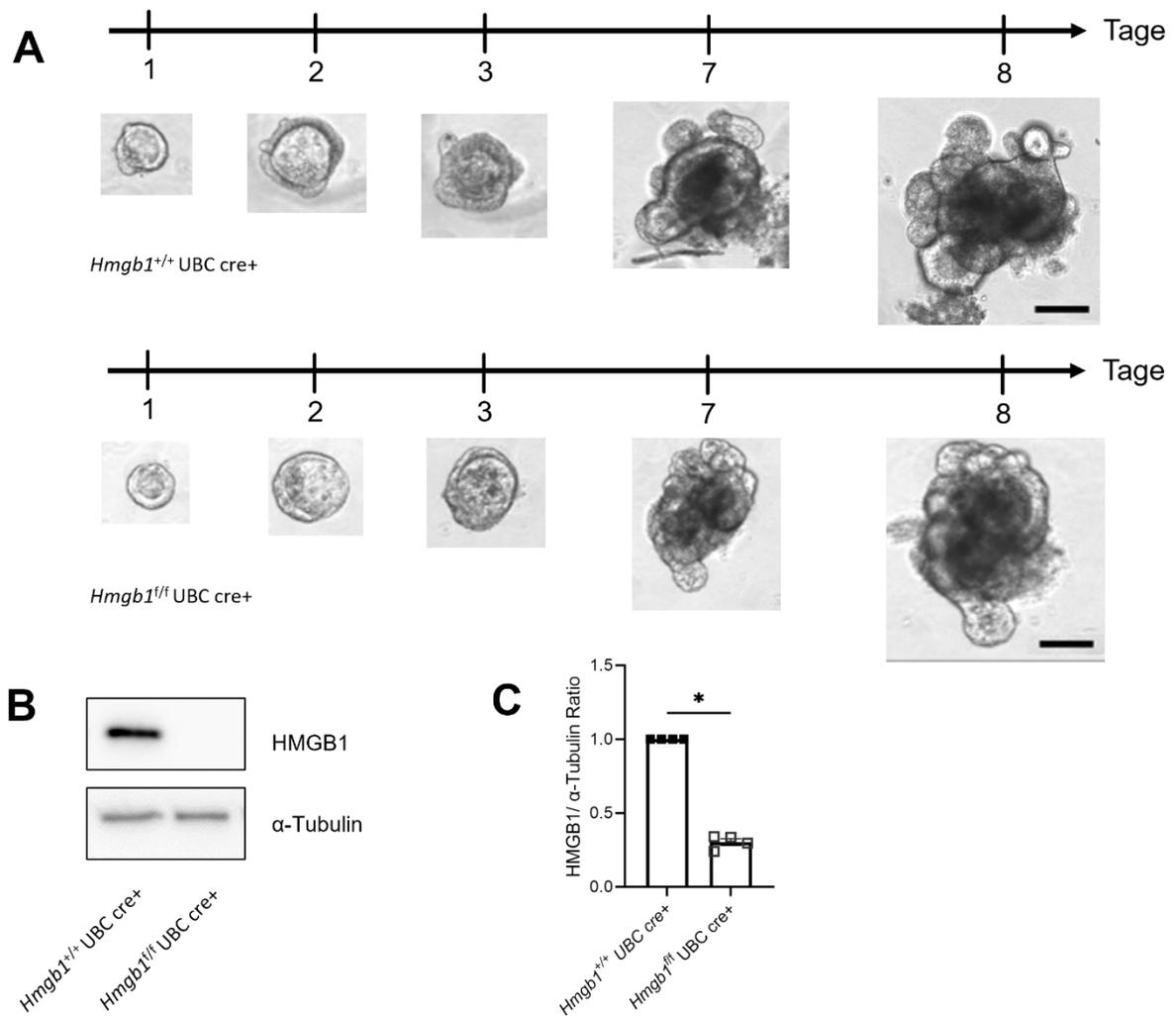


Abbildung 14: Etablierung einer intestinalen 3D-Organoid-Zellkultur aus *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup>* und *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup>* Mäusen.

*Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup>* Mäuse wurden für die induzierte HMGB1-Deletion mit Tamoxifen behandelt. Aus dem Darm wurden anschließend intestinale Stammzellen gewonnen und für die Kultur intestinaler Organoiden verwendet. Als Kontrolle dienten intestinale Organoiden aus *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup>* Spendertieren. A) Wachstumsverlauf einzelner repräsentativer Organoiden aus intestinalen Stammzellen von *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup>* und *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup>* Mäusen. Mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen zeigen ein effizientes Wachstum sowie Reifung der Organoiden über einen Zeitraum von 8 Tagen. Granulohaltige Strukturen weisen auf Paneth-Zellen hin, ein dunkler werdendes Lumen zeigt die zunehmende Apoptose an; B) Westernblot der effektiven HMGB1-Deletion in *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup>* auf Proteinebene; C) Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität für beide Genotypen, Mehrfachmessung gesammelter Proteinproben, Normierung auf *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup>*. Skalierung: 100 µm. ns= nicht signifikant

### 3.8. Charakterisierung von *Hmgb1*<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup> Organoiden

Um das Wachstum der Organoiden in An- oder Abwesenheit von *Hmgb1* zu charakterisieren, wurde erneut die Veränderung des Durchmessers über 8 Tage verfolgt (vgl. Abb. 15 A). Hierbei zeigte sich, dass sich die Größe des Durchmessers an keinem der gemessenen Zeitpunkte signifikant unter den Gruppen unterscheidet. Der mittlere Durchmesser vier unterschiedlicher Organoiden an Tag 1 betrug bei *Hmgb1*<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup> Organoiden 104 µm und bei *Hmgb1*<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup> 96,2 µm (p=0,96). An Tag 8 haben sich *Hmgb1*<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup> Organoiden auf durchschnittlich 338 µm und *Hmgb1*<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup> Organoiden auf 320 µm vergrößert (p= >0,99). Betrachtet man das Flächenwachstum der Organoiden über 4 Tage, so zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Am Tag der Aussaat betrug die mit Organoiden bewachsene Fläche *Hmgb1*<sup>+/+</sup> UBC cre<sup>+</sup> 495,5 µm<sup>2</sup> und bei *Hmgb1*<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup> 557,0 µm<sup>2</sup> (p= 0,9331). In den Tamoxifen-induzierten HMGB1-Knockout-Organoid-Modell waren keine Einflüsse auf das Wachstumsmuster und die Morphologie im Vergleich zum WT festzustellen.

Im nächsten Schritt wurde die Expression der Stammzellmarker *Lgr5* und *Olfm4* auf RNA-Ebene in Organoiden beider Genotypen untersucht (vgl. Abb. 15C). Die Transkription beider Markergene unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, wobei die *Lgr5*-Expression bei einer Organoid-Linie erhöht war und die *Olfm4*-Expression im Allgemeinen erhöht war. Zusätzlich wurde die Expression von *Muc2* analysiert, welches als Marker für Goblet-Zellen dient (Elmentaite et al., 2021). Auch diese unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Weiterhin wurde die Genexpression von *Villin* analysiert, welches als Marker von gastrointestinalen Epithelzellen dient und die Epithelzell-Morphologie sowie Zell Motilität regulieren kann (Wang et al., 2008). Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen HMGB1-KO und -WT festgestellt. Auch die Analyse der Genexpression von *Olf78* als Marker enteroendokriner Zellen zeigte keine signifikante Abweichung beider Gruppen auf. Zusammenfassend hat die Tamoxifen-induzierte HMGB1-Deletion in *Hmgb1*<sup>ff</sup> UBC cre<sup>+</sup> Organoiden keinen Einfluss auf das Wachstumsmuster sowie auf die Genexpression verschiedener Stammzell- und gastrointestinaler Zellmarker.

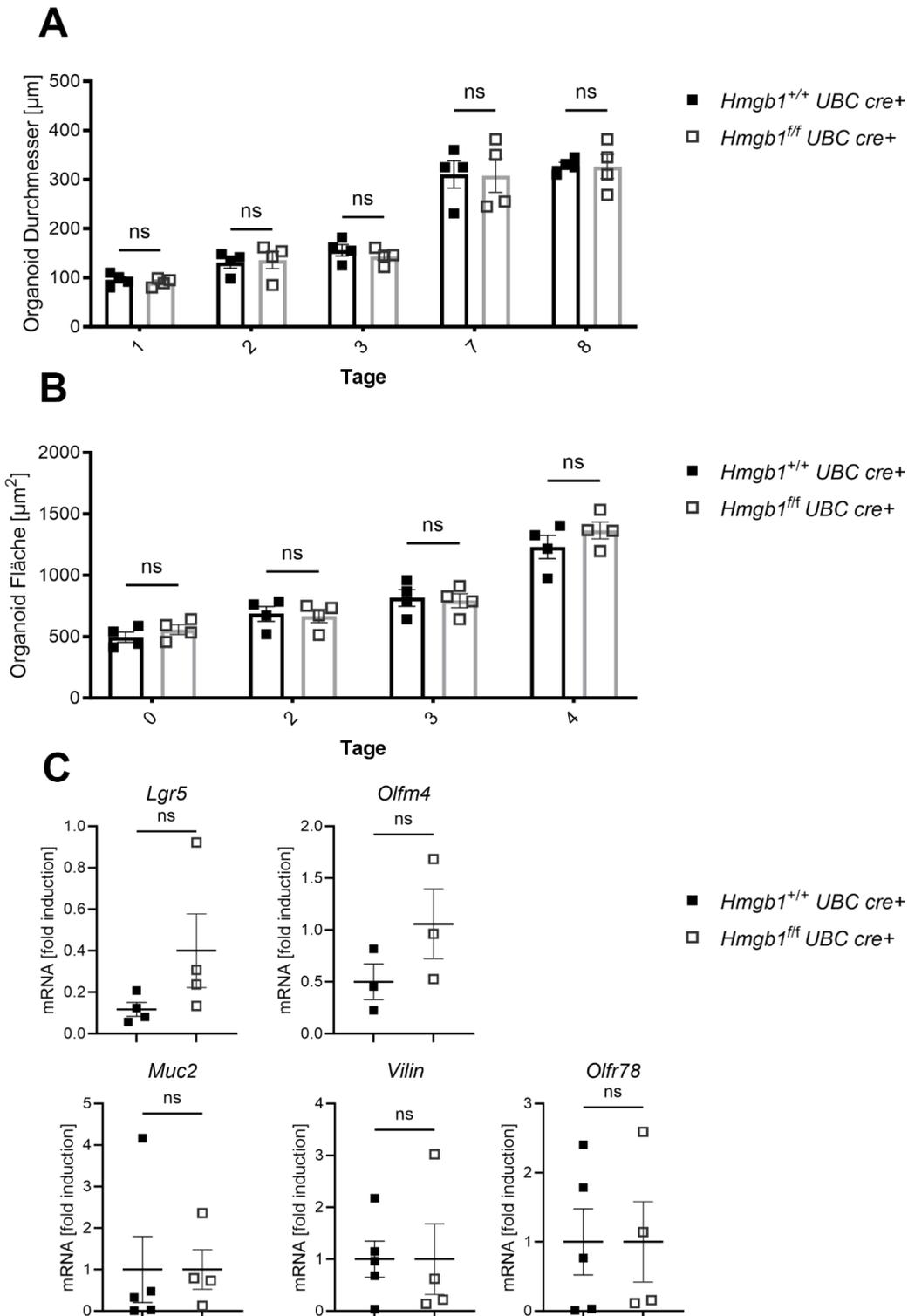


Abbildung 15: Charakterisierung von intestinalen Organoiden aus *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre+* und *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+* Mäusen.

A) Veränderung des Durchmessers einzelner Organoiden beider Genotypen über einen Zeitraum von 8 Tagen;  
 B) Zunahme der bewachsenen Matrigel­fläche einer Region von Interesse über einen Zeitraum von 8 Tagen;  
 C) mRNA-Expression (*fold induction*) der Gene *Lgr5*, *Olfm4*, *Muc2*, *Villin* und *Olfr78* gemessen in unterschiedlichen, aus *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre+* und *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+* gewonnenen intestinalen Organoiden.  
 ns = nicht signifikant

### 3.9. Der Einfluss der HMGB1-Deletion intestinaler Organoide auf die DSS-induzierte systemische Entzündungsreaktion

In einem nächsten Schritt wurden intestinale Organoide aus *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> und *Hmgb1*<sup>ff</sup> in einem *in vitro* CED-Modell untersucht, um einen DSS-induzierten Zellschaden herbeizuführen (Rallabandi et al., 2020). Dazu wurden die Organoide für 24 Stunden mit 0,05 % DSS behandelt, um die Entzündungs- bzw. Verletzungsreaktion mittels Genexpressionsanalyse zu untersuchen. Die Behandlung mit DSS führte in den geschädigten Organoiden zur Entzündung und einer Zunahme des Zytokin-Signalings. Die qPCR-Analyse zeigte eine höhere Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *IL-6*, *Tnf-α* und *Tgfb* (vgl. Abb. 16) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin war während der DSS-Gabe das Expressionsniveau inflammatorischer Downstream-Targets wie Chemokine-Rezeptor-Ligand *Cxcl1*, reaktive Sauerstoffmarker *Nos2*, Paneth-Zellmarker Lysozym (*Lyz*), Proteom-degradierendes Ubiquitin (*UBD*) und Signal *transducer and transcription activator* (*Stat1*) im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (vgl. Abb.16). *Stat1* vermittelt zelluläre Reaktionen auf Interferone (IFNs) sowie Zytokine und vermittelt bei HMGB1 die nukleäre Translokation ins Cytoplasma (Lu et al., 2014). Jedoch unterschieden sich für diese Marker die Expressionslevel nicht zwischen *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> oder *Hmgb1*<sup>ff</sup>. Ebenso war die Expression der an der Wundheilung beteiligten Matrix-Metalloproteasen *MMP3* und *MMP10* (nicht gezeigt) durch die Entzündung der behandelten Organoide höher als in der Vergleichsgruppe. Die Expression von *MMP3* war in *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> signifikant (p= 0,044) erhöht, jedoch nicht die von *MMP10*. Die gleiche Genexpressionsanalyse wurde auch für DSS-behandelte und unbehandelte Organoide aus *Hmgb1*<sup>+/+</sup> UBC cre+ und *Hmgb1*<sup>ff</sup> UBC cre+ durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Entzündungsreaktion in Abhängigkeit der HMGB1-Deletion. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die zelluläre Grundfunktionalität und Reaktion auf eine systemische Inflammation in diesen vereinfachten Darmmodellen unabhängig von der genetischen HMGB1-Defizienz ist.

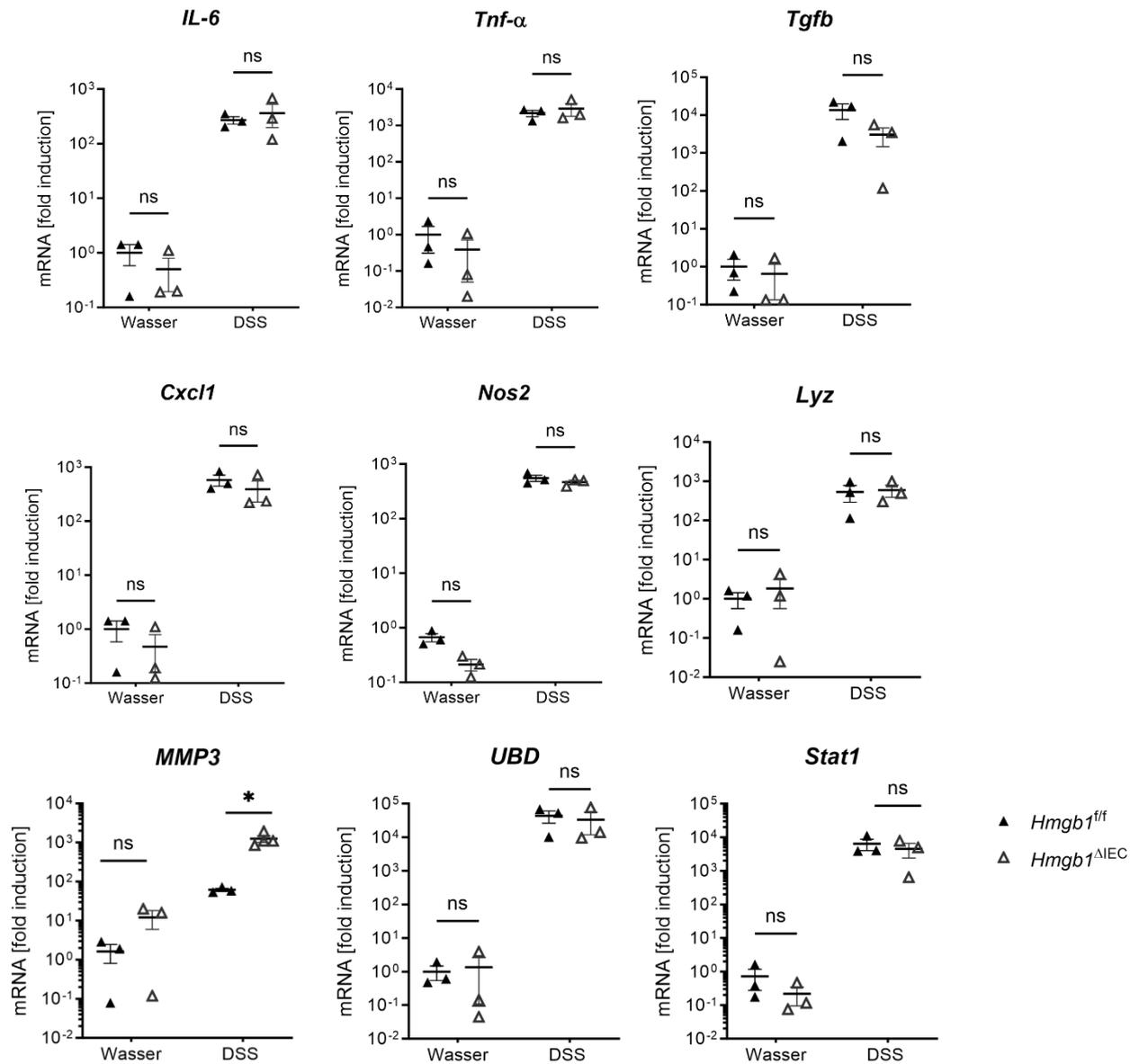


Abbildung 16: Einfluss der HMGB1-Deletion intestinaler Organoiden auf die DSS-induzierte systemische Entzündungsreaktion.

