

Der Einfluss von Naringenin-5-O-rhamnosid auf Kolitis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin (Dr. med)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Loreen Heuer

aus

Achim

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Samuel Huber

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Arne Hansen

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Nicola Gagliani

Datum der mündlichen Prüfung: 16.01.2026

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 6 |
| 1.1 | Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen | 6 |
| 1.1.1 | Epidemiologie | 6 |
| 1.1.2 | Pathogenese..... | 7 |
| 1.1.2.1 | Immunsystem | 7 |
| 1.1.2.2 | Genetik | 8 |
| 1.1.2.3 | Intestinale Mikrobiota | 8 |
| 1.1.2.4 | Umwelteinflüsse | 9 |
| 1.1.3 | Morbus Crohn | 10 |
| 1.1.4 | Colitis ulcerosa..... | 10 |
| 1.1.5 | Diagnostik | 11 |
| 1.1.6 | Therapie..... | 12 |
| 1.2 | Flavonoide..... | 14 |
| 1.2.1 | Naringenin..... | 15 |
| 1.2.1.1 | Naringenin in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen | 16 |
| 1.2.1.2 | Wirkmechanismus von Naringenin | 16 |
| 1.2.2 | Glykosylierung von Flavonoiden | 18 |
| 1.2.3 | Naringenin-5-O-Rhamnosid..... | 18 |
| 1.3 | Experimentelle Mausmodelle einer entzündlichen Darmerkrankung..... | 20 |
| 1.3.1 | DSS-Kolitis als chemisch induzierte Dickdarmentzündung | 20 |
| 1.3.2 | T-Zell-Transfer-Kolitis..... | 20 |
| 1.4 | Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit..... | 22 |
| 2 | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Material | 23 |
| 2.1.1 | Reagenzien und Chemikalien..... | 23 |
| 2.1.2 | Primer | 25 |
| 2.1.3 | Zytokine | 25 |
| 2.1.4 | Antikörper | 26 |
| 2.1.5 | Puffer und Medien..... | 27 |
| 2.1.6 | Verbrauchsmaterial | 27 |
| 2.1.7 | Geräte | 28 |
| 2.1.8 | Versuchstiere..... | 29 |
| 2.2 | Methoden | 30 |
| 2.2.1 | Genotypisierung | 30 |
| 2.2.1.1 | Genotypisierung von Blutproben von DEREK Mäusen | 32 |
| 2.2.2 | <i>In vitro</i> Zelldifferenzierung..... | 32 |
| 2.2.2.1 | Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen unter Verwendung von magnetischer Zellseparation | 32 |
| 2.2.2.2 | Th1/Th17/Treg Polarisierung mit/ ohne Inkubation von Naringenin und N5R | 33 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.3 | Tierversuche | 34 |
| 2.2.3.1 | DSS-Kolitis..... | 34 |
| 2.2.3.2 | T-Zell-Transfer-Kolitis..... | 34 |
| 2.2.3.3 | DEREG-Zellen Rekonstitution in Rag1 ^{-/-} Mäusen..... | 34 |
| 2.2.4 | Käfighaltung..... | 35 |
| 2.2.5 | Orale Applikation von Naringenin und N5R | 35 |
| 2.2.5.1 | Aufbereitung von Naringenin und N5R | 35 |
| 2.2.5.2 | Gavage..... | 35 |
| 2.2.6 | Etablierung eines kolitogenen Mikrobioms | 36 |
| 2.2.7 | Kleintierendoskopie | 36 |
| 2.2.8 | Organentnahme und Zellisolation | 36 |
| 2.2.8.1 | Isolation der Lymphozyten aus dem Kolon..... | 37 |
| 2.2.8.2 | Isolation der Lymphozyten aus den Lymphknoten | 37 |
| 2.2.9 | Durchflusszytometrie und Zell-Sorting..... | 38 |
| 2.2.9.1 | Lebendfärbung isolierter Zellen | 38 |
| 2.2.9.2 | Extrazelluläre Färbung | 38 |
| 2.2.9.3 | Zellzählung über die Durchflusszytometrie | 38 |
| 2.2.9.4 | FACS-Analyse..... | 38 |
| 2.2.9.5 | FACS-Sort | 38 |
| 2.2.9.6 | Gating-Strategie..... | 39 |
| 2.2.10 | Histologie | 41 |
| 2.2.11 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 42 |
| 2.2.12 | Aufbereitung von Stuhlproben zur Detektion von Naringenin und N5R..... | 42 |
| 2.2.13 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie..... | 42 |
| 2.2.14 | Statistische Analysen..... | 42 |
| 3 | Ergebnisse..... | 44 |
| 3.1 | <i>In vitro</i> Differenzierung von CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen..... | 45 |
| 3.1.1 | Einfluss von Naringenin..... | 45 |
| 3.1.2 | Einfluss von N5R | 48 |
| 3.2 | Einfluss von N5R auf den Verlauf einer Kolitis <i>in vivo</i> | 50 |
| 3.2.1 | Etablierung der Versuchsanordnung | 50 |
| 3.2.2 | Akute DSS-Kolitis..... | 51 |
| 3.2.3 | Akute DSS-Kolitis in Rag1 ^{-/-} Mäusen..... | 58 |
| 3.2.4 | T-Zell-Transfer-Kolitis..... | 59 |
| 3.2.5 | Akute DSS-Kolitis in mit DEREZ-Zellen rekonstituierten Rag1 ^{-/-} Mäusen | 66 |
| 4 | Diskussion..... | 69 |
| 4.1 | N5R hat, im Gegensatz zu Naringenin, keinen Einfluss auf die Differenzierung von T-Helfer-Zellen <i>in vitro</i> | 69 |
| 4.2 | N5R ist im Modell der akuten DSS-Kolitis protektiv..... | 70 |

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3 | N5R erhöht dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen im Modell der akuten DSS-Kolitis..... | 72 |
| 4.4 | Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind nicht verantwortlich für den beobachteten protektiven Einfluss von N5R im Modell der akuten DSS-Kolitis. | 73 |
| 4.5 | N5R beeinflusst T-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis..... | 74 |
| 4.6 | N5R ist protektiv im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis..... | 75 |
| 4.7 | CD4 ⁺ T-Effektorzellen und besonders Treg-Zellen spielen vermutlich eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus von N5R. | 76 |
| 4.8 | N5R zeigt in zwei <i>in vivo</i> Kolitis-Modellen bessere Ergebnisse als sein Vorläufermolekül Naringenin..... | 78 |
| 4.9 | Fazit und Ausblick | 79 |
| 5 | Zusammenfassung | 81 |
| 5.1 | Zusammenfassung auf Deutsch | 81 |
| 5.2 | Summary in English..... | 82 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 84 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 85 |
| 8 | Tabellenverzeichnis | 86 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 87 |
| 10 | Danksagung | 101 |
| 11 | Erklärung des Eigenanteils | 102 |
| 12 | Eidesstattliche Versicherung | 103 |

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Der Überbegriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) umfasst heterogene Krankheitsbilder, die entzündliche Veränderungen im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) hervorrufen und in der Regel schubartig auftreten. Zu den häufigsten Entitäten zählen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, gelegentlich wird auch die mikroskopische Kolitis beschrieben [1]. Allgemeine Symptome von Patienten mit CED sind Episoden von Bauchschmerzen, wässrigen oder blutigen Durchfällen, Fieber, Gewichtsverlust und gelegentlich die Bildung von Darmgeschwüren [2, 3]. Betroffene Patienten zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für extraintestinale Manifestationen, z.B. an Haut, Augen und Gelenken [4]. Ferner besteht bei unbehandelter CED ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Dysplasien, die zu Darmkrebs führen können [5]. Diese Symptome beeinträchtigen die Lebensqualität erheblich und führen zu erhöhten Raten an Arbeitsunfähigkeit [6, 7].

Ein besseres Verständnis der Ätiologie von CED und die Entwicklung innovativer Therapieansätze sind ein zentrales Forschungsgebiet. Neben Umweltfaktoren und genetischen Einflüssen wurden immunologische und Mikrobiota-assoziierte Faktoren in der Pathogenese identifiziert. Es wird angenommen, dass Menschen mit genetischer Prädisposition, die bestimmten äußeren Einflüssen ausgesetzt sind, ein erhöhtes Risiko für eine Störung der epithelialen Barriere des Darms aufweisen. Ein Teil des zugrunde liegenden Mechanismus ist eine dysregulierte Immunantwort auf die eigene Darmflora [8, 9]. Trotz beschriebener Unterschiede in Symptomatik, Ausbreitung und Histologie zwischen den verschiedenen CED-Formen gestaltet sich die medizinische Diagnosestellung bei nicht eindeutiger Klinik mitunter schwierig. In solchen Fällen wird der Begriff der indeterminierten Kolitis verwendet [10].

1.1.1 Epidemiologie

Eine CED manifestiert sich in der Regel in den früheren Lebensdekaden, kann jedoch auch zu späteren Zeitpunkten auftreten [11] und persistiert meist lebenslang. Beide Geschlechter sind betroffen, wobei Morbus Crohn (siehe Abschnitt 1.1.3) öfter bei Frauen und Colitis ulcerosa (siehe Abschnitt 1.1.4) etwas häufiger bei Männern vorkommt [12]. Seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wird eine steigende Inzidenz und Prävalenz von CED verzeichnet [13]. Zwischen 1990 und 2017 wurde ein weltweiter Anstieg der CED-Prävalenz um 31 % auf nahezu 90 Fälle pro 100.000 Menschen festgestellt [14]. CED zählen somit mittlerweile zu den häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen, insbesondere in Europa und Nordamerika. Schätzungen gehen davon aus, dass über 3 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten und Europa an einer CED leiden [15]. Aber auch in Asien und in den Entwicklungsländern ist die Prävalenz steigend [16]. Aufgrund globaler Unterschiede in der Epidemiologie von CED wird davon ausgegangen, dass die Industrialisierung der Länder eine erhebliche Rolle in der erhöhten Inzidenz und Prävalenz spielt. Ein westlicher

Lebensstil, verbunden mit einer hohen Aufnahme an Fett, Zucker und tierischem Protein über die Nahrung, steht in Korrelation mit der Entwicklung einer CED [17, 18].

1.1.2 Pathogenese

Es wird angenommen, dass in der Pathogenese von CED eine zu starke und anhaltende abnorme mukosale Immunantwort gegen enterische Mikroben eine übergeordnete Rolle spielt. Dabei kommt es bei der Entstehung der chronischen Entzündung zu einer komplexen Interaktion zwischen dem Immunsystem, der Genetik, der individuellen Mikrobiota und Umwelteinflüssen [19]. Aufgrund dieser komplexen Wechselwirkungen ist noch nicht vollständig geklärt, in welchem Maße die jeweiligen Einflussfaktoren allein zur Pathophysiologie beitragen und welche Faktoren eher als Ursache oder als Folge in der Entstehung einer CED anzusehen sind [20, 21]. Im Folgenden werden die einzelnen Faktoren näher beleuchtet. Zukünftige Untersuchungen, die an die bisherigen Forschungsergebnisse anknüpfen, werden von entscheidender Bedeutung sein, um weitere wichtige Erkenntnisse über die Ätiologie von CED zu gewinnen.

1.1.2.1 Immunsystem

Die dysregulierte Immunantwort bei CED ist durch eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet. Dies führt zu einer verstärkten Infiltration von Immunzellen in die Darmmukosa und einer erhöhten Produktion von entzündlichen Zytokinen, wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6, Interferon-gamma (IFN- γ), IL-17 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) [22, 23].

Die abnorme Immunantwort im Darmtrakt unterhält eine chronische Entzündungsreaktion, die charakteristisch für CED ist und einen *Circulus vitiosus* darstellt. Veränderungen im Gleichgewicht von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr werden mit der Entstehung von CED assoziiert [24, 25]. Aktuelle Forschungsergebnisse legen dabei nahe, dass sowohl das angeborene Immunsystem als auch das adaptive Immunsystem einen gleichwertigen Einfluss auf die Pathogenese der CED ausüben [26]. Das angeborene Immunsystem, repräsentiert durch neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), spielt eine entscheidende Rolle bei der schnellen, unspezifischen Reaktion auf Krankheitserreger bei gleichzeitiger Immuntoleranz gegenüber ansässigen Mikroben. Darüber hinaus aktivieren befähigte Zellen des angeborenen Immunsystems die B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems durch Zytokinproduktion und Antigenpräsentation [27, 28].

Zu den Abwehrmechanismen adaptiver Immunzellen gehört die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern durch B-Lymphozyten. T-Lymphozyten, in Form von *Cluster of Differentiation* (CD)4⁺ T-Lymphozyten, können die Aktivität von Makrophagen, Neutrophilen und B-Zellen beeinflussen. Zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten hingegen können beispielsweise virusinfizierte Zellen abtöten.