Organoiden aus *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* und *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* wurden für 24 Stunden mit DSS behandelt und anschließend mittels qPCR-Analyse auf die Genexpression inflammatorischer Zytokine (*IL-6*, *Tnf-α*, *Tgfb*), Downstream Effektoren (*Cxcl1*, *Nos2*, *Lyz*, *UBD*, *Stat1*) und Matrixmetalloprotease 3 (*MMP3*) untersucht. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Organoiden beider Genotypen. ns = nicht signifikant.

### 3.10. Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Permeabilität der intestinalen Barriere.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die epitheliale HMGB1-Deletion einen Einfluss auf die Permeabilität der intestinalen Barriere haben könnte und so den schwereren Colitis-Verlauf in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen erklären kann. Da eine geschädigte Darmbarriere die Folge einer *tight junction*

Dysfunktion oder einer Epithelschädigung sein kann (Horowitz et al., 2023), wurden diese im Folgenden genauer untersucht. Dazu wurde per Genexpressionsanalyse die Transkription der *tight junctions Claudin-1 (Cldn1)*, *Claudin-2 (Cldn2)*, *Claudin-4 (Cldn4)*, *tight junction protein 1 (Tjp1 bzw. ZO-1)*, *Occludin (Ocln)* und der *adherens junction E-Cadherin (Cdh1)* sowohl in intestinalen Organoiden als auch im Kolongewebe der entsprechenden Kontrollen und DSS-behandelten Proben beider Genotypen (*Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*) untersucht. Die Claudine-1 bis -4 gehören zu der großen Gruppe der Claudine, die als Transmembranproteine zusammen mit Occludin entscheidend für die intestinale Barriereintegrität und den selektiven Stoffaustausch sind (Chelakkot et al., 2018). Wie in Abbildung 17A zu erkennen ist, unterschied sich das Expressionsniveau der Gene *Cldn1*, *Cldn2*, *Cldn4* und *Ocln* nicht signifikant zwischen den Genotypen in den Wasser-Kontrollen oder mit DSS-behandelten intestinalen Organoiden. Auch das *tight junctions* assoziierte Gen *Tjp1* und die repräsentative Adherens Junction *Cdh1* wiesen ein vergleichbares Expressionsniveau auf. Das gleiche Bild ergab sich *in vivo* beim Vergleich der Genotypen in den Wasser-Proben oder Tag 4 und 7 der DSS-Proben (vgl. Abb. 17B). Auch hier unterschieden sich weder die *tight junctions* noch *adherens junction*-Marker auf Genexpressionsniveau zwischen *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*. Anhand dieser Daten ist folglich kein Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Expression der gezeigten *tight-* und *adherens junctions* in intestinalen Organoiden und Kolongewebe nachzuweisen.

Daher wurden in einem zweiten Schritt verschiedene Permeabilitätsmarker im Mäuserum der entsprechenden Versuchsgruppen per ELISA nachgewiesen. Zu den getesteten Serum Markern gehören Diaminoxidase (DAO), *Intestinal fatty acid binding protein (IFABP)* und Zonulin. Alle drei Proteine gelten als gut untersuchte und validierte Biomarker für die Beurteilung der Integrität der Darmbarriere (Zheng et al., 2021). DAO und IFABP sind insbesondere in Darmepithelzellen vorkommende zytosolische Proteine und werden bei einer Störung oder Schädigung des Darmepithels freigesetzt. Steigende Serumlevel dieser Biomarker deuten daher auf einen Verlust der Barrierefunktion hin (Kong et al., 2019; Linsalata et al., 2018). Zonulin fungiert als ein Modulator, welcher *tight junction*-Protein Interaktionen im Darmepithel verändern und so Verbindungen zwischen Epithelzellen lockern kann (Schoultz & Keita, 2020). Erhöhte Serum Zonulin Level gehen daher mit einer durchlässigeren Darmbarriere einher (La Torre et al., 2023; Tajik et al., 2020). Wie man in Abb. 17 C sieht, stiegen die Serumlevel der Marker DAO, IFABP und Zonulin bei *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* unter DSS-Behandlung durch die Schädigung des Epithels im Vergleich zur Wasserkontrolle an. Jedoch unterschieden sich die gemessenen Proteinkonzentrationen nicht signifikant zwischen den Genotypen.

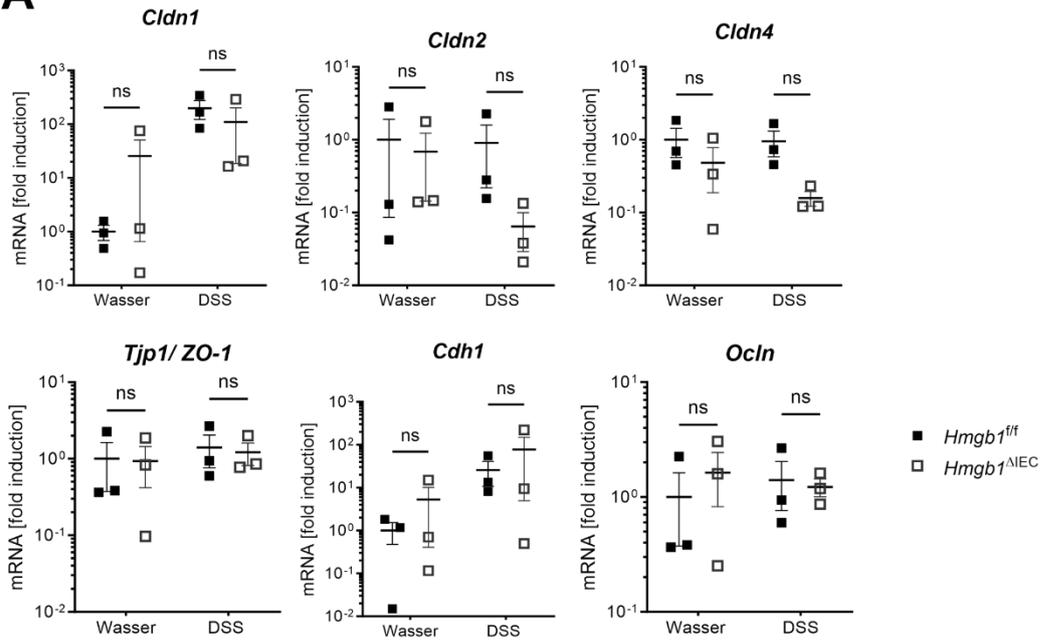
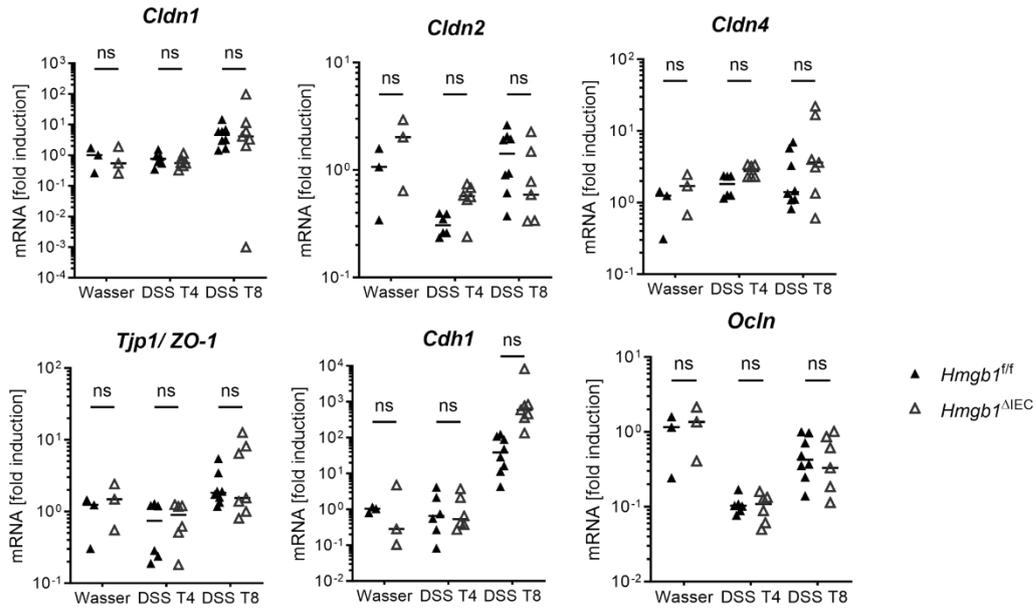
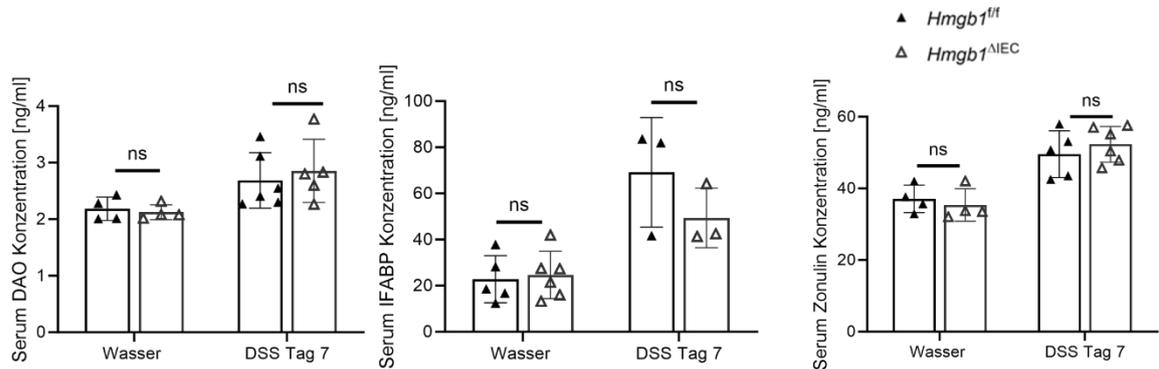
**A****B****C**

Abbildung 17: Einfluss der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Permeabilität der intestinalen Barriere im Mausmodell und in Organoiden.

A) und B) In *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* wurde durch die Gabe von DSS im Trinkwasser eine Colitis ausgelöst. Genexpressionsanalyse der *tight junctions* *Cldn1*, *Cldn2*, *Cldn4*, *Tjp1*, *Cdh1* und *Ocln* in mit DSS-behandelten intestinalen Organoiden und Kontrollen (A) oder im Kolongewebe (B) beider Genotypen in der Wasserkontrollgruppe und Tag 4 und 7 nach DSS-Behandlung; C) Serum ELISA der Permeabilitätsmarker DAO, IFABP und Zonulin in *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Kontrollen und Tag 7 nach DSS-Behandlung. ns = nicht signifikant.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Permeabilität von Epithelzellen ist der *in vitro* Permeabilitäts-Assay (Marr et al., 2023; Ni et al., 2017). Dazu wurde in murinen MC38-Zellen das Gen *Hmgb1* mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Technologie gezielt deletiert (vgl. 2.2.24). Nach Überprüfung der effektiven HMGB1-Deletion über Westernblots (vgl. Abb. 18 A-B) wurden MC38-HMGB1 +/+ (Wt) und MC38-HMGB1 -/- (KO) Zellen in Transwell-Einsätzen kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz über einen Zeitraum von 6 Stunden mit FITC-Dextran behandelt, um anschließend die Menge des diffundierten FITC-Dextrans photometrisch zu bestimmen. In diesem Versuch wurde die Permeabilität wildtypischer MC38-Zellen mit CRISPR-Cas9-deletierten MC38-Zellen (HMGB1 -/-) und MC38-Zellen mit CRISPR-Cas9-Leervektor, die nicht *Hmgb1* deletiert sind (HMGB1 +/+), miteinander verglichen. In Vorversuchen wurde die Viabilität und Proliferation von MC38-HMGB1 +/+ und MC38-HMGB1 -/- Zellen mit wildtypischen MC38-Zellen verglichen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). So konnten mögliche, durch die eingebrachten Vektor Konstrukte ausgelöste, Veränderungen der zellulären Grundfunktionen ausgeschlossen werden. Im Permeabilitäts-Assay in Abbildung 18 ließ sich an keinem der gemessenen Zeitpunkte Unterschiede in der FITC-Dextran abhängigen Permeabilitätsrate messen. Damit ist ein Einfluss des epithelialen HMGB1 auf die Integrität der intestinalen Darmbarriere unwahrscheinlich, da weder in mRNA- und Serumlevel noch im *in vitro* Permeabilitäts-Assay signifikante Unterschiede der entsprechenden Marker nachgewiesen werden konnten.

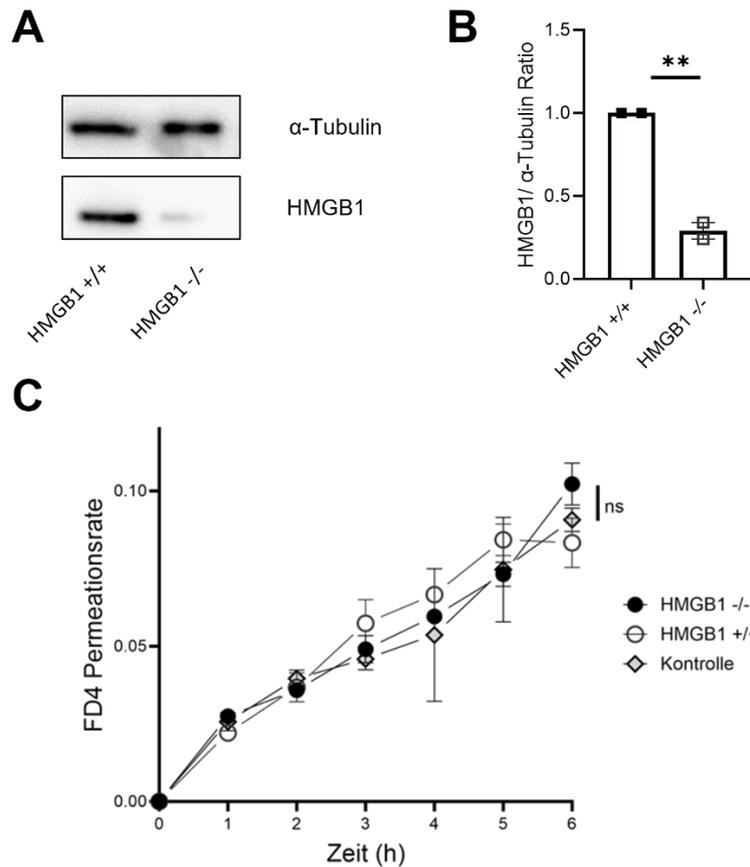


Abbildung 18: Permeabilität von HMGB1 +/+ und MC38 HMGB1 -/- Zellen für FITC Dextran (FD4).

Mit Hilfe der CRISPR-Technologie wurde in murinen MC38-WT-Zellen ein HMGB1-Knockout induziert. A) Westernblot der effektiven HMGB1-Deletion in HMGB1 -/- auf Proteinebene; B) Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität. C) MC38-HMGB1 +/+ (Nullvektor) MC38-HMGB1 -/- (KO) und MC38-WT-Zellen (ohne CRISPR-Cas9-Vektor) wurden in einem Transwell-Assay auf die Permeabilität von FITC-Dextran (FD4) untersucht. Als Kontrolle dienten wildtypische MC38-Zellen. ns= nicht signifikant

### 3.11. Der Einfluss von intrazellulärem HMGB1 auf die *in vitro* Wundheilung

Die Wundheilung der Darmschleimhaut ist ein komplexer Prozess, der darauf abzielt, die Darmbarriere nach Verletzungen funktionell wiederherzustellen. Bei diesem Prozess werden verschiedene zelluläre und molekulare Mechanismen wie Zellmigration, Proliferation und Entzündungsregulation koordiniert (Chelakkot et al., 2018). Ein intakter Wundheilungsprozess ist entscheidend für die Wiederherstellung der Permeabilität und die Darmhomöostase. Eine gestörte Wundheilung kann die Darmbarriere beeinträchtigen und Entzündungen im Darm verstärken (Horowitz et al., 2023; Sommer et al., 2021). Um zu untersuchen, ob der Phänotyp statt auf Störungen der intestinalen Permeabilität eher auf eine gestörte Wundheilung der Mukosa in HMGB1-defizienten Epithelzellen zurückzuführen ist, wurde dies im Folgenden über einen *Scratch-Assay* überprüft (vgl. Abschnitt 2.2.23).