CD4⁺ T-Lymphozyten besitzen eine Schlüsselrolle in der fehlregulierten Immunreaktion bei CED [29], wobei während eines Schubs eine erhöhte Anzahl der CD4⁺ T-Zellen in der intestinalen Mukosa nachweisbar ist. Ein Ungleichgewicht zwischen verschiedenen CD4⁺ T-Zell-Subtypen, wie T-Effektorzellen in Form von Typ-1-T-Helferzellen (TH1-Zellen), TH2- und TH17-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen), sowie ihrer Zytokine, gilt als wesentlicher Faktor für die chronische Entzündung bei CED [30]. Besondere Relevanz wird dabei den antientzündlichen Treg-Zellen und dem von ihnen produziertem IL-10 zugesprochen. Ihre Abwesenheit oder Dysfunktionalität allein kann zu der Entstehung von Kolitis führen [31-33]. Es wurde festgestellt, dass das gewebergenerierende Zytokin IL-22, das zur IL-10-Superfamilie gehört, bei CED-Patienten durch eine gesteigerte Expression seines endogenen Inhibitors, des IL-22 *binding protein* (IL-22BP), blockiert wird. Dies führt zu einer verminderten protektiven Aktivität von IL-22 [34].

1.1.2.2 Genetik

Verwandte ersten Grades von Personen mit CED haben ein circa fünffach erhöhtes Risiko, selbst an einer CED zu erkranken. Dabei ist das Risiko, eine CED zu entwickeln, bei monozygoten Zwillingen oder wenn beide Elternteile eine CED diagnostiziert bekommen haben am höchsten [35, 36]. Generell erfolgt eine Unterscheidung zwischen monogenetischen und polygenetischen Formen von CED. Polygene Formen treten am häufigsten auf und sind weniger penetrant als monogene Formen [37]. Im Gegensatz dazu sind monogene CED äußerst selten und zeigen ein geringes Ansprechen auf herkömmliche Therapien. Zudem beginnen monogene CED in der Regel früh, oft schon im Kindesalter, und sind durch eine erhebliche Krankheitslast gekennzeichnet.

In der Vergangenheit wurden mithilfe von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) inzwischen 200 Genloci identifiziert, die mit der Entwicklung einer CED assoziiert werden [38, 39]. Die meisten dieser Gene spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort oder in der Funktionsfähigkeit der epithelialen Barriere. Beispielsweise ist eine Mutation des *Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2* NOD2 -Gens bei den polygenetischen Formen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Morbus Crohn durch vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine verbunden [40, 41]. Darüber hinaus wurden in aktuellen Studien bisher zwischen 80 und 90 genetische Ursachen im Zusammenhang mit monogenetischen CED-Formen identifiziert [42]. Ein Beispiel hierfür ist die Loss-of-Function-Mutation in der IL-10-Signalkaskade, die als repräsentativ für monogenetische Ursachen bei der Entstehung von CED angesehen wird [37, 43].

Ferner sind die bei CED betroffenen Gene teilweise auch in der Pathogenese anderer immunvermittelter entzündlicher Erkrankungen (IMID) involviert [44].

1.1.2.3 Intestinale Mikrobiota

Eine Assoziation zwischen der intestinalen Mikrobiota und der Pathogenese von CED wurde in der Literatur mehrfach hervorgehoben [45]. Pathobionten sind Mikroorganismen, die normalerweise eine symbiotische Beziehung mit dem Wirt eingehen. Unter bestimmten

Umständen, wie einer gestörten Immunantwort oder einer veränderten Zusammensetzung der Mikrobiota, können Pathobionten jedoch für den Wirt schädliche Interaktionen zeigen [46]. Im Gegensatz dazu steht die pathogene Mikrobiota, d.h. krankheitsverursachende Organismen, die nicht zur normalen Mikrobiota gehören [47]. Die Proliferation von pathogener Mikrobiota und Pathobionten kann zu einer Dysbiose, also einer verringerten Diversität der intestinalen Mikroorganismen, und in der Folge zu einer gesteigerten Immunantwort führen [48]. Auf der anderen Seite kann eine ausgeglichene Darmmikrobiota mit einer Verteilung zugunsten gesundheitsfördernder Kommensale, einer sogenannten Eubiose, dazu beitragen, dem Krankheitsrisiko einer CED vorzubeugen.

Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota unterscheidet sich nachweislich zwischen Patienten mit CED und gesunden Probanden [49]. Es wurde beobachtet, dass Patienten mit CED eine erhöhte Anzahl von *Actinobacteria* und *Proteobacteria* sowie eine verminderte Menge an *Firmicutes* und *Bacteroidetes* aufweisen [50]. Zudem zeigt sich bei Patienten mit CED im Allgemeinen eine geringere mikrobielle Diversität [51]. Experimentell wurde nachgewiesen, dass eine Veränderung in der Zusammensetzung zugunsten pathogener Mikrobiota und Pathobionten den Schweregrad einer Kolitis in Mäusen verschlimmern kann [52]. Aufgrund der festgestellten Veränderungen in der Darmmikrobiota bei Patienten mit CED und Mäusen in experimentellen Kolitis-Modellen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen besteht die Annahme, dass die Einnahme von Probiotika und fäkaler Mikrobiota-Transplantation die Symptomlast bei CED-Patienten verringern kann. Die Indikation für eine fäkale Mikrobiota-Transplantation ist jedoch noch Gegenstand aktueller Forschung [53, 54].

1.1.2.4 Umwelteinflüsse

Die Bedeutung der Ernährung im Kontext von CED rückt zunehmend ins Zentrum der Forschung, sowohl als Risikofaktor als auch in Bezug auf Prävention und Therapie. Eine westliche Diät, mit einer erhöhten Zufuhr von industriell verarbeiteten Zucker, Fett, tierischen Produkten und einem geringen Gehalt an ballaststoffreichen Lebensmitteln, wird in Verbindung mit der Entwicklung einer CED gebracht. Da Antigene aus der Nahrung neben Bakterienantigenen die häufigsten Fremdkörperstrukturen im Darm sind, ist anzunehmen, dass sie eine wichtige Rolle in der Ätiologie von CED spielen. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Ernährung die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflusst, was wiederum einen Einfluss auf die Entstehung von CED haben kann [55, 56].

Neben der Ernährung spielen weitere charakteristische Einflussfaktoren des westlichen Lebensstils, wie Tabakkonsum und Stress, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von CED. Insbesondere der Tabakkonsum wurde bereits früh als einer der ersten Umweltfaktoren identifiziert, der einen Beitrag zur Entstehung von CED leistet. So erhöht Rauchen das Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken. Zusätzlich erschwert das Fortführen des Tabakkonsums nach Krankheitsausbruch die Therapie von Morbus Crohn und steigert die Rezidivrate von Schüben. Interessanterweise zeigt sich bei Colitis ulcerosa ein gegensätzliches Muster, bei dem der Tabakkonsum eher protektiv auf die Entwicklung und den Verlauf der Erkrankung zu wirken scheint [57, 58]. Allerdings müssen hier die globalen

Auswirkungen des Rauchens auf den Körper betrachtet werden, welche insgesamt als überwiegend schädlich zu betrachten sind. Psychischer Stress hingegen begünstigt vermutlich über das enterische Nervensystem die Entstehung und Exazerbation der Erkrankung, indem er die Entzündungsreaktion über die Beeinflussung des körpereigenen Cortisolspiegels moduliert [59]. Weitere diskutierte Umwelteinflüsse sind Vitamin-D-Mangel [60] und der Gebrauch von Antibiotika vor Diagnosestellung [61].

1.1.3 Morbus Crohn

Das Befallsmuster eines Morbus Crohn, auch als *Enterokolitis regionalis* bezeichnet, ist diskontinuierlich. Es zeigen sich segmentale Entzündungen im gesamten Gastrointestinaltrakt, wobei jeder Abschnitt betroffen sein kann, einschließlich der Mundschleimhaut und der Analregion, vor allem jedoch des terminalen Ileums [62, 63]. Ein charakteristisches Merkmal ist das sogenannte „Pflastersteinrelief“ der Mukosa im endoskopischen Befund. Hierbei ist die Darmoberfläche abwechselnd von entzündeten Arealen und Ulzerationen durchsetzt [64]. Die Prävalenz von Morbus Crohn liegt zwischen 100 und 200 Patienten pro 100.000 Einwohner in Deutschland, mit steigender Tendenz [65]. Die Erkrankung tritt in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf [66].

Histologisch betrifft die Entzündungsreaktion bei Morbus Crohn alle Gewebsschichten und tritt im Gegensatz zur Colitis ulcerosa (siehe Abschnitt 1.1.4) transmural auf. Es zeigt sich mikroskopisch ein Zusammenschluss von Makrophagen, welche nicht-verkäsende Granulome mit Riesenzellen bilden [67, 68]. Aufgrund der Beteiligung des Dünndarms kann es bei Morbus Crohn zu Malabsorption und den Folgen eines reduzierten Ernährungszustands sowie Anämie durch Eisen- und Vitamin-B12-Mangel kommen. Außerdem sind extraintestinale Syndrome an Gelenken, den Augen und der Haut häufig. Hierzu zählen Osteoporose, Uveitis, entzündliche Arthropathien, venöse Thromboembolien, Cholelithiasis und das Erythema nodosum [69].

Die Therapie eines Morbus Crohn ist multidisziplinär. Neben medikamentöser Behandlung und Substitutionstherapie spielen chirurgische Interventionen eine wichtige Rolle, um auftretende Komplikationen wie Fisteln, Abszesse und intestinale Stenosen mit dem Risiko eines Ileus zu behandeln. Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit bei etwa 70 %, dass Patienten mit Morbus Crohn im Rahmen der Behandlung einem chirurgischen Eingriff unterliegen werden. Dieser sollte durch minimalinvasive Chirurgie möglichst darmsparend durchgeführt werden [70, 71].

1.1.4 Colitis ulcerosa

Das Befallsmuster einer Colitis ulcerosa beschränkt sich auf den Dickdarm [72]. Dabei beginnt die Colitis ulcerosa in der Regel auf Höhe des Rektums oder des Sigmoids mit kontinuierlichem Aufstieg nach oral. Anhand der Montreal-Klassifikation wird zwischen einer Proktitis (Entzündung der Rektumschleimhaut, distal des rektosigmoidalen Übergangs), einer Linksseitenkolitis (Befall bis zur linken Flexur) und einer ausgedehnten

Kolitis oder der Pankolitis (Ausdehnung über die linke Flexur hinaus bis zum Befall des gesamten Kolons) unterschieden. Gelegentlich reicht die Entzündung bis ins terminale Ileum, dann ist von einer *Backwash Ileitis* die Rede [10, 73]. In Deutschland beträgt die Prävalenz von Colitis ulcerosa zwischen 160 und 250 Patienten pro 100.000 Einwohnern, wobei die Tendenz steigend ist [65, 74]. Die Erkrankung tritt häufig zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr oder zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr auf [75].

Histologisch beschränkt sich die Entzündungsreaktion bei einer Colitis ulcerosa ausschließlich auf die Mukosa. Sie ist somit im Kontrast zum Morbus Crohn, welcher alle Wandschichten befällt, oberflächlicher. In der Lamina propria und in den Krypten zeigt sich eine signifikante Anzahl an Neutrophilen mit Bildung von Mikroabszessen [76, 77]. Im Rahmen einer Colitis ulcerosa können sich extraintestinale Manifestationen, vor allem an Augen, Mund, Gelenken, Haut und im perianalen Umfeld manifestieren. Beispiele hierfür sind eine ankylosierende Spondylitis/ Morbus Bechterew, eine Uveitis und Iritis, ein Erythema nodosum oder ein Pyoderma gangraenosum, sowie Aphten der Mundschleimhaut [10, 78]. Auch das Risiko für das Auftreten einer primär sklerosierenden Cholangitis ist erhöht. Im Vergleich zu Morbus Crohn birgt Colitis ulcerosa insgesamt weniger Gefahren für Komplikationen, hat eine bessere Prognose und kann durch eine vollständige Kolektomie geheilt werden, die jedoch in vielen Fällen nicht erforderlich ist [79, 80].

1.1.5 Diagnostik

Bei klinisch-symptomatischem Verdacht auf eine CED kommen mehrere diagnostische Verfahren zur Anwendung. Nach Erhebung der ärztlichen Anamnese zur Symptomatik, Ernährung, Medikation, Krankengeschichte der Familie und möglicher Infektionen als Differentialdiagnose sowie Durchführung der körperlichen Untersuchung erfolgt eine Blutentnahme. Hierbei wird die Entzündungsreaktion mithilfe der Leukozytenzahl, der Blutsenkungsgeschwindigkeit, des C-reaktiven Proteins (CRP) und gegebenenfalls durch Procalcitonin quantifiziert. Außerdem wird der Vitamin-B12-Wert sowie die Hämoglobinkonzentration hinsichtlich einer möglichen Blutarmut untersucht und eine hierbei relevante Mangelversorgung mit Ferritin und Transferrin als Zeichen für Eisenmangel überprüft. Auch die Leberenzyme werden getestet [81-83]. Zusätzlich zur Routine-Diagnostik kann eine Antikörper-Diagnostik auf Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) oder Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper (ASCA) durchgeführt werden [84].