Im *Scratch-Assay* wurde sowohl die Proliferation (vgl. Abb. 19 A) als auch die Migration (vgl. Abb. 19 B) in Gegenwart und Abwesenheit von intrazellulärem HMGB1 untersucht. In letzterem Versuchsaufbau wurden die MC38-Zellen mit dem DNA-Synthese-Inhibitor Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid-Hydrochlorid im Kulturmedium behandelt, um die Zellmigration als Teil des Wundheilungsprozesses isoliert betrachten zu können. Die Konfluenz betrug nach 24 Stunden für die Migration 69% bzw. 71,7 % ( $p=0,82$ ) und für die Proliferation 82,0% bzw. 75,6% ( $p=0,35$ ) zwischen HMGB1 +/+ und HMGB1 -/- MC38-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Wundheilung langsamer verläuft, wenn die DNA-Replikation gehemmt wird. Es gibt jedoch keinen Unterschied in der Wundheilungskapazität zwischen HMGB1-positiven (HMGB1 +/+) und HMGB1-negativen (HMGB1 -/-) MC38-Zellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass intrazelluläres HMGB1 keinen Einfluss auf die Wundheilungskapazität in Bezug auf die Zellmigration und Proliferation in diesem *in vitro* Modell hat.

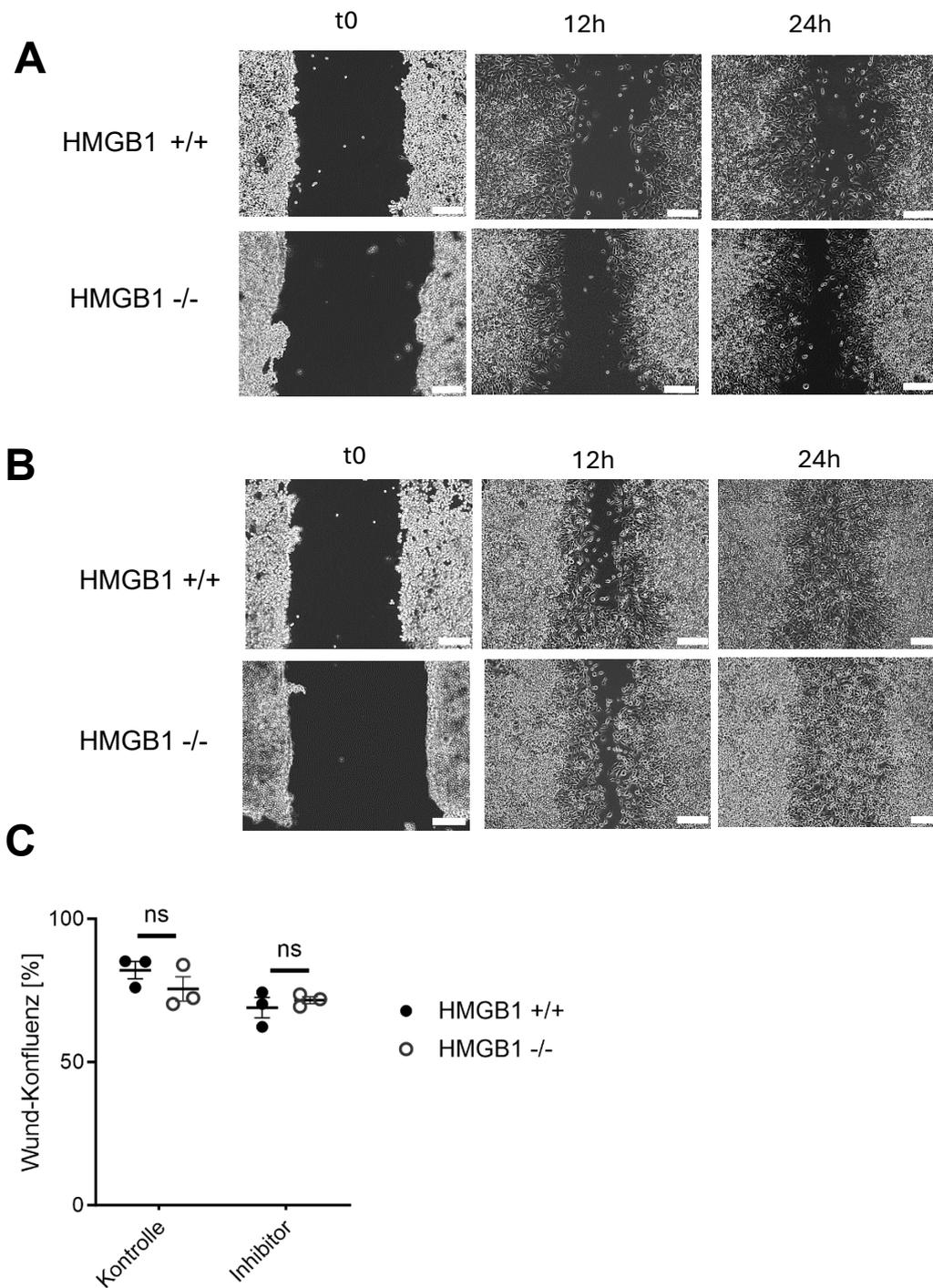


Abbildung 19: Der Einfluss von intrazellulärem HMGB1 auf die Wundheilung in vitro.

Mit Hilfe der CRISPR/Cas-Technologie wurde in murinen MC38-WT-Zellen ein HMGB1-Knockout induziert. MC38-WT-HMGB1 +/+ und MC38-KO-HMGB1 -/- Zellen wurden in einem *Scratch-Assay* über 24 Stunden auf ihre Wundheilungskapazität untersucht. A) Repräsentativer *Scratch-Assay* mit MC38-HMGB1 +/+ und MC38-HMGB1 -/- Zellen mit DNA-Replikations-Inhibitor, um die Migration der Zellen zu untersuchen; B) Repräsentativer *Scratch-Assay* der gleichen Zelllinien ohne Proliferationsinhibitor (Kontrolle), um die Zellproliferation zu untersuchen; C) Auswertung der Wundkonfluenz [%] aus A) und B) nach 24 Stunden. Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. Skalierung: 100  $\mu$ m. ns= nicht signifikant

### 3.12. Epitheliales HMGB1 beeinflusst das extrazelluläre Matrix-Remodelling

Im Rahmen dieser Arbeit und vorangegangenen Publikationen (Fölsch, 2021) wurde gezeigt, dass eine HMGB1-Defizienz in intestinalen Epithelzellen zu einem schwereren Krankheitsverlauf während der DSS-induzierten murinen Colitis führt. Frühere RNA-Expressionsanalysen in Darmgewebe von *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* und *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* deuteten auf eine Veränderung der Zell-Zyklusaktivität bei Abwesenheit von epithelialen HMGB1 hin. Diese Hypothese konnte durch immunhistochemische Färbungen der Proliferationsmarker BrdU und Ki-67, des Nachweises von PCNA sowie der Beobachtung des Wachstums in Abhängigkeit von intrazellulärem HMGB1 nicht bestätigt werden. DSS-induzierte Organoid-Verletzungen *in vitro* führten zu einer vergleichbaren Induktion von Genen, die an Entzündungen beteiligt sind (IL-6, Nos2, Tnf-α), Lysozym-Z-Produktion (Lyz) und *tight junction*-Bildung (Cldn1, Tjp1) welches auf eine unveränderte Grundfunktionalität und Reaktionsfähigkeit in Abwesenheit von intrazellulärem HMGB1 in diesen vereinfachten Modellsystemen hinweist. Allerdings konnte im Modell der murinen Colitis-assoziierten Karzinogenese CAC gezeigt werden, dass HMGB1 aus myeloiden Zellen einen verstärkten Einfluss auf die Tumorgenese im chronisch-entzündeten Darm hat (Foelsch et al., 2024).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Epithelzellen und myeloide Immunzellen nach 4 Tagen DSS-Behandlung separat auf RNA-Ebene sequenziert. Dazu wurden aus *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Epithelzellen aus dem Kolon gewonnen und die myeloiden Zellen aus der Immunzellfraktion mittels FACS-Sorting isoliert (vgl. Abschnitt 2.2.6-7). In der Auswertung der Sequenzierdaten wurden nicht-Protein-codierende Sequenzen ausgeschlossen.

Nach 4 Tagen DSS-Behandlung wurden beim Vergleich der Genexpression von Epithelzellen aus *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* und *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* 3239 DEGs identifiziert, wovon 357 in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* hoch- und 2882 DEGs herunterreguliert waren (vgl. Abb. 20A). Die Heatmap-Analyse in Abbildung 20 B zeigt eine deutliche Gruppierung der getesteten Mäuse nach Genotyp. Die *over representation Analysis* (ORA) ergab eine signifikante Anreicherung von Pathways, welche mit der extrazellulären Matrix Biologie und deren Organisation sowie der Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation in Verbindung stehen (vgl. Abb. 20C) (Boyle et al., 2004). Neben den mit DSS-behandelten Proben wurde auch eine Sequenzierung an epithelialen Zellen beider Genotypen unter *steady state*-Bedingungen durchgeführt. Hier ergab die Analyse der Sequenzierungsdaten 49 DEGs, von denen 15 in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* hoch- und 34 herunterreguliert waren (vgl. Abb. 21 A). Unter den signifikanten DEGs befand sich auch *Hmgb1*. Die Heatmap-Analyse (vgl. Abb. 21 B) zeigte weiterhin eine klare Gruppierung nach dem Genotyp. Die ORA-Analyse ergab, ähnlich wie unter DSS-Einfluss, eine Überrepräsentation von Pathways in Epithelzellen in Zusammenhang mit dem extrazellulären

Raum und Zell-Zell-Signaling (vgl. Abb. 20 C). Dies deutet darauf hin, dass HMGB1 potenziell eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Prozesse spielt, insbesondere im Kontext des extrazellulären *Matrix-Remodellings* während des Verlaufs und der Wundheilung von entzündlichen Darmerkrankungen.

Die Analyse der Genexpression in myeloiden Zellen aus *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* nach einer viertägigen DSS-Behandlung lieferte 31 DEGs, von denen 30 Gene in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* herunterreguliert waren (vgl. Abb. 22 A). Dies spiegelte sich in der ORA (vgl. Abb. 22 C) in einer unterschiedlichen Repräsentation von Pathway „*immune system process*“ wider. In Abbildung 22 B ist die geclusterte Heatmap der sequenzierten myeloiden Samples nach Genotyp dargestellt.

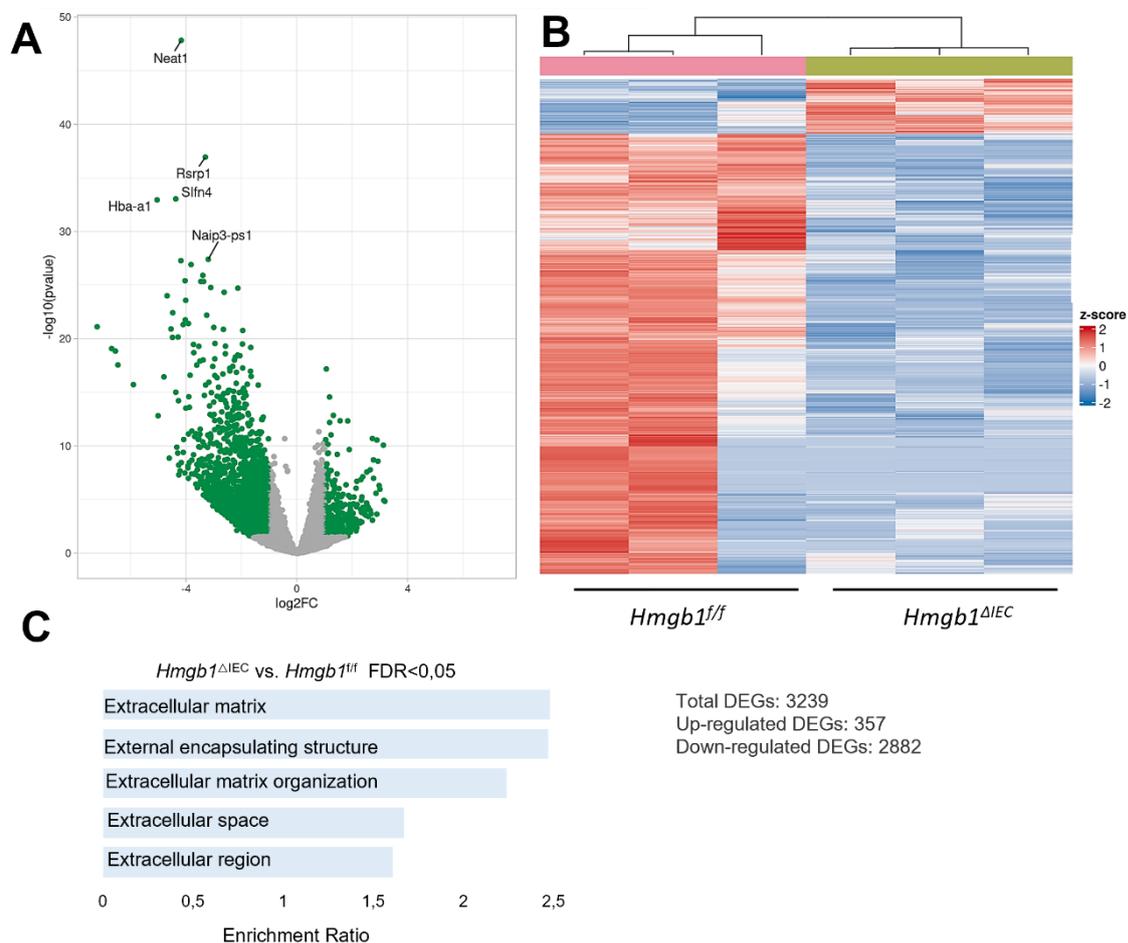


Abbildung 20: Effekt der epithelialen HMGB1-Deletion in Epithelzellen auf die Genexpression der frühen Phase in der murinen DSS-induzierten Colitis.

Darmepithelzellen wurden nach 4 Tagen DSS-Behandlung aus *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* isoliert. Nach RNA-Isolierung wurden die Proben sequenziert. A) Volcano-Plot, grüne Punkte = DEG, graue Punkte = detected Gene; B) Geclusterte Heatmaps mit n=3; C) *Over representation enrichment analysis* (ORA) der *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Proben mit n = 3. FDR = false discovery rate, FDR <0,05 = signifikant, DEG = differentially expressed gene.

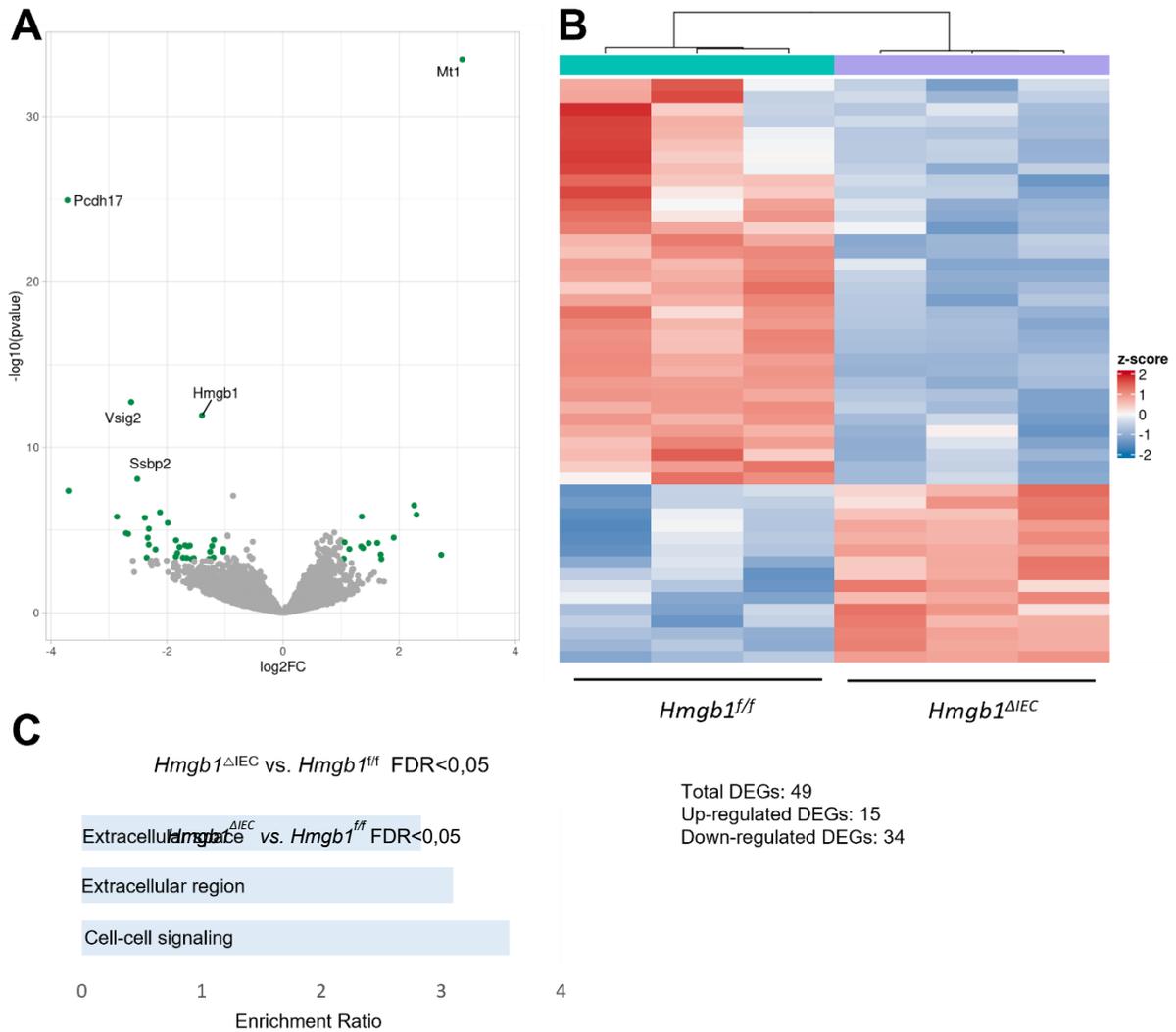


Abbildung 21: Effekt der epithelialen HMGB1-Deletion in Epithelzellen auf die Genexpression im Normalzustand.