Ferner sollte eine bakteriologische Stuhldiagnostik zur Ausschlussdiagnostik für infektiöse Durchfallerkrankungen sowie eine eventuelle Bestimmung von Calprotectin im Stuhl als Marker für intestinale Entzündungsreaktionen zur Verlaufskontrolle vollzogen werden [85, 86]. In der Diagnostik spielt die Endoskopie eine bedeutende Rolle, da sie sowohl eine makroskopische als auch eine mikroskopische Diagnose ermöglicht. Es sollte mindestens ein endoskopisches Verfahren zur makroskopischen Beurteilung des Darmgewebes durchgeführt werden. Im Rahmen einer Ileokoloskopie werden gleichzeitig Proben des Darmgewebes entnommen, die zur mikroskopischen Untersuchung dienen. Die gewonnenen

Biopsien ermöglichen eine histologische Differenzierung zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, außerdem kann eine Karzinogenese bei verdächtigen Läsionen ausgeschlossen werden [87]. Bei Verdacht auf Morbus Crohn oder unklarem Befund sollte an die Koloskopie eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) angeschlossen werden, um typische Läsionen im oberen GI-Trakt zu identifizieren. Zusätzlich finden in diesem Kontext eine Magnetresonanztomographie des Dünndarms nach Sellink und eine Sonografie statt, um vom Morbus Crohn befallene Dünndarmregionen und andere abdominelle Komplikationen, wie Stenosen und Fisteln, zu erkennen. Gegebenenfalls kann hier auch eine Proktoskopie notwendig sein [88-90].

1.1.6 Therapie

Die Therapie der CED ist im Laufe der Jahre durch neue Forschungserkenntnisse sehr komplex geworden. Verschiedene Präparate kommen je nach individuellen Aspekten wie Nebenwirkungen und Kontraindikationen zum Einsatz. Die *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE)-II* definiert folgende Therapieziele: klinisches Ansprechen und langfristige klinische Remission, endoskopische mukosale Heilung sowie eine Normalisierung von CRP und Calprotectin. Langfristiges Ziel ist das Erreichen von Behinderungsfreiheit und normaler gesundheitsbezogener Lebensqualität bei Patienten mit CED [91]. Dazu gehört auch die multidisziplinäre Behandlung spezifischer Komplikationen, die im Verlauf der Erkrankung auftreten können, wie z.B. die Versorgung von Analfissuren, Fisteln und Stenosen, insbesondere im Rahmen eines Morbus Crohn. Das aktuelle Behandlungsschema umfasst neben chirurgischen Maßnahmen die medikamentöse Therapie. Hierbei wird zwischen einem „*Top-Down*“ und einem „*Bottom-Up*“-Ansatz unterschieden. Bei der „*Top-Down*“-Strategie wird direkt nach Diagnosestellung mit einer potenten medikamentösen Therapie mit Antikörperpräparaten begonnen und diese im weiteren Therapieverlauf reduziert. Als „*Bottom-Up*“-Strategie wird der initiale sequenzielle Einsatz von konventionellen Immunsuppressiva und Kortikosteroiden bezeichnet, wobei Biologika nur bei Therapieversagen eingesetzt werden. Neuere klinische Ergebnisse, wie die der PROFILE-Studie, legen nahe, dass der „*Top-Down*“-Ansatz insbesondere bei Morbus Crohn zu besseren klinischen Ergebnissen führt [92].

Abhängig vom Schweregrad der Krankheit wird dabei zwischen topischer Anwendung (Steroide, Aminosalicylate) bei milder Ausprägung und systemischer Behandlung (Steroide, klassische Immunsuppressiva, Biologika, Calcineurininhibitoren) bei hoher Entzündungsaktivität unterschieden [93]. Einige der Wirkstoffe eignen sich dabei sowohl zur Induktion als auch zur Erhaltung von Remission, andere nur für eine der beiden Anwendungen [94, 95]. Steroide wie Hydrokortison, Budesonid und Prednisolon werden zur Akutbehandlung eingesetzt. Aufgrund der Nebenwirkungen sind sie jedoch nicht für eine Langzeittherapie geeignet. Sie wirken immunsuppressiv über eine Bindung an den nukleären Rezeptor des körpereigenen Steroidhormon Cortisol. Bei längerer Gabe besteht die Gefahr von opportunistischen Infektionen, Hypertonie, Diabetes mellitus und Osteoporose [96]. Aminosalicylate wie Sulfasalazin oder 5-Aminosalicylsäure/Mesalazin kommen bei mäßigen bis schweren Schüben zum Einsatz. Sie unterdrücken die Synthese proentzündlicher Arachidonsäuremetabolite, wie Leukotriene und Prostaglandine. Darüber

hinaus inhibieren Aminosalicylate die Chemotaxis von Leukozyten und wirken insgesamt entzündungshemmend in der Darmmukosa [97].

Purinanaloga, Biologika und Calcineurininhibitoren haben, im Vergleich zu Steroiden, weniger Nebenwirkungen und werden in der Regel besser vom Patienten toleriert, benötigen allerdings einige Wochen bis Monate Vorlauf, bis sie die gewünschte Wirkung erzielen.

Purinanaloga wie Azathioprin oder 6-Mercaptopurin hemmen die Purinnukleotidsynthese und somit die Differenzierung von Lymphozyten im Rahmen einer Immunantwort [98, 99]. Die zielgerichtete Biologika-Therapie nutzt die Blockierung einzelner Schritte in der Immunkaskade durch Antikörper. Infliximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNF- α , hat die Therapie von CED revolutioniert. Es wird bei mittlerer bis schwerer CED als erste Wahl eingesetzt, nichtsdestotrotz sprechen etwa 30 % der Patienten nicht auf ihn an [100]. Ein weiterer TNF- α -Antikörper, der Anwendung findet, ist beispielsweise Adalimumab. Neben TNF- α als Zielstruktur gibt es Biologika, die, wie Vedolizumab, gegen $\alpha 4\beta 7$ -Integrin gerichtet sind oder wie Ustekinumab, gegen IL-12 und IL-23 [101-103]. Risankizumab, Guselkumab und Mirikizumab sind selektive IL-23-Antikörper [104].

Reservemedikamente in der Therapie der CED sind z.B. Calcineurininhibitoren, niedermolekulare Verbindungen/*Small Molecules* sowie der Folsäureantagonist Methotrexat [105, 106]. Cyclosporin, als Calcineurininhibitor ein starkes Immunsuppressivum, wird bei schwerer bis fulminanter Colitis ulcerosa angewendet. Es wirkt durch die Hemmung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T cells“ (NF-AT), was zu einer reduzierten Aktivierung von T-Lymphozyten führt. Dies kann bei schwerkranken Patienten die Zeit bis zu einer möglichen Operation verlängern und somit einen risikoärmeren chirurgischen Eingriff ermöglichen [107].