Darmepithelzellen wurden aus *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> und *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> isoliert und die RNA sequenziert. A) Volcano Plot, grüne Punkte = DEG, graue Punkte = detected Gene; B) Geclusterte Heatmap mit n = 3; C) *Over representation enrichment analysis* (ORA) der *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> und *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> Proben mit n = 3. FDR = false discovery rate, FDR < 0,05 = signifikant, DEG = differentially expressed gene.

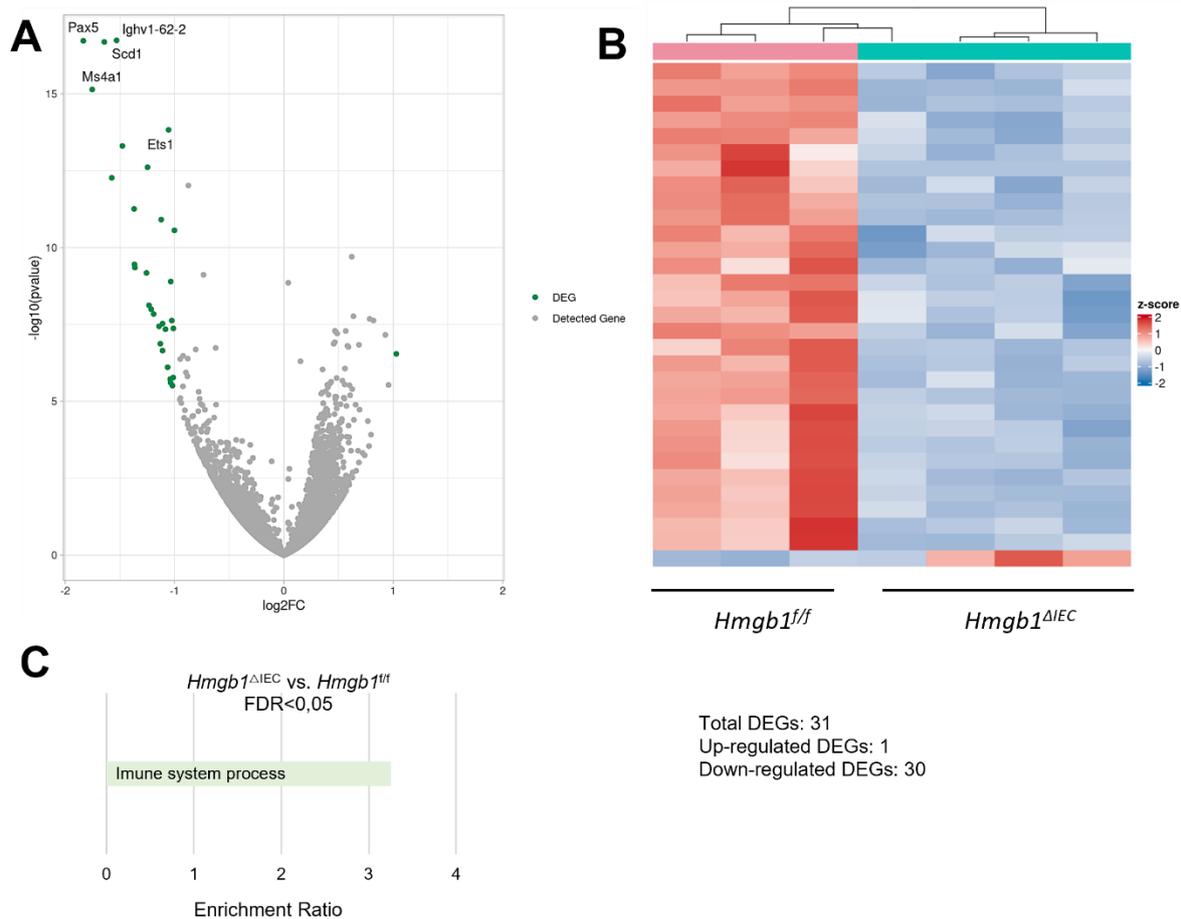


Abbildung 22: Effekt der myeloiden HMGB1-Deletion auf die Genexpression der frühen Phase in der murinen DSS-induzierten Colitis.

Myeloide Zellen wurden nach 4 Tagen DSS-Behandlung aus *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* isoliert. Nach RNA-Isolierung wurden die Proben sequenziert. A) Volcano Plot, grüne Punkte = DEG, graue Punkte = detected Gene; B) Geclusterte Heatmap; C) *Over representation enrichment analysis* (ORA) der *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Proben mit  $n[Hmgb1^{fl/fl}] = 3$  und  $n[Hmgb1^{\Delta IEC}] = 4$ . FDR = false discovery rate, FDR < 0,05 = signifikant, DEG = differentially expressed gene.

Im Anschluss wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um die aus den Sequenzierungsdaten gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Anreicherungen von Signalwegen, die mit der extrazellulären Matrixbiologie und der Zelladhäsion zusammenhängen, nachzugehen. Dafür wurden mittels qPCR relevante pro-fibrogene Gene analysiert sowie Sirius-Rot-Färbungen durchgeführt (vgl. Abb. 23: Diese Daten wurden freundlicherweise von PD Dr. Hübener und Dr. Pelczar zur Verfügung gestellt). Die qPCR Analysen der Fibrose assoziierten Gene Kollagen (*Col1a1*), Metallopeptidase Inhibitor 1 (*TIMP1*), Alpha-Aktin-2 (*Acta2*), Fibronectin 1 (*) und Matrixmetalloprotease 9 (*MMP9*) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*. Zur histologischen Färbung von Kollagen wurden weiterhin Sirius-Rot-Färbungen von Kolongewebe unbehandelter *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* Mäuse, DSS-behandelter Mäuse sowie von Gewebeaus chronischen (AOM/DSS) sowie Karzinogenese-Modellen (*Apc<sup>+</sup>min*)*

durchgeführt (Abb. 23 C). Nach einer verblindeten semiquantitativen Auswertung (Abb. 23 B) der Sirius-Rot-Positivität konnten keine Unterschiede in der Kollagenablagerung zwischen den Genotypen festgestellt und keine Anomalien bei der Kollagenakkumulation oder verletzungsabhängigen Genexpression festgestellt werden. Dies deutet auf eine HMGB1-vermittelte Modulation der extrazellulären Matrix Biologie außerhalb der reinen Akkumulation ihrer Komponenten hin.

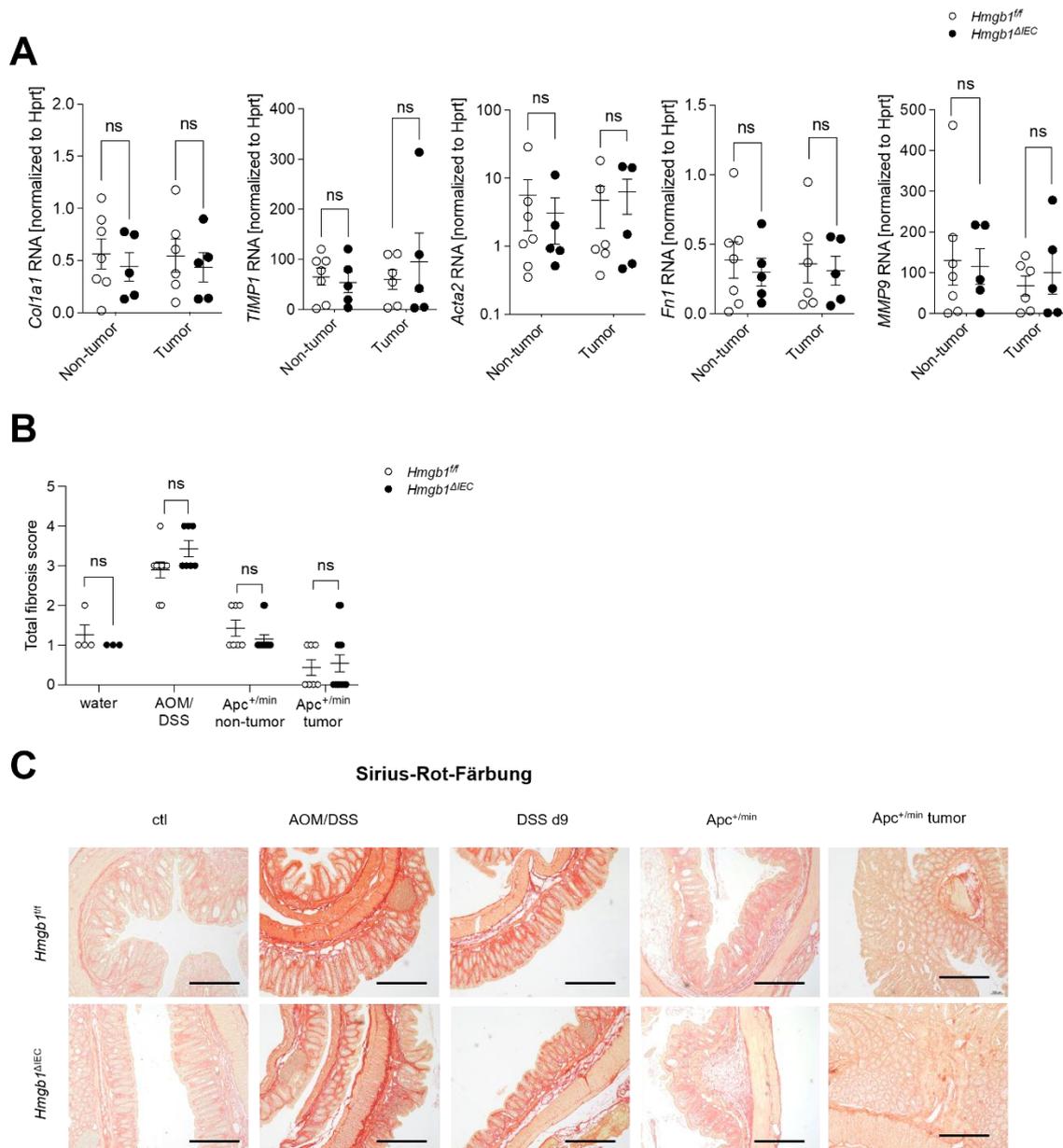


Abbildung 23: Auswirkung der epithelialen HMGB1-Deletion auf die Kollagenakkumulation und Genexpression pro-fibrogenen Schlüssel-Gene

A) qPCR Analyse relevanter Fibrose-assoziiierter Gene in nicht-tumorösem und tumorösem Kolongewebe von Apc<sup>+/min</sup> *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>*- und Apc<sup>+/min</sup> *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*-Mäusen. B) Erhobene Fibrose-Scores von Sirius-rotgefärbtem Kolongewebe der angegebenen Mausmodelle verschiedener intestinaler Verletzungen aus *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*. C) Repräsentative Sirius-Rot-Färbungen aus *Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* und den angegebenen Mausmodellen. Skalierung: 100 μm. ns= statistisch nicht signifikant

### 3.13. Extrazelluläres HMGB1 besitzt eine Signaling-Funktion im Kontext der Colitis

Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen sind wichtig für die Regulation verschiedener Prozesse wie der intrazellulären Signalübertragung, der Genexpression, Zellproliferation oder Apoptose von Bedeutung. Die Proteinphosphorylierungen werden durch Proteinkinasen reguliert (Rauch et al., 2011; Yan et al., 2019). Daher wurden im folgenden Abschnitt Proteinkinase Phosphorylierungen in An- und Abwesenheit von extrazellulärem HMGB1 untersucht, um nochmals zu überprüfen, ob freigesetztes HMGB1 eine Signalwirkung auf umgebende Zellen hat. Wildtypische MC38-Zellen wurden dafür in der Zellkultur mit reduziertem oder disulfid-HMGB1 behandelt. Die aus dem Zellmaterial gewonnenen Protein-Lysate wurden in einem Phospho-Kinase-Array eingesetzt, bei dem Phosphorylierungslevel verschiedener Proteinkinasen parallel detektiert werden (vgl. Abschnitt 2.2.20).

Die Proteinkinasen Creb, eNos, Erk1/2, WNK, C-Jun und Akt123 wurden durch die Anwesenheit der beiden HMGB1-Isoformen moderat moduliert (vgl. Abb. 24A und 24B). Ebenso wurde eine veränderte Aktivierung der Signalwege in der Westernblot Analyse der nachgeschalteten Targets Creb, Erk1/2 und C-Jun (siehe Abbildung 24 C und D) in der Anwesenheit von disulfid und reduziertem HMGB1 identifiziert. Für den Westernblot wurden die gleichen Proteinlysate verwendet, die in Abbildung 24 A analysiert wurden. Die Ergebnisse aus den Sequenzierungsdaten deuten zusammen mit den Proteinkinase-Analysen auf eine potenzielle Signalübertragungsfunktion für extrazelluläres HMGB1 bei der Umprogrammierung von Epithelzellen auf umgebende Zellen während eines Gewebes Schadens im Kontext einer Colitis hin.

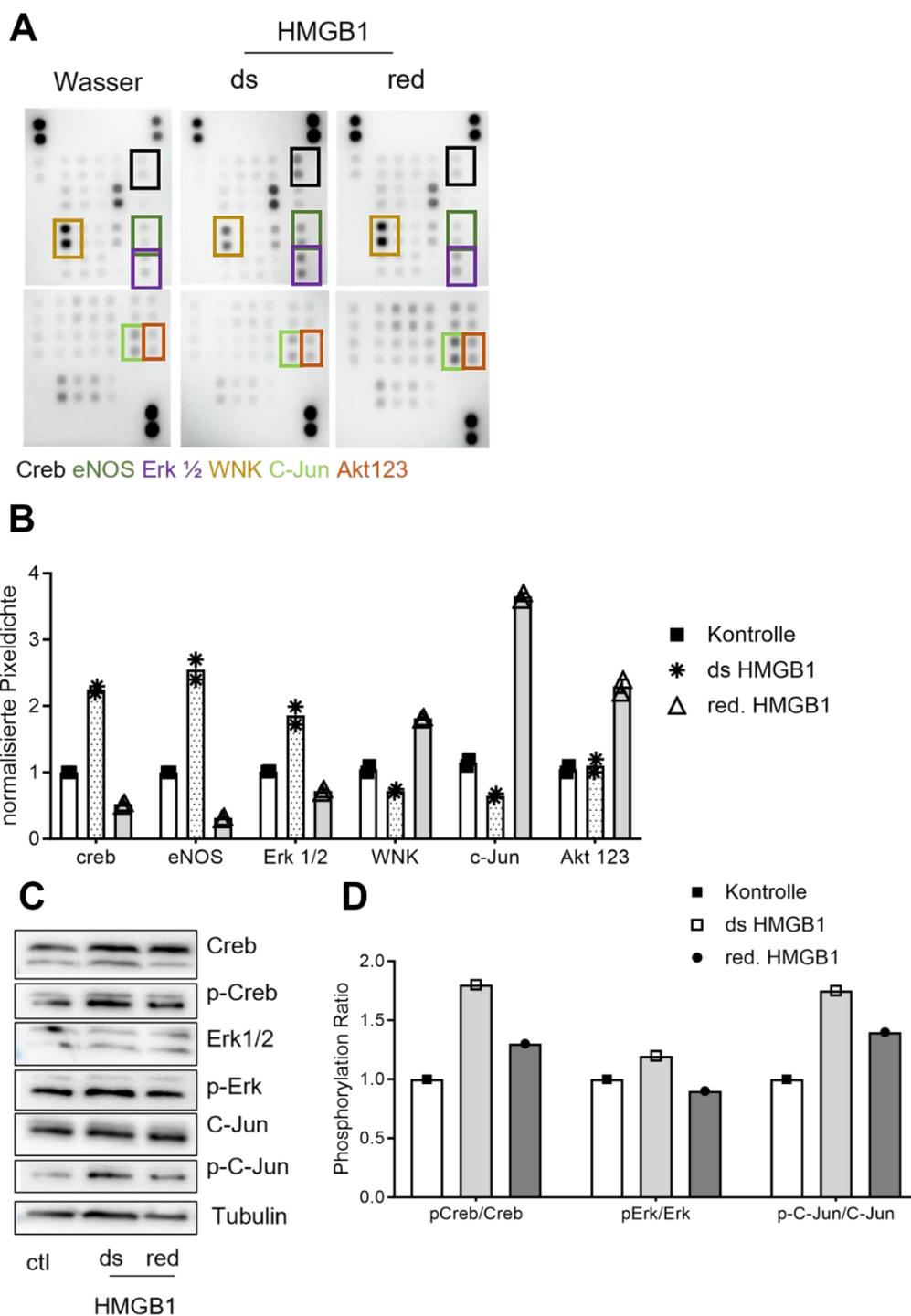


Abbildung 24: Einfluss von extrazellulärem HMGB1 auf Kinase Phosphorylierungen von *Downstream-Targets*.

Wildtypische MC38-Zellen wurden mit disulfid (ds) oder reduziertem HMGB1 behandelt. Die Protein-Lysate wurden in einem Membran-basierten Antikörper-Array eingesetzt, um die relativen Phosphorylierungsgrade der Proteinkinasen Creb, Erk1/2, eNOS, WNK, C-Jun und Akt123 zu bestimmen. A) Als Kontrolle dienen unbehandelte MC38-Zellen; B) Entsprechende densitometrische Auswertung mit Normalisierung auf die Kontrollgruppe; C) Westernblot der identifizierten non- bzw. phosphorylierten Signalmoleküle aus (A); D) Entsprechende Densitometrie aus (A) bzw. (C). Eine Statistische Analyse entfällt, da der Proteomeprofiler (A) nur eine semi-quantitative Analyse erlaubt und (C) eine zu geringe Stichprobenanzahl ( $n < 3$ ) aufweist.

## 4. Diskussion

### 4.1. Einordnung zu den Vorarbeiten

Das Darmepithel spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität und Funktion des Darms. Es dient als physische Barriere zwischen dem Luminalinhalt und dem darunter liegenden Gewebe und ist gleichzeitig an der Nährstoffaufnahme und der Immunreaktion beteiligt (Picchianti-Diamanti et al., 2018). DAMPs und PAMPS treffen hier aufeinander. Eine effiziente Wundheilung und Induktion von Entzündungsreaktionen bei Störungen der Homöostase bzw. einer Gewebsschädigung der intestinalen Barriere sind für den Organismus unerlässlich. Diese Reaktionen müssen strikt reguliert werden, da langanhaltende Entzündungen und chronische Gewebsschädigungen des Darmes mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert sind (Terzic et al., 2010). HMGB1 ist ein wichtiges Molekül, das an Entzündungsreaktionen beteiligt ist, die während einer Schädigung oder Entzündung des Darmepithels auftreten. Das Protein wurde in den letzten Jahren immer mehr als entscheidender Faktor bei der Entstehung von Colitis und Darmkrebs identifiziert. Die murine DSS-Colitis ist ein essenzielles Tiermodell zur Untersuchung von CEDs, da sie pathophysiologische Ähnlichkeiten wie epithelialer Schädigungen, Veränderung der Darmpermeabilität und dem Ablauf entzündlicher Prozesse aufweist (Eichele & Kharbanda, 2017). Wie wir und andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, weisen *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> im Vergleich zu *Hmgb1*<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach einer DSS-Behandlung einen deutlich verschlimmerten Krankheitsphänotyp nach DSS-Behandlung auf (Foelsch et al., 2024; Zhu et al., 2015). Dieser äußert sich ab Tag 4 der DSS-Colitis u.a. in höheren endoskopischen Colitis Scores, einem stärkeren Gewichtsverlust und höheren Konzentrationen entzündlicher Monozyten und Neutrophilen Immunzellen. Im Gegensatz dazu hatte eine HMGB1 Deletion in myeloiden Zellen keinen Einfluss auf den Schweregrad der DSS-Colitis, was durch einen vergleichbaren Gewichtsverlust, Kolonlänge und endoskopischen Score gezeigt wurde. Zudem konnten keine Unterschiede in der Entwicklung von entzündlichem Darmkrebs im AOM/DSS-Modell bei *Hmgb1*<sup>ΔIEC</sup> festgestellt werden, obwohl die epitheliale HMGB1-Deletion im Modell der akuten DSS-Kolitis starke Auswirkungen hat (Fölsch, 2021). Die Gründe hierfür könnten in einer verstärkten entzündlichen und antitumoralen Reaktion in Abwesenheit von epitheliale HMGB1 liegen, welche ein dysplastisches Potential kompensieren könnten. Die genauen Mechanismen müssen noch genauer erörtert werden. Aufgrund der starken kontextabhängigen und zellspezifischen Rolle von HMGB1 im Gastrointestinaltrakt soll in dieser Arbeit die Bedeutung von epitheliale HMGB1 in der intestinalen Verletzungsreaktion im Kontext der DSS-Colitis detaillierter untersucht werden.

#### 4.2. Die epitheliale HMGB1-Deletion hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der Epithelzellen

Die Proliferationsfähigkeit von Epithelzellen der intestinalen Barriere ist nicht nur im Normalzustand, sondern auch während entzündlicher Prozesse von entscheidender Bedeutung. Im *steady state* bewirkt eine stetige Proliferation der intestinalen Krypten im Darm die Integrität der intestinalen Barriere. Während einer Entzündung ist neben der kontinuierlichen Regeneration auch die Reparatur geschädigter Epithelien wichtig. Während entzündlicher Darmerkrankungen werden Epithelzellen verstärkt aktiviert, um geschädigtes Gewebe zu regenerieren (Martini et al., 2017). Aus früheren RNA Sequenzierungs-Analysen von Kolongesamtgewebe von Tag 4 der DSS-Gabe existierten Hinweise auf eine unterschiedlich regulierte Zellzyklusaktivität in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*. Mehrere Zellzyklus assoziierte Gene waren durch die epitheliale HMGB1-Deletion stärker herunterreguliert, als bei der Kontrollgruppe (Fölsch, 2021).

In dieser Arbeit wurde daher die Proliferation der intestinalen Krypten mittels Ki-67 und BrdU Färbungen analysiert. Während Ki-67 als nukleäres Protein in sich teilenden Zellen während des gesamten mitotischen Prozesses exprimiert wird, kann BrdU als Thymidin Analog nur in der S-Phase neu synthetisierter DNA in sich aktiv teilenden Zellen eingebaut werden. Für keinen der beiden Proliferationsmarker konnte ein Unterschied zwischen *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* unter Normalbedingungen oder DSS-Behandlung nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.3). Auch auf Proteinebene zeigte die Analyse des Proliferationsmarkers PCNA zwischen den Genotypen in *steady state* und am letzten Tag der DSS-Colitis vergleichbaren Level. Weiterhin konnte in der Sequenzierungsanalyse isolierter Epithelzellen keine Hinweise auf eine veränderte Zellzyklusaktivität gefunden werden, wie sie aus der Analyse des Kolongesamtgewebes registriert wurden. Dies könnte zum einen an der Heterogenität des Kolongesamtgewebes liegen, welches neben Epithelzellen z.B. auch Immunzellen, Fibroblasten, intestinale Stammzellen oder Gobletzellen beinhaltet. Die erhöhte Zellzyklusaktivität könnte daher von nicht-epithelialen Zellen verursacht sein. Weiterhin könnten im Kolongesamtgewebe verschiedene Zelltypen vermehrt repräsentiert sein und zelltyp-spezifische Unterschiede der Zellzyklusregulation aufweisen oder sich beeinflussen. Vielmehr wurden mehrere Gene und zugehörige Pathways identifiziert, welche mit der extrazellulären Matrix Komposition in Zusammenhang stehen. Auf diese Daten wird in Abschnitt 4.6 weiter eingegangen. Weiterhin wurden aus *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* sowie aus *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre+* und *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+* Mäusen isolierte intestinale Organoide auf ihre Proliferationskapazität und ihr Wachstumsverhalten in einer 3D-Kultur untersucht. Auch hier ergaben sich keine funktionellen Unterschiede in An- oder Abwesenheit von intrazellulärem HMGB1. Die zusätzliche Analyse der Expressionsniveaus der Stammzellmarker

*Lgr5*, *Olfm4* und des Proliferationsmarker *Sox9* in beiden genetischen Modellsystemen ergab ebenfalls keine Unterschiede.

Zusammenfassend konnte die These, dass eine epitheliale HMGB1-Deletion die Zellzyklusaktivität beeinflusst, nicht bestätigt werden. Die Daten legen vielmehr nahe, dass epitheliales HMGB1 Auswirkungen auf das Darmepithel hat, die über die bloße Proliferation hinausgehen, sodass dem Phänotyp andere Mechanismen zu Grunde liegen müssen. Diese werden hier im weiteren Verlauf diskutiert.

Neben der Proliferation spielen auch die Autophagie und Apoptose eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase. In ihrer Publikation von 2015 berichten Zhu und Kollegen, dass die epitheliale HMGB1-Deletion im murinen DSS-Modell zu Veränderungen der Mechanismen von Apoptose und Autophagie führt (Zhu et al., 2015). Diese Beobachtung konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in der Vergangenheit weder durch TUNEL-Färbungen, Genexpressionsanalysen, Westernblot-Analysen oder durch Sequenzierungsanalysen von Kolongesamtgewebe an Tag 4 nach DSS-Gabe beim Vergleich beider Genotypen bestätigen (Fölsch, 2021). Auch die in dieser Arbeit generierten Daten der entsprechenden Westernblotmarker LC3 oder p62 nach 7 Tagen DSS-Behandlung sowie die Sequenzierungsanalyse reiner Epithelzellen ergab keine Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation apoptotischer oder autophagischer Prozesse in unserem Mausmodell (vgl. Abschnitt 3.4). Vermutlich wird diese Daten Diskrepanz in der unterschiedlichen Deletions-Strategie der von Zhu et al. verwendeten genetischen Mauslinie hervorgerufen (Foelsch et al., 2024).

#### 4.3. Intrazelluläres HMGB1 hat keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion von intestinalen Organoiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus zwei unterschiedlichen genetischen HMGB1 Knockout Mauslinien intestinale Organoide isoliert. Zum einen aus *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* und zum anderen aus der Tamoxifen induzierbaren *Hmgb1<sup>+/+</sup> UBC cre+* und *Hmgb1<sup>ff</sup> UBC cre+* Mauslinie. In beiden Fällen ließ sich die genetische HMGB1-Deletion auf das Organoid-System übertragen. Der in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* *in vivo* beobachtete Phänotyp einer schwereren DSS-induzierten Colitis ließ sich jedoch nicht *in vitro* durch eine DSS-Behandlung der Organoide nachstellen. Dies deutet darauf hin, dass die Organoid-Kultur eine zu simplifizierte Plattform darstellt, um z.B. das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, Mikrobiota und Immunzellen des *in vivo* DSS-Modells abzubilden. Den intestinalen Organoiden mangelt es z.B. an mesenchymalem Gewebe, einer Vaskularisierung, sowie Nerven- und Immunzellen, die *in vivo* zur Gesamtstruktur und

Funktionalität des Darms beitragen (Fair et al., 2018). Das könnte in diesem Zusammenhang zu einer unvollständigen Analyse der zu Grunde liegenden krankheitsspezifischen Mechanismen führen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, eignet sich das Organoid-Modell gut, um akute Entzündungen in einem reduzierten Modell abzubilden. Allerdings ist die experimentelle Untersuchung chronischer Entzündungen am Organoid-Modell in der Forschung nach wie vor herausfordernd (Dotti & Salas, 2018). Des Weiteren fehlen in diesem Modell Wirts-Pathogen Interaktionen, wobei insbesondere das Zusammenspiel aus DAMPs und PAMPS für die hier diskutierte Fragestellung entscheidend ist. Eine weitere Limitation ist der Zugang der luminalen Oberfläche der Organoide. Da sie 3D-Strukturen bilden, kann diese Seite nur experimentell zugänglich gemacht werden, indem man die Organoide dissoziiert und in einem 2D Format kultiviert. Dabei geht jedoch die Zotten-Krypten Struktur verloren (O'Connell et al., 2021). Intestinale Organoide können zudem je nach Spender unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Während dies auf der einen Seite ein Vorteil ist, da z.B. individuelle Unterschiede sichtbar werden, erschwert diese Variabilität auf der anderen Seite die Reproduzierbarkeit im Vergleich zur einer immortalisierten Zelllinie (Mohammadi et al., 2021).

Wie man auch in dieser Arbeit sehen konnte, streuen die Werte bei Genexpressionsanalysen (vgl. Abschnitt 3.8) teilweise zwischen den einzelnen Organoiden. Im Gegensatz zu 2D-Zellkulturmodellen bieten die 3D- Organoide allerdings den Vorteil, dass komplexere Gewebestrukturen, einschließlich der Stammzell-Nische, ausgebildet werden und die Zellwachstumsumgebung, -proliferation und -differenzierung besser simuliert werden kann (Tian et al., 2023). Aktuell werden intestinale Organoide in der CED-Forschung eingesetzt, um beispielsweise Defekte der intestinalen Barrierefunktion oder die fehlregulierte Immunantwort mechanistisch zu untersuchen (Papp et al., 2024; Takashima et al., 2019). So könnte man in zukünftigen Versuchen durch die Zugabe pro-inflammatorischer Zytokine oder DAMPs (z.B. LPS) im Kulturmedium oder der Etablierung einer Organoid-Immunzell-Cokultur die Funktion von HMGB1 im Colitis Kontext noch weitgehender untersuchen. Die Kultivierung und Analyse patienteneigener Organoide mit systembiologischen und Omics-Methoden für die Untersuchung personalisierter Therapien und individuellen Wechselwirkungen wäre ebenfalls sinnvoll. In der Darmkrebsforschung werden patientenspezifische Tumor-Organoid-Modelle bereits eingesetzt, um zellspezifische Rollen bei der Tumorprogression und-remission zu ermitteln sowie die Wirksamkeit von kostspieligen Immuntherapeutika auf personalisierte Weise vorherzusagen (Magré et al., 2023; Yang et al., 2023)

#### 4.4. Die epitheliale HMGB1-Deletion hat keinen Einfluss auf die Colitis assoziierte Barriere-Dysfunktion

Die Forschungsdaten mehrerer Publikationen legen nahe, dass ein alleiniger Defekt der intestinalen Barriere ausreichen könnte, um CED zu entwickeln (Fava & Danese, 2011; Martini et al., 2017; Odenwald & Turner, 2013). So werden selbst Patienten mit inaktiver CED durch eine erhöhte parazelluläre Permeabilität des Darms charakterisiert. Weiterhin weisen bis zu 40 % der erstgradigen Verwandten von Patienten mit Morbus Crohn eine veränderte Permeabilität des Dünndarms auf (Fries et al., 2005; Russell & Satsangi, 2004). Auch Tierstudien zeigen, dass ein Barriere-Defekt der intestinalen Entzündung *in vivo* vorausgehen kann. Beispielsweise zeigten IL10<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von 2 Wochen eine Zunahme der Permeabilität im Kolon, bevor eine spontane altersbedingte intestinale Entzündung einsetzte (Madsen et al., 1999).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass DAMPs, insbesondere HMGB1, die epitheliale Barrierefunktion durch Erhöhung der Permeabilität beeinflussen kann (Boyapati et al., 2016). Sappington und Kollegen haben gezeigt, dass HMGB1 die Permeabilität von Caco-2-Zellmonolayern, einem weit verbreiteten Zellmodell der intestinalen Barriere, für fluoreszierend markiertes Dextran (FD4) in einer zeit- und dosisabhängigen Weise erhöht (Sappington et al., 2002). In Übereinstimmung damit führt HMGB1 in 2.5-D Zellkulturen von Caco-2 Zellen zu einer epithelialen Hyperpermeabilität (Kojima et al., 2022; Miyakawa et al., 2020). In dieser Arbeit wurde die HMGB1-abhängige Permeabilität mit FD4 in einem Transwell-Assay anhand CRISPR-Cas9 induzierten HMGB1-KO und WT-MC38-Zellen untersucht. Hier zeigte intrazelluläres HMGB1 keinen Einfluss auf die Permeabilität. Anders als bei Madsen et. al. entwickeln alternde unbehandelte *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* in einem Beobachtungszeitraum bis zu 50 Wochen auch keine spontane Colitis (Daten nicht gezeigt (Madsen et al., 1999)). Dies deutet darauf hin, dass keine initiale Dysfunktion der Darmpermeabilität in diesem genetischen Mausmodell vorliegt. Um diese Daten zu vervollständigen und die intestinale Permeabilität unter DSS-Einfluss zu untersuchen, könnte man den Transwell Assay in Zukunft mit der Messung der *transendothelial electrical resistance* (TEER) vervollständigen. Die TEER-Methode ist eine weit verbreitete quantitative Technik zur Messung der *tight junction* Integrität in epithelialen Zellmonolayern. TEER-Daten geben Aufschluss auf den Einfluss von Medikamenten oder Chemikalien wie DSS auf die Barriereintegrität und beruhen auf der Messung des ohmschen Widerstandes (Srinivasan et al., 2015). Zur Untersuchung der Permeabilität von *Hmgb1<sup>ff</sup>* vs. *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* im *steady state* und im DSS-Modell eignet sich in Zukunft zudem der *in vivo Fluorescein Isothiocyanate-dextran* (FD4) *Permeability Assay* (Dong et al., 2014; Watson et al., 2015).

Weiterhin wurden die Serumlevel der Permeabilitätsmarker Zonulin, *Intestinal Fatty Acid Binding Protein* (IFABP) und Diaminoxidase (DAO) in *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* unter Normalbedingungen und nach 7 Tagen DSS-Colitis gemessen. Zonulin ist ein Protein, welches die Permeabilität der Darmwand reguliert. Erhöhte Zonulinspiegel im Serum bei CED-Patienten weisen auf eine erhöhte Darmpermeabilität, auch *leaky gut*-Syndrom bezeichnet, hin (Caviglia et al., 2019). IFABP dagegen fungiert im Darm bei der Aufnahme und dem Transport von Fettsäuren im Darm und wird von Epithelzellen exprimiert. Bei Schädigungen des Darmepithels, wird IFABP in den Blutkreislauf freigesetzt und kann auf eine Schädigung der Epithelzellen und aktiver Entzündungsherde im Darm hinweisen (Levy et al., 2009; Zheng et al., 2021). DAO ist ein Enzym, welches im Darm für den Abbau von Histamin aus der Nahrung sorgt. Es wird von Epithelzellen synthetisiert und wird ebenfalls von geschädigten Zellen in den Blutkreislauf sezerniert, was zu steigenden DAO-Konzentrationen führt (Cai et al., 2019; Dvornikova et al., 2023). Die Serumlevel der Marker DAO, IFABP und Zonulin bei *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* unter DSS-Behandlung aufgrund der Schädigung des Epithels im Vergleich zur Wasserkontrolle an. Allerdings unterschieden sich die gemessenen Proteinkonzentrationen nicht signifikant zwischen den Genotypen. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus dem *in vitro* FD4 Assay, sodass der Einfluss einer epithelialen HMGB1-Deletion auf die Permeabilität in diesem Mausmodell nicht bestätigt werden kann.