Aufgrund ihrer oralen Applikation sind *Small Molecules* in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Sie beeinflussen die Funktion und Migration von Immunzellen über verschiedene Signalwege. Zu ihnen zählen beispielsweise Januskinase-Inhibitoren (JAK-Inhibitor) wie Tofacitinib, Upadacitinib und Filgotinib. [108, 109]. Auch Sphingosin-1 Phosphat (S1P)-Rezeptorblocker wie Ozanimod werden eingesetzt [110].

Bei infektiösen Komplikationen, wie Fisteln oder Abszessen, ist der Einsatz von Antibiotika hilfreich. Hier werden bevorzugt Metronidazol gegen Anaerobier oder das Breitspektrumantibiotikum Ciprofloxacin verwendet. [93, 111]. Obwohl die Medizin in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte in der CED-Therapie gemacht hat und diese nun zielgerichteter durchgeführt werden kann, weisen die oben genannten Medikamente Nebenwirkungen auf. Diese können die Lebensqualität der Patienten einschränken und ein höheres Infektionsrisiko für opportunistische Infektionen mit sich bringen [112]. Daher ist es von hoher Relevanz, neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, die jedem Patienten, die für ihn am besten geeignete Therapie mit möglichst geringen Nebenwirkungen bieten. Parallel zur antientzündlichen Wirkung sollten die Therapeutika idealerweise auch zu einer Förderung der Barrierefunktion der Mukosa beitragen. Ein interessanter Ansatz in dieser Hinsicht ist die antioxidative Therapie durch Flavonoide (siehe Abschnitt 1.2).

1.2 Flavonoide

Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, welche wichtige Funktionen im Stoffwechsel von Pflanzen erfüllen. Sie dienen der Pflanze als Oxidationsschutz, indem sie freie Radikale und andere Oxidationsmittel wirksam abfangen. Die aromatischen Farbstoffe bestehen meist aus zwei Benzolringen um einen 3-Kohlenstoffring und treten als Polyphenole universell in unterschiedlichen Pflanzen, bevorzugt in der Albedo und in den Randschichten von Obst und Gemüse, auf [113]. Dabei fungieren sie auch als Farb- oder Geschmacksstoffe und ihr Name leitet sich passenderweise vom lateinischen Begriff *flavus* für die Farbe Gelb ab [114-116]. Flavonoide sind durch den Verzehr von Früchten und Gemüsen allgegenwärtig in unserer Nahrung aufzufinden. Es gibt zunehmend Beweise, dass eine Aufnahme dieser Verbindungen einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des menschlichen Körpers hat und dass chronische Krankheiten und Krebs durch Flavonoide vorgebeugt oder gelindert werden können [117, 118]. Flavonoide entfalten biologische Eigenschaften im menschlichen Organismus, die die Homöostase verschiedener Organe wie z.B. der Lunge, der Leber und des Darms positiv beeinflussen. So werden Flavonoiden antioxidative, entzündungshemmende, antibakterielle, antivirale, antipsychotische, antidiabetische und krebshemmende Eigenschaften im menschlichen Organismus zugeschrieben [119].

Insgesamt gibt es circa 8.000 unterschiedliche Flavonoide. Diese werden weiter in Untergruppen, abhängig von den Glykosid-Anlagerungen und der relativen Stellung der Substituenten im aromatischen Kohlenstoffgerüst, klassifiziert. Bei der großen Anzahl an verschiedenen Flavonoiden und ihrem teils unterschiedlichen Wirkspektrum können erst bei Betrachtung der einzelnen Flavonoide selbst genauere Aussagen über ihre stoffspezifischen Effekte gemacht werden. Therapeutisch besonders diskutierte Vertreter sind z.B. die zur Untergruppe der Flavanone gehörigen Stoffe Hesperetin und Naringenin, die Flavonole Kaempferol und Quercetin oder das Flavon Apigenin [120, 121]. Dem in der Natur am häufigsten vorkommenden Flavonol Quercetin wird beispielsweise ein positiver Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota zugesprochen, indem es den gramnegativen Darmsymbionten *Akkermansia muciniphila* fördert und das eher gesundheitsschädliche Phylum *Proteobacteria* allgemein reduziert [122, 123]. Außerdem soll Quercetin die Serumspiegel von Stickstoffmonoxid (NO) senken und somit zur Reduktion von oxidativem Stress beitragen [124, 125]. Die Wirkung und Einsatzmöglichkeiten von Naringenin werden in Abschnitt 1.2.1 detailliert beschrieben.

Der nutrazeutische Einsatz von Flavonoiden scheint vielversprechend. Nichtsdestotrotz gibt es Limitationen, die bei der Verwendung von Flavonoiden Berücksichtigung finden sollten. Zunächst stehen die pflanzlichen Quellen für Flavonoide teilweise nur begrenzt zur Verfügung. Zudem ist die Bioverfügbarkeit dieser Phytochemikalien oft eingeschränkt, abhängig von ihrer chemischen Konfiguration, wie z.B. dem Vorhandensein von Glykosylierungen, der Hydrophobizität und dem Grad der Polymerisation [126]. Weitere Forschung wird in Zukunft vonnöten sein, um mehr über die Einsatzmöglichkeiten von Flavonoiden herauszufinden und einen therapeutischen Einsatz möglich zu machen.

1.2.1 Naringenin

Das Flavonoid Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon, C₁₅H₁₂O₅, siehe Abbildung 1) zählt zur Untergruppe der Flavanone. Es weist drei Hydroxylgruppen (-OH) an der vierten, fünften und siebten Position sowie ein chirales Zentrum am zweiten Kohlenstoffatom auf [120, 127]. Als aromatische Kohlenwasserstoffverbindung kann Naringenin in vielen Kräutern und Früchten nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration an Naringenin weisen Grapefruits (115-384 mg/l), saure Orangen (>100 mg/l) und Tomaten (0,68 ± 0,16 mg/100 g) auf. In geringerer Konzentration befindet es sich in Pampelmusen, Bergamotten, Oregano, Bachminze und Bohnen [128, 129]. Durch seine orange-gelbliche Pigmentierung verleiht Naringenin Früchten ihre zum Teil charakteristische Farbe. Naringin (Naringenin-7-neohesperidoside), das Vorläufermolekül von Naringenin, weist über eine glykosidische Bindung ein zusätzliches Disaccharid am siebten Kohlenstoffatom auf und ist in Grapefruits für den bitteren Geschmack verantwortlich. Dieses Vorläufermolekül ist in der Praxis inaktiv und wird durch seine Spaltung zum Aglykon Naringenin, beispielsweise durch das intestinale Mikrobiota, pharmakologisch aktiv [130, 131].

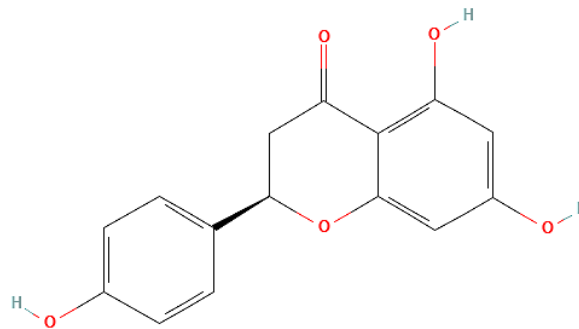


Abbildung 1: Strukturmolekül Naringenin [132]

Verschiedene Studien belegen antiinflammatorische, antioxidative, antikanzerogene, antidiabetische und positive kardiovaskuläre Eigenschaften des Naringenins. Somit könnte es ein vielversprechendes Nutraceutical in der Behandlung von entzündlichen Krankheiten, Krebs, Diabetes mellitus, Arteriosklerose und Hypertonie sein [133-136]. Allerdings gibt es einige Limitationen, die beim therapeutischen Gebrauch von Naringenin beachtet werden sollten. Die oben genannten Eigenschaften entfaltet Naringenin nur, wenn es in höheren Konzentrationen als über die tägliche Nahrung aufgenommen wird. Um Naringenin als Nahrungsergänzung nutzen zu können, ist es daher notwendig, es zunächst aus seinen pflanzlichen Quellen zu isolieren und zu konzentrieren. Als lipophiles Molekül weist es darüber hinaus eine schwere Wasserlöslichkeit auf (Löslichkeit in Wasser: 475 mg/l bei 25 °C) und benötigt spezielle Lösungsmittel wie Carboxymethylcellulose [137]. Als Konsequenz der schlechten Wasserlöslichkeit hat Naringenin eine schlechte Bioverfügbarkeit und kann nach der oralen Einnahme nicht vollständig vom Organismus resorbiert werden [138, 139].

Naringenin hemmt außerdem das Cytochrom P450 (CYP)-Isoenzym CYP 3A4. CYP 3A4 ist für den Abbau von Pharmaka in der Leber verantwortlich. Aufgrund dieser Inhibition ist bei der Einnahme von hochdosiertem Naringenin die Verstoffwechslung bestimmter

Medikamente eingeschränkt und der pharmazeutische Wirkspiegel im Organismus höher als ohne Naringenin-Einnahme. Hiervon betroffen sind Wirkstoffe wie die Kalziumantagonisten Verapamil und Nifedipin, das kurzwirksame Benzodiazepin Midazolam oder das Immunsuppressivum Cyclosporin, welches auch in der Therapie von CED eingesetzt wird [140, 141].

1.2.1.1 Naringenin in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

In den letzten Jahren haben mehr und mehr Studien belegt, dass Polyphenole zukünftig vielversprechend bei CED eingesetzt werden könnten [100, 142]. Das zu ihnen zählende Flavanon Naringenin zeigt in diesem Kontext experimentell bereits erfolversprechende Ergebnisse bei IMID, auch wenn die Studienlage in Bezug zur Anwendung bei CED noch sehr dünn ist. Im murinen Kolitis-Modell konnte gezeigt werden, dass Naringenin den „Disease Activity Index“ (DAI) bei CED senkt [143]. Insgesamt vermag Naringenin in Mechanismen einzugreifen, die in der Pathogenese von CED ausschlaggebend sind. Diverse Studien deuten einen positiven Einfluss auf die Integrität der mukosalen Barriere [143-145], auf das Darmmikrobiom [146] und auf das Immunsystem [147-149] an. Außerdem wird beschrieben, dass Naringenin oxidativen Stress reduziert, welcher im Pathomechanismus von CED eine wichtige Rolle spielt [150].

Nichtsdestotrotz müssen die zuvor in Abschnitt 1.2.1 genannten Limitationen von Naringenin in der Behandlung von CED beachtet werden. Hinzukommt, dass die Studienlage über den Einsatz von Naringenin bei CED bei aktuell kleiner Datenlage hauptsächlich auf experimentellen murinen Mausmodellen beruht. Weitere humane Studien sind notwendig, um wichtige Aufschlüsse über einen möglichen Einsatz von Naringenin in der Behandlung von CED zu erlangen.

1.2.1.2 Wirkmechanismus von Naringenin

Auf zellulärer Ebene wird angenommen, dass Naringenin sowohl Einfluss auf das angeborene Immunsystem als auch auf das adaptive Immunsystem nimmt. Auch eine Wirkung auf die intestinale Mikrobiota sowie die Funktion Naringenins als Antioxidans wird in der Literatur diskutiert. So soll Naringenin die Produktion von proentzündlichen reaktiven Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten abschwächen, welche die Barrierefunktion der Darmschleimhaut schädigen und den Gehalt an NO im Darmgewebe, der eine Form von oxidativem Stress darstellt, senken [148, 150-153].

Es wird beschrieben, dass Naringenin dosisabhängig die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 durch Monozyten und Makrophagen hemmt [154, 155]. Naringenin bewirkt vermutlich eine Inhibition der Adhäsionskraft von Monozyten an Endothelzellen, wodurch ihre transendotheliale Migration reduziert wird und folglich weniger Monozyten in aktivierte Makrophagen differenzieren [156, 157]. Naringenin vermag ebenfalls die Polarisierung von Makrophagen in den proinflammatorischen Phänotyp M1 zu hemmen und in den antientzündlichen M2-Phänotyp zu fördern, wodurch die Produktion des antientzündlichen IL-10 unterstützt wird

[147]. Bezüglich der dendritischen Zellen, welche an der Schwelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem stehen, deutet es darauf hin, dass Naringenin den Phänotyp von dendritischen Zellen in eine antientzündliche Richtung lenkt. Darüber hinaus wird die Zellreifung von dendritischen Zellen vermutlich insgesamt durch Naringenin inhibiert. Ferner führt Naringenin wahrscheinlich zu einer Reduktion der Fähigkeit von dendritischen Zellen, T-Zellen antigenspezifisch zu primen [158, 159]. Allerdings ist die Forschung über eine Wirkung von Naringenin auf das angeborene Immunsystem noch in den Anfängen und muss in Zukunft ergänzt werden [160].