Die intestinale Barrierefunktion hängt nicht nur von einer koordinierten Proliferation und Apoptose abhängig, sondern auch von *tight* und *adherens junctions*, die die Permeabilität regulieren. *Tight junctions* bilden eine Abdichtung zwischen benachbarten Epithelzellen und begrenzen den parazellulären Transport von Molekülen, Ionen und Wasser, indem sie Zellzwischenräume abdichten. Sie bestehen aus Transmembranproteinen wie Claudinen und Occludinen, die miteinander interagieren und eine dichte Barriere bilden (Krug et al., 2014; Suzuki, 2020). *Adherens junctions* dagegen verleihen dem Epithel seine mechanische Stabilität und erleichtern die Zell-Zell-Adhäsion durch Cadherin Proteine (Campbell et al., 2017). In dieser Arbeit wurde die Genexpression von *Cldn1-4*, *Ocln*, *Cdh1* sowohl im DSS-Modell als auch unter Normalbedingungen und in beiden Organoid Systemen untersucht. Es konnten hier keine Hinweise auf eine abweichende Genexpression der Marker in Abhängigkeit der Genotypen oder der DSS-Behandlung identifiziert werden. Dies untermauert die These, dass epitheliales HMGB1 im gezeigten Mausmodell keine Auswirkung auf die Expression von *tight* und *adherens junctions* hat.

#### 4.5. Epitheliales HMGB1 beeinflusst den Umbau der extrazellulären Matrix bei Entzündungsprozessen

Die statistische Auswertung der Sequenzierungsdaten von HMGB1 defizienten Epithelzellen im frühen Stadium der Colitis ergab eine signifikante Anreicherung von Pathways, welche mit der Organisation und Struktur der extrazellulären Matrix in Verbindung stehen (Abschnitt 3.12). Zudem wurden auch unter Normalbedingungen Pathways angereichert, welche der extrazellulären Region und Zell-Zell-Kommunikation zugeordnet werden. Für diese Pathways wurden dann die zugehörigen Transkriptionsfaktoren identifiziert. Hieraus geht hervor, dass die Transkriptionsfaktoren *Egr1*, *Nfkb1* und *Jun* unter DSS-Behandlung in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* überexprimiert sind. EGR1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher hauptsächlich Zielgene der extrazellulären Matrix oder ihrer Modulation wie Kollagen oder Fibronectin positiv reguliert. EGR1 ist an der Entwicklung, der Homöostase und den Heilungsprozessen von Geweben beteiligt. Darüber hinaus ist EGR häufig an der abnormalen Produktion von extrazellulärer Matrix bei fibrotischen Zuständen beteiligt (Alexander et al., 2002; Havis & Duprez, 2020).

Um die Frage nach möglichen Unterschieden im Aufbau der extrazellulären Matrix zu adressieren, wurde eine Sirius-Rot-Färbung an Kolon Querschnitten von *Hmgb1<sup>ff</sup>* und *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* unter *steady state* und nach 7 Tagen DSS-Behandlung durchgeführt (vgl. Abb. 23). Es konnte hier keine Abweichung in der Ansammlung von Kollagenstrukturen detektiert werden. Ferner wurde per qPCR-Analyse der gleichen Kohorten einiger Fibrose-assoziiierter Gene wie *Acta2*, *Fibronectin 1* oder *Col1a1* untersucht, diese ergab ebenfalls keine signifikanten Abweichungen der Expressionsniveaus. Dies deutet darauf hin, dass ein HMGB1 abhängiges Matrix *Remodelling* vorliegt, welches über die bloße Zusammensetzung der extrazellulären Matrix hinausgeht. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass ebenfalls keine Unterschiede in der qPCR Analyse verschiedener Muzine, welche für den Aufbau des Mucus entscheidend sind, oder durch die Visualisierung der extrazellulären Matrix durch die Alcianblau-HE Färbung festgestellt wurden (Fölsch, 2021) (vgl. Abschnitt 3.2).

Chronische Entzündungen im Darm können bei CEDs zu Gewebeschädigungen und Remodellierung des Gewebes führen, die schließlich in Fibrose münden. Durch fortschreitende fibrotische Prozesse wird das Gewebe zunehmen steifer und weniger funktional, was zu Komplikationen wie Darmverengungen und Organfunktionsstörungen führen kann. Bei der Fibrose spielen Epithelzellen eine wichtige Rolle. Indem sie Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten, aktivieren sie Fibroblasten und fördern die Bildung der extrazellulären Matrix. In einem reversiblen Prozess, der als epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bekannt ist,

nehmen epitheliale Zellen bestimmte Eigenschaften von mesenchymalen Zellen an. Auch bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa tritt diese Übergangsphase auf. Epitheliale Zellen verlieren während der EMT ihre Zell-Zell-Adhäsion und entwickeln eine verstärkte Migrations- und Invasionskapazität. Während dieses Prozesses kommt u.a. zu einer Herunterregulation epithelialer Marker wie *adherens* und *tight junctions* (Lovisa et al., 2019; Macias-Ceja et al., 2023).

In der Literatur gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen HMGB1 und extrazellulärer Matrix- sowie Kollagen-Produktion. Lee et al. stellten in einer Studie fest, dass extrazelluläres HMGB1 über das Signaling via TLRs und RAGE die Proliferation menschlicher Hautfibroblasten anregte und als profibrogen wirksames Molekül die Kollagenproduktion der Haut anregen kann (Lee et al., 2018). In einer weiteren Publikation wird beschrieben, dass HMGB1 im Kontext einer chronischen Rhinusitis im Nasenepithel die Bildung der extrazellulären Matrix durch eine gesteigerte Kollagen Produktion über den RAGE, p38, JNK und AP-1 Signalweg fördert (Lee et al., 2021). Diese Beobachtungen konnten im murinen DSS-Modell nicht bestätigt werden, da weder auf qPCR Ebene, noch durch Sirius rot bzw. Alcianblau-HE Färbungen Hinweise auf HMGB1-abhängige Effekte auf eine Fibrose identifiziert werden konnten. Dies unterstreicht die kontextabhängige Funktion von HMGB1. In einem nächsten Schritt die HMGB1 abhängige Wundheilung über einen Scratch Assay *in vitro* untersucht. Es konnte hier kein Unterschied in der Wundheilungskapazität zwischen HMGB1-positiven (HMGB1 +/+) und HMGB1-negativen (HMGB1 -/-) MC38-Zellen dokumentiert werden, sodass intrazelluläres HMGB1 hier keinen Einfluss zu haben scheint. Zur gleichen Schlussfolgerung kamen Gross und Kollegen in ihrer Publikation (Gross et al., 2020). Sie untersuchten HCE- Epithelzellen in einem Scratch Assay auf die Fähigkeit zur Wundheilung nach der Aktivierung des RAGE-Rezeptors durch hinzugefügtes, extrazelluläres HMGB1 im Zellkulturmedium. Auch sie konnten keinen Einfluss von HMGB1 und seinen oxidierten, reduzierten oder disulfid Isoformen auf die Wundheilung nachweisen.

Möglicherweise reicht der Versuchszeitraum von 7 Tagen DSS-Behandlung und Saktifizierung der Versuchstiere am folgenden Tag nicht aus, um diese Prozesse abzubilden. Da die Tiere zu einem Zeitpunkt der akuten intestinalen Inflammation analysiert werden, sind Wundheilungs- oder fibrotische Prozesse noch nicht initiiert und abgeschlossen. Zukünftig wäre es daher sinnvoll, die Wundheilungsprozesse der Tiere nach einer DSS-Colitis genauer zu untersuchen. Dies könnte Hinweise auf mögliche HMGB1-abhängige Unterschiede beim Umbau der extrazellulären Matrix bzw. der Kollagenproduktion und Fibrose-Verläufen nach einer Regenerationsphase liefern. Da Epithelzellen maßgeblich an fibrotischen Prozessen sowie der epithelialen mesenchymalen Transition beteiligt sind, wäre dies denkbar. Insbesondere die Untersuchung von Zell-Zell-Verbindungen abheilender Läsionen wäre hier von Interesse.

#### 4.6. Extrazelluläres HMGB1 besitzt eine Signaling Funktion auf Epithelzellen und myeloide Zellen

Die Behandlung von wildtypischen MC38-Zellen mit reduziertem oder disulfid HMGB1 führte zu einer moderaten Erhöhung von Akt123, Erk1/2, Creb, eNOS, WNK und c-Jun (vgl. Abschnitt 3.13). Auch im Westernblot wurde diese Pathway-Aktivierung durch die Analyse der *Downstream Targets* nach Behandlung der Zellen mit den HMGB1 Isoformen nachgewiesen. Die Aktivierung dieser Pathways durch HMGB1 ist auch in der Literatur beschrieben:

Der PI3K/AKT Signalweg ist ein intrazellulärer Signalweg, der z.B. in verschiedenen Krebsarten überexprimiert ist und die Proliferation, Migration und das Überleben von Tumorzellen steuert. HMGB1 ist ein wichtiger Regulator des PI3K/AKT Signalwegs in verschiedenen Zellen einschließlich Endothelzellen oder Fibroblasten (Idoudi et al., 2023). Interessanterweise ist HMGB1 auch im Kontext des AKT-Signalweges und der Regulation der epithelialen mesenchymalen Transition in der Prostata beschrieben worden (vgl. Abschnitt 4.4) (Lv et al., 2019). Im chronisch-entzündlichen CAC-Modell wurde gezeigt, dass HMGB1 über das ERK1/2 - Signaling die Proliferation in Kolon Krebs Zellen beeinflusst (Tan et al., 2020). In einer weiteren Studie induziert extrazelluläres HMGB1 während der Angiogenese als ein Teil der Wundheilung in endothelialen Progenitorzellen die Zellmigration über RAGE vermitteltes PI3K/AKT/eNos *Signaling* (Zhang et al., 2019).

Die epitheliale HMGB1-Deletion führte zusätzlich zu einer stark abweichenden Reprogrammierung von Epithelzellen und in einem geringeren Ausmaß zu einer transkriptionellen Veränderung der myeloiden Zellen in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* nach 4 Tagen DSS-Behandlung (vgl. Abschnitt 3.12). Diese Beobachtungen legen nahe, dass in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* ein verändertes Signaling an Epithelzellen und myeloide Zellen vorliegt. Dies könnte entweder eine Veränderung der Signaltransduktion durch fehlendes intrazelluläres HMGB1 (bei *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*), über extrazelluläres HMGB1 oder einer Kombination beider Prozesse bedeuten. Die Sequenzierungsdaten aus *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* deuten auf eine Umprogrammierung der Epithelzellen hin, die durch Veränderungen der Signalwege im Zusammenhang mit dem Umbau der extrazellulären Matrix oder ihrer Organisation in Zusammenhang stehen und sich in einer veränderten Wundheilung oder einer veränderten Zell-Zell-Verbindung bei der Heilung der Läsionen ausdrücken könnten. Die gleichen Tendenzen zeigten sich beim Sequenzieren größengleicher Darmtumore aus *Apc<sup>+/-min</sup> Hmgb1<sup>fl/fl</sup>* und *Apc<sup>+/-min</sup> Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>*, in denen eine HMGB1-Deletion erneut mit der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix und Zell-Zell-Übertragungen als potenziellem Wirkmechanismus von HMGB1 in Verbindung gebracht wurde, während der Aufbau der extrazellulären Matrix weitgehend unverändert blieb.

In Ergänzung zu den in Abschnitt 4.5 vorgeschlagenen Experimenten zur Untersuchung der extrazellulären Matrix, der Kollagenproduktion und Wundheilung wäre es daher in Zukunft von Bedeutung, weitere Signalwege und *downstream targets* zu analysieren, um ein vollständigeres Bild des Pathomechanismus zu erhalten. Der in dieser Arbeit verwendete Proteom Profiler detektiert 37 Proteinkinasen. Im menschlichen Genom sind jedoch über 500 Kinasen beschrieben (Anderson et al., 2023; Caenepeel et al., 2004). Die Daten sind an dieser Stelle entsprechend technisch limitiert und müssten durch weiterführende Untersuchungen komplementiert werden.

#### 4.7. Ausblick

Epitheliales HMGB1 ist an der Aufrechterhaltung der Darmbarriere unter akuten Stressbedingungen beteiligt, welches sich in einer Verschlimmerung der DSS-Kolitis in *Hmgb1<sup>ΔIEC</sup>* zeigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass HMGB1 eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung und Reprogrammierung von Epithelzellen und myeloiden Immunzellen als Reaktion auf Verletzungen und Entzündungen im Gastrointestinaltrakt spielt. Weitere Forschungsarbeiten sind notwendig, um die spezifischen molekularen Mechanismen aufzuklären, durch die extrazelluläres HMGB1 das Verhalten von Epithelzellen und myeloiden Zellen im entzündeten Kolon beeinflusst. Aufgrund der technischen Limitationen der hier vorgestellten Experimente kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass HMGB1 auch andere Zelltypen beeinflusst und weitere Signalwirkungen auf die Wundheilung hat. Zukünftig sollten weitere Untersuchungen zu den Effekten von HMGB1 und seinen Isoformen an der Darmbarriere durchgeführt werden, um Ansätze HMGB1-gerichtete Interventionsansätze für CED-Patienten zu identifizieren. Experimentell sollten insbesondere Aspekte der Wundheilung und des *Remodellings* der extrazellulären Matrix an intestinalen Läsionen näher untersucht werden.

## A. Literaturverzeichnis

- Alexander, D., Judex, M., Meyringer, R., Weis-Klemm, M., Gay, S., Muller-Ladner, U., & Aicher, W. K. (2002). Transcription factor Egr-1 activates collagen expression in immortalized fibroblasts or fibrosarcoma cells. *Biol Chem*, 383(12), 1845-1853. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.208>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2019). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity: (Trends in Immunology 39, 677-696, 2018). *Trends Immunol*, 40(2), 174. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.12.008>
- Anderson, B., Rosston, P., Ong, H. W., Hossain, M. A., Davis-Gilbert, Z. W., & Drewry, D. H. (2023). How many kinases are druggable? A review of our current understanding. *Biochem J*, 480(16), 1331-1363. <https://doi.org/10.1042/BCJ20220217>
- Antoine, D. J., Harris, H. E., Andersson, U., Tracey, K. J., & Bianchi, M. E. (2014). A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins. *Mol Med*, 20(1), 135-137. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00022>
- Arnott, I. D., Kingstone, K., & Ghosh, S. (2000). Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 35(11), 1163-1169. <https://doi.org/10.1080/003655200750056637>
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 369(9573), 1641-1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)
- Bianchi, M. E. (2009). HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol*, 86(3), 573-576. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008585>
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., & Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171(4), 603-614. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-197. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03612-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4)
- Blander, J. M. (2018). On cell death in the intestinal epithelium and its impact on gut homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol*, 34(6), 413-419. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000481>
- Boyapati, R. K., Rossi, A. G., Satsangi, J., & Ho, G. T. (2016). Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. *Mucosal Immunology*, 9(3), 567-582. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.14>

- Boyle, E. I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J. M., & Sherlock, G. (2004). GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*, 20(18), 3710-3715. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth456>
- Burclaff, J., Bliton, R. J., A Breau, K., Hinesley, C., Sweet, C., Zheng, A., Bankaitis, E., Ariel, P., & Magness, S. T. (2022). SOX9 elongates cell cycle phases and biases fate decisions in human intestinal stem cells. *Cold Spring Harbour Laboratory*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2022.11.03.514885>
- Burnet, F. M. (1969). Cellular immunology: self and not-self *Melbourne University Press*.
- Burnet, F. M., & Fenner, F. (1949). The production of antibodies. *Cornell University, Macmillan*.
- Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T., & Manning, G. (2004). The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32), 11707-11712. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306880101>
- Cai, J., Chen, H., Weng, M., Jiang, S., & Gao, J. (2019). Diagnostic and Clinical Significance of Serum Levels of D-Lactate and Diamine Oxidase in Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract*, 2019, 8536952. <https://doi.org/10.1155/2019/8536952>
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S., & Bianchi, M. E. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet*, 22(3), 276-280. <https://doi.org/10.1038/10338>
- Campbell, H. K., Maiers, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res*, 358(1), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.061>
- Canals, M., Poole, D. P., Veldhuis, N. A., Schmidt, B. L., & Bunnett, N. W. (2019). G-Protein-Coupled Receptors Are Dynamic Regulators of Digestion and Targets for Digestive Diseases. *Gastroenterology*, 156(6), 1600-1616. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.266>
- Caviglia, G. P., Dughera, F., Ribaldone, D. G., Rosso, C., Abate, M. L., Pellicano, R., Bresso, F., Smedile, A., Saracco, G. M., & Astegiano, M. (2019). Serum zonulin in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. *Minerva Med*, 110(2), 95-100. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.18.05787-7>
- Chang, S. Y., Lee, S. N., Yang, J. Y., Kim, D. W., Yoon, J. H., Ko, H. J., Ogawa, M., Sasakawa, C., & Kweon, M. N. (2013). Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: a murine model. *PLoS One*, 8(11), e81095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081095>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, 104, 15 25 11-15 25 14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>

- Chelakkot, C., Ghim, J., Rajasekaran, N., Choi, J. S., Kim, J. H., Jang, M. H., Shin, Y. K., Suh, P. G., & Ryu, S. H. (2017). Intestinal Epithelial Cell-Specific Deletion of PLD2 Alleviates DSS-Induced Colitis by Regulating Occludin. *Sci Rep*, 7(1), 1573. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01797-y>
- Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*, 50(8), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>
- Chen, L., Li, J., Ye, Z., Sun, B., Wang, L., Chen, Y., Han, J., Yu, M., Wang, Y., Zhou, Q., Seidler, U., Tian, D., & Xiao, F. (2020). Anti-High Mobility Group Box 1 Neutralizing-Antibody Ameliorates Dextran Sodium Sulfate Colitis in Mice. *Front Immunol*, 11, 585094. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585094>
- Chen, R., Kang, R., & Tang, D. (2022). The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med*, 54(2), 91-102. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00736-w>
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2), 274-284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>
- Cohn, M. (2017). Giving Context to Non-self-marker Theories of Immune Responsiveness. *Scand J Immunol*, 86(3), 124-129. <https://doi.org/10.1111/sji.12579>
- Dame, M. K., Attili, D., McClintock, S. D., Dedhia, P. H., Ouillette, P., Hardt, O., Chin, A. M., Xue, X., Laliberte, J., Katz, E. L., Newsome, G. M., Hill, D. R., Miller, A. J., Tsai, Y. H., Agorku, D., Altheim, C. H., Bosio, A., Simon, B., Samuelson, L. C., . . . Colacino, J. A. (2018). Identification, isolation and characterization of human LGR5-positive colon adenoma cells. *Development*, 145(6). <https://doi.org/10.1242/dev.153049>
- Dave, S. H., Tilstra, J. S., Matsuoka, K., Li, F., DeMarco, R. A., Beer-Stolz, D., Sepulveda, A. R., Fink, M. P., Lotze, M. T., & Plevy, S. E. (2009). Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol*, 86(3), 633-643. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008662>
- del Rocio Encarnacion-Garcia, M., Nava, P. (2022). *Tight Junctions* (L. González-Mariscal, Ed. 1st 2022 ed.). Springer Cham. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-97204-2>
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 349-364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Dong, C. X., Zhao, W., Solomon, C., Rowland, K. J., Ackerley, C., Robine, S., Holzenberger, M., Gonska, T., & Brubaker, P. L. (2014). The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function. *Endocrinology*, 155(2), 370-379. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1871>
- Dotti, I., & Salas, A. (2018). Potential Use of Human Stem Cell-Derived Intestinal Organoids to Study Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 24(12), 2501-2509. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy275>

- Dvornikova, K. A., Platonova, O. N., & Bystrova, E. Y. (2023). Inflammatory Bowel Disease: Crosstalk between Histamine, Immunity, and Disease. *Int J Mol Sci*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/ijms24129937>
- Eichele, D. D., & Kharbanda, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 23(33), 6016-6029. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6016>
- Elmentaite, R., Kumasaka, N., Roberts, K., Fleming, A., Dann, E., King, H. W., Kleshchevnikov, V., Dabrowska, M., Pritchard, S., Bolt, L., Vieira, S. F., Mamanova, L., Huang, N., Perrone, F., Goh Kai'En, I., Lisgo, S. N., Katan, M., Leonard, S., Oliver, T. R. W., . . . Teichmann, S. A. (2021). Cells of the human intestinal tract mapped across space and time. *Nature*, 597(7875), 250-255. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03852-1>
- Eminaga, S., Teekakirikul, P., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (2016). Detection of Cell Proliferation Markers by Immunofluorescence Staining and Microscopy Imaging in Paraffin-Embedded Tissue Sections. *Curr Protoc Mol Biol*, 115, 14 25 11-14 25 14. <https://doi.org/10.1002/cpmb.13>
- Fair, K. L., Colquhoun, J., & Hannan, N. R. F. (2018). Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373(1750). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0217>
- Fava, F., & Danese, S. (2011). Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol*, 17(5), 557-566. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i5.557>
- Fleischer, J., Bumbalo, R., Bautze, V., Strotmann, J., & Breer, H. (2015). Expression of odorant receptor Olfr78 in enteroendocrine cells of the colon. *Cell Tissue Res*, 361(3), 697-710. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2165-0>
- Foelsch, K., Pelczar, P., Zierz, E., Kondratowicz, S., Qi, M., Muller, C., Alawi, M., Huebener, S., Clauditz, T., Gagliani, N., Huber, S., & Huebener, P. (2024). Intestinal epithelia and myeloid immune cells shape colitis severity and colorectal carcinogenesis via High-mobility group box protein 1. *J Crohns Colitis*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae017>
- Fölsch, K. (2021). *Der Einfluss von HMGB1 aus unterschiedlichen Zelltypen auf Entzündungs- und Karzinogenese-prozesse im murinen Darm* [Doctoral Dissertation, Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky]. <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/9637>
- Fries, W., Renda, M. C., Lo Presti, M. A., Raso, A., Orlando, A., Oliva, L., Giofre, M. R., Maggio, A., Mattaliano, A., Macaluso, A., & Cottone, M. (2005). Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol*, 100(12), 2730-2736. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00325.x>
- G., K., A., M., Alt, Attenberger, & Sycha. (2015). *Radiologische Diagnostik Abdomen und Thorax* (Vol. 1). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b-0035-109206>

- Galluzzi, L., Lopez-Soto, A., Kumar, S., & Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity*, *44*(2), 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.020>
- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, *15*(4), 226-237. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>
- Gross, C., Belville, C., Lavergne, M., Choltus, H., Jabaudon, M., Blondonnet, R., Constantin, J. M., Chiambaretta, F., Blanchon, L., & Sapin, V. (2020). Advanced Glycation End Products and Receptor (RAGE) Promote Wound Healing of Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *61*(3), 14. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.3.14>
- Gunzel, D., & Fromm, M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*, *2*(3), 1819-1852. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>
- Havis, E., & Duprez, D. (2020). EGR1 Transcription Factor is a Multifaceted Regulator of Matrix Production in Tendons and Other Connective Tissues. *Int J Mol Sci*, *21*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051664>
- Hibi, T., & Ogata, H. (2006). Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, *41*(1), 10-16. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1744-3>
- Hooper, K. M., Barlow, P. G., Henderson, P., & Stevens, C. (2019). Interactions Between Autophagy and the Unfolded Protein Response: Implications for Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, *25*(4), 661-671. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy380>
- Horowitz, A., Chanez-Paredes, S. D., Haest, X., & Turner, J. R. (2023). Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *20*(7), 417-432. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00766-3>
- Hu, Z., Wang, X., Gong, L., Wu, G., Peng, X., & Tang, X. (2015). Role of high-mobility group box 1 protein in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*, *64*(8), 557-563. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0841-x>
- Huebener, P., Gwak, G. Y., Pradere, J. P., Quinzii, C. M., Friedman, R., Lin, C. S., Trent, C. M., Mederacke, I., Zhao, E., Dapito, D. H., Lin, Y., Goldberg, I. J., Czaja, M. J., & Schwabe, R. F. (2014). High-mobility group box 1 is dispensable for autophagy, mitochondrial quality control, and organ function in vivo. *Cell Metab*, *19*(3), 539-547. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.014>
- Idoudi, S., Bedhiafi, T., Pedersen, S., Elahtem, M., Alremawi, I., Akhtar, S., Dermime, S., Merhi, M., & Uddin, S. (2023). Role of HMGB1 and its associated signaling pathways in human malignancies. *Cell Signal*, *112*, 110904. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110904>
- Jin, X., You, L., Qiao, J., Han, W., & Pan, H. (2024). Autophagy in colitis-associated colon cancer: exploring its potential role in reducing initiation and preventing IBD-Related CAC development. *Autophagy*, *20*(2), 242-258. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2259214>

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Juneja, V. R., McGuire, K. A., Manguso, R. T., LaFleur, M. W., Collins, N., Haining, W. N., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med*, 214(4), 895-904. <https://doi.org/10.1084/jem.20160801>
- Kamm, M. A. (2017). Rapid changes in epidemiology of inflammatory bowel disease. *Lancet*, 390(10114), 2741-2742. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32669-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32669-7)
- Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X. G., Yan, Z., Sun, X., Wang, H., Wang, Q., Tsung, A., Billiar, T. R., Zeh, H. J., 3rd, Lotze, M. T., & Tang, D. (2014). HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med*, 40, 1-116. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.05.001>
- Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(12), 720-727. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150>
- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 152(2), 313-321 e312. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020>
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., & Wojtowicz, J. M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*, 115(1), 97-105. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(02)00007-9)
- Kobayashi, T., Siegmund, B., Le Berre, C., Wei, S. C., Ferrante, M., Shen, B., Bernstein, C. N., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., & Hibi, T. (2020). Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers*, 6(1), 74. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>
- Kojima, T., Shindo, Y., Konno, T., Kodera, Y., Arai, W., Miyakawa, M., Ohwada, K., Tanaka, H., Tsujiwaki, M., Sakuma, Y., Kikuchi, S., Ohkuni, T., Takano, K., Watanabe, A., & Kohno, T. (2022). Dysfunction of epithelial permeability barrier induced by HMGB1 in 2.5D cultures of human epithelial cells. *Tissue Barriers*, 10(2), 1972760. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1972760>
- Kong, C., Li, S. M., Yang, H., Xiao, W. D., Cen, Y. Y., Wu, Y., Li, W. M., Sun, D. L., & Xu, P. Y. (2019). Screening and combining serum biomarkers to improve their diagnostic performance in the detection of intestinal barrier dysfunction in patients after major abdominal surgery. *Ann Transl Med*, 7(16), 388. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.07.102>
- Kotlo, K., Anbazhagan, A. N., Priyamvada, S., Jayawardena, D., Kumar, A., Chen, Y., Xia, Y., Finn, P. W., Perkins, D. L., Dudeja, P. K., & Layden, B. T. (2020). The olfactory G protein-coupled receptor (Olfr-78/OR51E2) modulates the intestinal response to colitis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 318(3), C502-C513. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00454.2019>

- Krug, S. M., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 36, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.002>
- Kumar, A. V., Mills, J., & Lapierre, L. R. (2022). Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front Cell Dev Biol*, 10, 793328. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>
- La Torre, D., Van Oudenhove, L., Vanuytsel, T., & Verbeke, K. (2023). Psychosocial stress-induced intestinal permeability in healthy humans: What is the evidence? *Neurobiol Stress*, 27, 100579. <https://doi.org/10.1016/j.yynstr.2023.100579>
- Lang, G. (2013). *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* (Zweite, überarbeitete und aktualisierte Auflage. ed.). Springer Vienna : Imprint: Springer. [https://eu04.alma.exlibrisgroup.com/view/uresolver/44LIV\\_INST/openurl?u.ignore\\_date\\_coverage=true&portfolio\\_pid=53260674810007351&Force\\_direct=true](https://eu04.alma.exlibrisgroup.com/view/uresolver/44LIV_INST/openurl?u.ignore_date_coverage=true&portfolio_pid=53260674810007351&Force_direct=true)
- Lee, S. H., Cho, J. H., Park, J. H., Cho, J. S., & Lee, H. M. (2021). High Mobility Group Box Chromosomal Protein-1 Induces Myofibroblast Differentiation and Extracellular Matrix Production via RAGE, p38, JNK and AP-1 Signaling Pathways in Nasal Fibroblasts. *Am J Rhinol Allergy*, 35(6), 774-780. <https://doi.org/10.1177/1945892421998142>
- Lee, W. J., Song, S. Y., Roh, H., Ahn, H. M., Na, Y., Kim, J., Lee, J. H., & Yun, C. O. (2018). Profibrogenic effect of high-mobility group box protein-1 in human dermal fibroblasts and its excess in keloid tissues. *Sci Rep*, 8(1), 8434. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26501-6>
- Leung, D. Y. M., Sampson, H. A., & Akdis, C. A. (2011). *Pediatric allergy : principles and practice* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-53668-9>
- Levy, E., Menard, D., Delvin, E., Montoudis, A., Beaulieu, J. F., Mailhot, G., Dube, N., Sinnett, D., Seidman, E., & Bendayan, M. (2009). Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem Cell Biol*, 132(3), 351-367. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0608-y>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329-333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Lin, L., Lu, Z., Chen, L., & Li, X. (2009). S1673 HMGB1 Contributes to the Development of Acute Murine Colitis. *Gastroenterology*, 5(136), A-247. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(09\)61119-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-5085(09)61119-7)
- Linsalata, M., Riezzo, G., D'Attoma, B., Clemente, C., Orlando, A., & Russo, F. (2018). Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. *BMC Gastroenterol*, 18(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0888-6>
- Liu, S., Stolz, D. B., Sappington, P. L., Macias, C. A., Killeen, M. E., Tenhunen, J. J., Delude, R. L., & Fink, M. P. (2006). HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and

- contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(4), C990-999. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00308.2005>
- Lotze, M. T., & Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 5(4), 331-342. <https://doi.org/10.1038/nri1594>
- Lovisa, S., Genovese, G., & Danese, S. (2019). Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 13(5), 659-668. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy201>
- Lu, B., Antoine, D. J., Kwan, K., Lundback, P., Wahamaa, H., Schierbeck, H., Robinson, M., Van Zoelen, M. A., Yang, H., Li, J., Erlandsson-Harris, H., Chavan, S. S., Wang, H., Andersson, U., & Tracey, K. J. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(8), 3068-3073. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316925111>
- Lu, Q., Yang, M. F., Liang, Y. J., Xu, J., Xu, H. M., Nie, Y. Q., Wang, L. S., Yao, J., & Li, D. F. (2022). Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. *J Inflamm Res*, 15, 1825-1844. <https://doi.org/10.2147/JIR.S353038>
- Lv, D. J., Song, X. L., Huang, B., Yu, Y. Z., Shu, F. P., Wang, C., Chen, H., Zhang, H. B., & Zhao, S. C. (2019). HMGB1 Promotes Prostate Cancer Development and Metastasis by Interacting with Brahma-Related Gene 1 and Activating the Akt Signaling Pathway. *Theranostics*, 9(18), 5166-5182. <https://doi.org/10.7150/thno.33972>
- Ma, J., Rubin, B. K., & Voynow, J. A. (2018). Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*, 154(1), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>
- Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A., & Said, H. M. (2005). Mechanism of TNF-alpha modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288(3), G422-430. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2004>
- Macias-Ceja, D. C., Mendoza-Ballesteros, M. T., Ortega-Albiach, M., Barrachina, M. D., & Ortiz-Masia, D. (2023). Role of the epithelial barrier in intestinal fibrosis associated with inflammatory bowel disease: relevance of the epithelial-to mesenchymal transition. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1258843. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1258843>
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., & Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13(1), 133-140. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>
- Madsen, K. L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J. S., Jewell, L. D., & Fedorak, R. N. (1999). Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis*, 5(4), 262-270. <https://doi.org/10.1097/00054725-199911000-00004>

- Maeda, S., Hikiba, Y., Shibata, W., Ohmae, T., Yanai, A., Ogura, K., Yamada, S., & Omata, M. (2007). Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(2), 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.065>
- Magré, L., Versteegen, M. M. A., Buschow, S., Laan, L. J. W. v. d., Peppelenbosch, M., & Desai, J. (2023). Emerging organoid-immune co-culture models for cancer research: from oncoimmunology to personalized immunotherapies. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(5), e006290. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006290>
- Manthey, C. F., Reher, D., & Huber, S. (2021). What is confirmed in the treatment of chronic inflammatory bowel diseases. *Internist (Berl)*, 62(12), 1269-1279. <https://doi.org/10.1007/s00108-021-01207-6>
- Marr, E. E., Mulhern, T. J., Welch, M., Keegan, P., Caballero-Franco, C., Johnson, B. G., Kasaian, M., Azizgolshani, H., Petrie, T., Charest, J., & Wiелlette, E. (2023). A platform to reproducibly evaluate human colon permeability and damage. *Sci Rep*, 13(1), 8922. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36020-8>
- Martini, E., Krug, S. M., Siegmund, B., Neurath, M. F., & Becker, C. (2017). Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 4(1), 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.007>
- Matsuoka, K., Davé, S., Tilstra, J., Li, F., DeMarco, R., Fink, M., Lotze, M., & Plevy, S. (2007). O-0003: PAMPs and DAMPs in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(suppl\_5), 643-643. <https://doi.org/10.1097/00054725-200705005-00003>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>
- Matzinger, P. (2001). Essay 1: the Danger model in its historical context. *Scand J Immunol*, 54(1-2), 4-9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00974.x>
- Miyakawa, M., Konno, T., Kohno, T., Kikuchi, S., Tanaka, H., & Kojima, T. (2020). Increase in Epithelial Permeability and Cell Metabolism by High Mobility Group Box 1, Inflammatory Cytokines and TPEN in Caco-2 Cells as a Novel Model of Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228434>
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>
- Mizutani, T., & Clevers, H. (2020). Primary Intestinal Epithelial Organoid Culture. *Methods Mol Biol*, 2171, 185-200. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0747-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0747-3_11)
- Mohammadi, S., Morell-Perez, C., Wright, C. W., Wyche, T. P., White, C. H., Sana, T. R., & Lieberman, L. A. (2021). Assessing donor-to-donor variability in human intestinal organoid cultures. *Stem Cell Reports*, 16(9), 2364-2378. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.07.016>

- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., & Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, *142*(1), 46-54 e42; quiz e30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, *26*(3-4), 152-162. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
- Murphy, K., Weaver, C., & Janeway, C. (2017). *Janeway's immunobiology* (9th edition. ed.). Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, an informa business. [http://eu.alma.exlibrisgroup.com/view/uresolver/44WHELFW\\_SWA/openurl?u.ignore\\_date\\_coverage=true&rft.mms\\_id=998492393002417](http://eu.alma.exlibrisgroup.com/view/uresolver/44WHELFW_SWA/openurl?u.ignore_date_coverage=true&rft.mms_id=998492393002417)
- Nanini, H. F., Bernardazzi, C., Castro, F., & de Souza, H. S. P. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory bowel disease: From biomarkers to therapeutic targets. *World J Gastroenterol*, *24*(41), 4622-4634. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i41.4622>
- 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. *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)
- Ni, Y., Teng, T., Li, R., Simonyi, A., Sun, G. Y., & Lee, J. C. (2017). TNFalpha alters occludin and cerebral endothelial permeability: Role of p38MAPK. *PLoS One*, *12*(2), e0170346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170346>
- Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., Elci, B., Brandenberg, N., Kolotuev, I., Gjorevski, N., Clevers, H., & Lutolf, M. P. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*, *585*(7826), 574-578. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2724-8>
- O'Connell, L., Winter, D. C., & Aherne, C. M. (2021). The Role of Organoids as a Novel Platform for Modeling of Inflammatory Bowel Disease. *Front Pediatr*, *9*, 624045. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.624045>
- Odenwald, M. A., & Turner, J. R. (2013). Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*, *11*(9), 1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.07.001>
- Okumura, R., & Takeda, K. (2016). Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *92*(9), 423-435. <https://doi.org/10.2183/pjab.92.423>
- Papp, D., Korcsmaros, T., & Hautefort, I. (2024). Revolutionizing immune research with organoid-based co-culture and chip systems. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1093/cei/uxae004>

- Parker, A., Maclaren, O. J., Fletcher, A. G., Muraro, D., Kreuzaler, P. A., Byrne, H. M., Maini, P. K., Watson, A. J., & Pin, C. (2017). Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. *FASEB J*, *31*(2), 636-649. <https://doi.org/10.1096/fj.201601002>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, *14*(3), 141-153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Picchianti-Diamanti, A., Panebianco, C., Salemi, S., Sorgi, M. L., Di Rosa, R., Tropea, A., Sgrulletti, M., Salerno, G., Terracciano, F., D'Amelio, R., Lagana, B., & Paziienza, V. (2018). Analysis of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis Patients: Disease-Related Dysbiosis and Modifications Induced by Etanercept. *Int J Mol Sci*, *19*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102938>
- Pradeu, T., & Cooper, E. L. (2012). The danger theory: 20 years later. *Front Immunol*, *3*, 287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00287>
- Rallabandi, H. R., Yang, H., Oh, K. B., Lee, H. C., Byun, S. J., & Lee, B. R. (2020). Evaluation of Intestinal Epithelial Barrier Function in Inflammatory Bowel Diseases Using Murine Intestinal Organoids. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *17*(5), 641-650. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00278-0>
- Ramalingam, S., Daughtridge, G. W., Johnston, M. J., Gracz, A. D., & Magness, S. T. (2012). Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *302*(1), G10-20. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00277.2011>
- Rauch, J., Volinsky, N., Romano, D., & Kolch, W. (2011). The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal*, *9*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-23>
- Russell, R. K., & Satsangi, J. (2004). IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *18*(3), 525-539. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.12.006>
- Ruzankina, Y., Pinzon-Guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., Zediak, V. P., Velez, M., Bhandoola, A., & Brown, E. J. (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell*, *1*(1), 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.03.002>
- Saez, A., Herrero-Fernandez, B., Gomez-Bris, R., Sanchez-Martinez, H., & Gonzalez-Granado, J. M. (2023). Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *Int J Mol Sci*, *24*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021526>
- Sappington, P. L., Yang, R., Yang, H., Tracey, K. J., Delude, R. L., & Fink, M. P. (2002). HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology*, *123*(3), 790-802. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.35391>

- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G., Van Es, J. H., Van den Brink, S., Van Houdt, W. J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, *141*(5), 1762-1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262-265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Sato, Y., Tsujinaka, S., Miura, T., Kitamura, Y., Suzuki, H., & Shibata, C. (2023). Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: Epidemiology, Etiology, Surveillance, and Management. *Cancers (Basel)*, *15*(16). <https://doi.org/10.3390/cancers15164154>
- Schoepfer, A. M., Trummel, M., Seeholzer, P., Seibold-Schmid, B., & Seibold, F. (2008). Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies. *Inflamm Bowel Dis*, *14*(1), 32-39. <https://doi.org/10.1002/ibd.20275>
- Schultz, I., & Keita, A. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Shah, S. C., & Itzkowitz, S. H. (2022). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*, *162*(3), 715-730 e713. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.035>
- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res*, *4*, 14. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., Penninger, J. M., & Molkenin, J. D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res*, *89*(1), 20-25. <https://doi.org/10.1161/hh1301.092687>
- Sommer, K., Wiendl, M., Muller, T. M., Heidbreder, K., Voskens, C., Neurath, M. F., & Zundler, S. (2021). Intestinal Mucosal Wound Healing and Barrier Integrity in IBD-Crosstalk and Trafficking of Cellular Players. *Front Med (Lausanne)*, *8*, 643973. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.643973>
- Soundararajan, M., Willard, F. S., Kimple, A. J., Turnbull, A. P., Ball, L. J., Schoch, G. A., Gileadi, C., Fedorov, O. Y., Dowler, E. F., Higman, V. A., Hutsell, S. Q., Sundstrom, M., Doyle, D. A., & Siderovski, D. P. (2008). Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, *105*(17), 6457-6462. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801508105>
- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*, *20*(2), 107-126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>

- Strober, W., Fuss, I., & Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 117(3), 514-521. <https://doi.org/10.1172/JCI30587>
- Su, L., Nalle, S. C., Shen, L., Turner, E. S., Singh, G., Breskin, L. A., Khramtsova, E. A., Khramtsova, G., Tsai, P. Y., Fu, Y. X., Abraham, C., & Turner, J. R. (2013). TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology*, 145(2), 407-415. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.011>
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D. R., Nalle, S. C., Sullivan, E. A., Meddings, J. B., Abraham, C., & Turner, J. R. (2009). Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology*, 136(2), 551-563. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.081>
- Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Anim Sci J*, 91(1), e13357. <https://doi.org/10.1111/asj.13357>
- Tajik, N., Frech, M., Schulz, O., Schalter, F., Lucas, S., Azizov, V., Durholz, K., Steffen, F., Omata, Y., Rings, A., Bertog, M., Rizzo, A., Iljazovic, A., Basic, M., Kleyer, A., Culemann, S., Kronke, G., Luo, Y., Uberla, K., . . . Zaiss, M. M. (2020). Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nature Communications*, 11(1), 1995. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15831-7>
- Takaishi, H., Kanai, T., Nakazawa, A., Sugata, F., Nikai, A., Yoshizawa, S., Hamamoto, Y., Funakoshi, S., Yajima, T., Iwao, Y., Takemura, M., Ozaki, S., & Hibi, T. (2012). Anti-high mobility group box 1 and box 2 non-histone chromosomal proteins (HMGB1/HMGB2) antibodies and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA): accuracy in differentially diagnosing UC and CD and correlation with inflammatory bowel disease phenotype. *J Gastroenterol*, 47(9), 969-977. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0566-3>
- Takashima, S., Martin, M. L., Jansen, S. A., Fu, Y., Bos, J., Chandra, D., O'Connor, M. H., Mertelsmann, A. M., Vinci, P., Kuttiyara, J., Devlin, S. M., Middendorp, S., Calafiore, M., Egorova, A., Kleppe, M., Lo, Y., Shroyer, N. F., Cheng, E. H., Levine, R. L., . . . Hanash, A. M. (2019). T cell-derived interferon-gamma programs stem cell death in immune-mediated intestinal damage. *Sci Immunol*, 4(42). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aay8556>
- Takeuchi, K., Maiden, L., & Bjarnason, I. (2004). Genetic aspects of intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Novartis Found Symp*, 263, 151-158; discussion 159-163, 211-158. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15669640>
- Tan, G., Huang, C., Chen, J., & Zhi, F. (2020). HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway. *J Hematol Oncol*, 13(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00985-0>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4)

- Tavakoli, P., Vollmer-Conna, U., Hadzi-Pavlovic, D., & Grimm, M. C. (2021). A Review of Inflammatory Bowel Disease: A Model of Microbial, Immune and Neuropsychological Integration. *Public Health Rev*, 42, 1603990. <https://doi.org/10.3389/phrs.2021.1603990>
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114 e2105. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Tian, C. M., Yang, M. F., Xu, H. M., Zhu, M. Z., Yue, N. N., Zhang, Y., Shi, R. Y., Yao, J., Wang, L. S., Liang, Y. J., & Li, D. F. (2023). Stem cell-derived intestinal organoids: a novel modality for IBD. *Cell Death Discov*, 9(1), 255. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01556-1>
- Tibble, J., Teahon, K., Thjodleifsson, B., Roseth, A., Sigthorsson, G., Bridger, S., Foster, R., Sherwood, R., Fagerhol, M., & Bjarnason, I. (2000). A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut*, 47(4), 506-513. <https://doi.org/10.1136/gut.47.4.506>
- van Bodegraven, A. A., Curley, C. R., Hunt, K. A., Monsuur, A. J., Linskens, R. K., Onnie, C. M., Crusius, J. B., Annese, V., Latiano, A., Silverberg, M. S., Bitton, A., Fisher, S. A., Steinhart, A. H., Forbes, A., Sanderson, J., Prescott, N. J., Strachan, D. P., Playford, R. J., Mathew, C. G., . . . van Heel, D. A. (2006). Genetic variation in myosin IXB is associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 131(6), 1768-1774. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.09.011>
- van der Flier, L. G., Haegebarth, A., Stange, D. E., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2009). OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 137(1), 15-17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.035>
- Vitali, R., Stronati, L., Negroni, A., Di Nardo, G., Pierdomenico, M., del Giudice, E., Rossi, P., & Cucchiara, S. (2011). Fecal HMGB1 is a novel marker of intestinal mucosal inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 106(11), 2029-2040. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.231>
- Wang, Y., Srinivasan, K., Siddiqui, M. R., George, S. P., Tomar, A., & Khurana, S. (2008). A novel role for villin in intestinal epithelial cell survival and homeostasis. *J Biol Chem*, 283(14), 9454-9464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707962200>
- Wapenaar, M. C., Monsuur, A. J., van Bodegraven, A. A., Weersma, R. K., Bevova, M. R., Linskens, R. K., Howdle, P., Holmes, G., Mulder, C. J., Dijkstra, G., van Heel, D. A., & Wijmenga, C. (2008). Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut*, 57(4), 463-467. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.133132>
- Watson, C. L., Mahe, M. M., & Helmrath, M. A. (2015). In vivo Fluorescein Isothiocyanate-dextran (FD4) Permeability Assay. *Bio Protoc*, 5(20), e1618. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1618>

- Yan, Z., Deng, P., & Liu, Y. (2019). Recent Advances in Protein Kinase Activity Analysis Based on Nanomaterials. *Int J Mol Sci*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061440>
- Yang, C., Xiao, W., Wang, R., Hu, Y., Yi, K., Sun, X., Wang, G., & Xu, X. (2023). Tumor organoid model of colorectal cancer (Review). *Oncol Lett*, 26(2), 328. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13914>
- Yuan, S., Liu, Z., Xu, Z., Liu, J., & Zhang, J. (2020). High mobility group box 1 (HMGB1): a pivotal regulator of hematopoietic malignancies. *J Hematol Oncol*, 13(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00920-3>
- Zhang, K., Hornef, M. W., & Dupont, A. (2015). The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell Microbiol*, 17(11), 1561-1569. <https://doi.org/10.1111/cmi.12501>
- Zhang, Y., Li, X., Li, Y., Li, Y., Wang, Y., Zhu, L., Chen, P., Tian, Z., Qiu, Y., Feng, R., Zeng, Z., He, Y., Chen, B., Zhang, S., Mao, R., & Chen, M. (2021). DNA Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 (DRAM1) Mediates Autophagy and Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*, 66(10), 3375-3390. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06697-2>
- Zhang, Y., You, B., Liu, X., Chen, J., Peng, Y., & Yuan, Z. (2019). High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Induces Migration of Endothelial Progenitor Cell via Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE)-Dependent PI3K/Akt/eNOS Signaling Pathway. *Med Sci Monit*, 25, 6462-6473. <https://doi.org/10.12659/MSM.915829>
- Zhao, J., Ng, S. C., Lei, Y., Yi, F., Li, J., Yu, L., Zou, K., Dan, Z., Dai, M., Ding, Y., Song, M., Mei, Q., Fang, X., Liu, H., Shi, Z., Zhou, R., Xia, M., Wu, Q., Xiong, Z., . . . Xia, B. (2013). First prospective, population-based inflammatory bowel disease incidence study in mainland of China: the emergence of "western" disease. *Inflamm Bowel Dis*, 19(9), 1839-1845. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31828a6551>
- Zheng, D., Liao, H., Chen, S., Liu, X., Mao, C., Zhang, C., Meng, M., Wang, Z., Wang, Y., Jiang, Q., Xue, Y., Zhou, L., & Chen, Y. (2021). Elevated Levels of Circulating Biomarkers Related to Leaky Gut Syndrome and Bacterial Translocation Are Associated With Graves' Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 796212. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.796212>
- Zhong, H., Li, X., Zhou, S., Jiang, P., Liu, X., Ouyang, M., Nie, Y., Chen, X., Zhang, L., Liu, Y., Tao, T., & Tang, J. (2020). Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. *Journal of Immunology*, 205(3), 767-775. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900860>
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer*, 143(4), 921-930. <https://doi.org/10.1002/ijc.31374>
- Zhu, X., Messer, J. S., Wang, Y., Lin, F., Cham, C. M., Chang, J., Billiar, T. R., Lotze, M. T., Boone, D. L., & Chang, E. B. (2015). Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J Clin Invest*, 125(3), 1098-1110. <https://doi.org/10.1172/JCI76344>



## B. Publikationsliste

Publikationen und Kongresse

### **Intestinal Epithelia and Myeloid Immune Cells Shape Colitis Severity and Colorectal Carcinogenesis via High-mobility Group Box Protein 1**

Foelsch K\*, Pelczar P\*, **Zierz E\***, Kondratowicz S, Qi M, Müller C, Alawi M, Huebener S, Clauditz T, Gagliani N, Huber S, Huebener P.

January 2024, Journal of Crohns and Colitis. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae017>

### **Myeloid Cell-Specific Deletion of PDGFR- $\alpha$ Promotes Dysbiotic Intestinal Microbiota and thus Increased Colitis Susceptibility.**

Dörk R, Pelczar P, Shiri AM, Volmari A, **Zierz E**, Giannou A, Böttcher M, Bosurgi L, Huber S, Manthey CF.

November 2023, Journal of Crohns and Colitis. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjad103>

### **Context-dependent roles of High-mobility group box 1 (HMGB1) during intestinal inflammation and carcinogenesis**

**Zierz E\***, Foelsch K\*, Pelczar P, Qi M, Alawi M, Clauditz T, Gagliani N, Huber S, Huebener P.

February 2022, Digital Oral Presentation, ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation)

### **Leukocyte-Derived High-Mobility Group Box 1 Governs Hepatic Immune Responses to *Listeria monocytogenes*.**

Volmari A, Foelsch K, **Zierz E**, Yan K, Qi M, Bartels K, Kondratowicz S, Boettcher M, Reimers D, Nishibori M, Liu K, Schwabe RF, Lohse AW, Huber S, Mittrüecker HW, Huebener P.

July 2021, Hepatology Communications. <https://doi.org/10.1002/hep4.1777>

## **C. Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich während meiner Zeit am UKE betreut und unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. med. Peter Hübener für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung über die letzten Jahre und die enge Zusammenarbeit in der kleinen Arbeitsgruppe sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen herzlich bedanken.

Auch Prof. Johannes Herkel und Prof. Dr. Stefan Hoth möchte ich herzlich für die freundliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit danken. Ich möchte mich herzlich bei Prof. Samuel Huber und seiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken, die mich während meiner Arbeit thematisch und fachlich unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Vorgängerinnen der AG Hübener, Katharina und Annika, die durch ihre Vorarbeiten den Grundstein für mein Projekt gelegt und mich bei allen aufkommenden Fragen zur HMGB1 Thematik fachlich wertvoll unterstützt haben. Ich möchte Ronja für die tolle Zusammenarbeit in unserem Labor sowie ihrer tatkräftigen Unterstützung bedanken. Ich danke Dr. Penelope Pelczar aus der AG Huber für die methodische und fachliche Unterstützung sowie insbesondere für ihren Beitrag und die Datenerhebung während des Revisionsprozesses der veröffentlichten Publikation. Anschließend möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Dandri sowie bei Antonella aus der AG Huber und den Mitarbeitern aus der Tierhaltung des UKEs für die Unterstützung während meiner Promotion bedanken. Ohne eure Unterstützung wäre dies nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf allen Abschnitten meines Lebensweges begleitet und stets ermutigt hat. Danke für euren Rückhalt und immerwährende Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann für seine Geduld und sein großes Verständnis bedanken. Ich bin sehr dankbar für deine stetige Ermutigung und moralische Stütze in allen Phasen meiner Doktorarbeit. Danke, dass du mich unterstützt hast, dieses Lebenskapitel abzuschließen.

## **D. Eidesstattliche Versicherung**

*Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben.*

*Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.*

### **Affidavit:**

*I hereby declare and affirm that this doctoral dissertation is my own work and that I have not used any aids and sources other than those indicated.*

*If electronic resources based on generative artificial intelligence (gAI) were used in the course of writing this dissertation, I confirm that my own work was the main and value-adding contribution and that complete documentation of all resources used is available in accordance with good scientific practice. I am responsible for any erroneous or distorted content, incorrect references, violations of data protection and copyright law or plagiarism that may have been generated by the gAI.*

---

Hamburg, Datum

---

Unterschrift