Der Effekt von Naringenin auf CD4⁺ T-Zellen, als Vertreter des adaptiven Immunsystems, wurde bereits umfangreicher erforscht. Naringenin fördert in diesem Kontext vermutlich die Differenzierung von antientzündlichen Treg-Zellen [161, 162] und hemmt die Differenzierung von proinflammatorischen TH1-, TH9- und TH17-Zellen [149, 158, 163]. Als zugrunde liegende Signalwege für die oben beschriebenen Wirkungen auf zellulärer Ebene werden Wechselwirkungen Naringenins mit dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) [161, 164], dem *Toll-like* Rezeptor/ *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB)-Signalweg [148, 165-168] und mit *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Proteinen [149, 169] diskutiert. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass Naringenin sich also zum einen transkriptionell auf die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und zum anderen auf die Zellproliferation und -differenzierung durch eine Suppression oder Förderung von Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression über stromaufwärts gelegene Signalwege auswirkt. Aktuelle Studien zeigen darüber hinaus, dass Naringenin auch posttranskriptionell durch eine Lysosom-vermittelte Proteolyse die Zytokin-Ausschüttung selbst hemmt [170, 171]. Bezüglich der Wirkung Naringenins auf andere Vertreter des adaptiven Immunsystems wie z.B. B-Zellen gibt es kaum veröffentlichte Studien. Der Effekt von Naringenin auf CD8⁺ T-Zellen scheint laut Wang *et al.* sogar eher eine nachrangige Rolle zu spielen [149].

Naringenin wird eine bidirektionale Wirkung auf die intestinale Mikrobiota zugeschrieben. Auf der einen Seite wird es vermutlich von der Mikrobiota selbst in kleine Polyphenole umgewandelt und auf der anderen Seite bewirkt es Veränderungen in der Verteilung der intestinalen Kommensalen selbst, welche sich wiederum positiv auf den Wirt auszuwirken scheinen [172]. So soll flavonoidreiche Nahrung allgemein über eine Beeinflussung der intestinalen Mikroflora zur Reduktion von systolischem Bluthochdruck beitragen [134]. In Bezug auf Naringenin und seinem Vorläufermolekül Naringin konnte in murinen *in vivo* Modellen gezeigt werden, dass über einen Effekt auf die Mikrobiom-Leber-Cholesterolemie Achse Atherosklerose vorgebeugt und gelindert werden kann [173, 174]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Naringenin potenziell pathogene Enterobakterien wie den gramnegativen *Helicobacter pylori* und das grampositive *Staphylococcus aureus* [175] sowie das gramnegative *Salmonella typhimurium* [176] und das gramnegative *Escherichia coli* [177] in ihrem Wachstums- oder Adhäsionsverhalten hemmt. Außerdem vermag Naringenin das Wachstum des probiotischen Milchsäurebakterium *Bifidobacterium bifidum* zu fördern [178].

Allerdings gibt es auch Studien, die von einem hemmenden Einfluss von Naringenin auf potenziell gesundheitsfördernde Kommensale wie *Lactobacillus* oder einfache

Bakterienvertreter wie *Ruminococcus gauvreauii*, *Bacteroides galacturonicus*, und *Enterococcus caccae* berichten [177, 179]. Insgesamt sind weitere Studien notwendig, um den Wirkmechanismus von Naringenin besser zu verstehen und um genauere Aufschlüsse über die Relevanz der unterschiedlichen möglichen Angriffsorte zu gewinnen.

1.2.2 Glykosylierung von Flavonoiden

Flavonoide sind als biologisch aktive Substanzen in den Fokus der Wissenschaft gerückt und aufgrund ihres therapeutischen Potenzials von großem Interesse für das Gesundheitswesen. Allerdings ist ihr Einsatz durch eine geringe Wasserlöslichkeit und Stabilität oft limitiert und könnte z.B. durch eine Verzuckerung mittels Glykosylierung zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit optimiert werden [180]. Die Modifikation von Molekülen durch Glykosylierungen ist dabei ein weit verbreitetes und bekanntes Verfahren in der Biotechnik. Weitere diskutierte Methoden, die die Aufnahme von Flavonoiden in den Organismus erhöhen können, sind, neben der in dieser Arbeit beschriebenen biochemischen Modifikation durch Glykosylierung, beispielsweise der Einsatz von Liposomen, Nanopartikeln oder Nanosuspensionen [167, 172].

Die Katalyse der Reaktion für die Glykosylierung wird meist durch Glykosyltransferasen induziert und es kommen als Ausgangsstoffe verschiedene Moleküle wie z.B. Proteine und Lipide zum Einsatz. Im Fall von Naringenin-5-O-Rhamnosid (N5R) wurde der sekundäre Pflanzenstoff Naringenin glykosyliert [181-183] und soll in dieser Arbeit bezüglich eines möglicherweise optimierten Einsatzes bei Kolitis im Vergleich zu seinem Vorgängermolekül untersucht werden (siehe Abschnitt 1.2.3). Es gibt unterschiedliche Ansätze durch Bioengineering Glykosyltransferasen aus Bakterienstämmen zu modifizieren, sodass ihre Glykosylierungskapazität zum einen erhöht wird und zum anderen vielfältiger bei unterschiedlichen Flavonoiden eingesetzt werden kann. Erfolgreich getestet wurde hierbei beispielsweise die Produktion von Flavonoid-Rhamnosiden durch Ruprecht *et al.* mit einer Metagenom-abgeleiteten Glykosyltransferase C in *Escherichia coli*-Stämmen. Die Verwendung von aus Stärke gewonnenen Dextrinen diente dabei als einzige Kohlenstoffquelle und es wurden neben N5R unter anderem auch die Flavonoide Hesperetin zu Hesperetin-3'-O-Rhamnosid, Quercetin zu Quercitrin, Diosmetin zu Diosmetin-3'-O-Rhamnosid und Kaempferol zu Afzelin glykosyliert [184]. Die Möglichkeit der Verzuckerung durch biotechnisch modifizierte Bakterien mit erhöhter Glykosylierungskapazität stellt dabei ein neuartiges und zeitsparendes Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen Methoden der Glykosylierung dar. Diese Technik weist ein hohes Potenzial zur Optimierung des pharmazeutischen Einsatzes von Flavonoiden auf.

1.2.3 Naringenin-5-O-Rhamnosid

N5R (C₂₁H₂₂O₉, siehe Abbildung 2) ist eine biochemisch verzuckerte Form des Naringenin. Es wurde, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, in einem Fermentationsprozess durch Glykosylierung von Naringenin mit einem biotechnisch modifizierten *Escherichia coli*-Stamm durch Ruprecht *et al.* im Rahmen eines Projekts der Universität Hamburg

synthetisiert [184]. Es weist, wie Naringenin, Hydroxylgruppen an der vierten und siebten Position auf. An der fünften Position befindet sich darüber hinaus das Rhamnosid-Molekül mit Hydroxylgruppen an der zweiten, dritten und vierten Position.

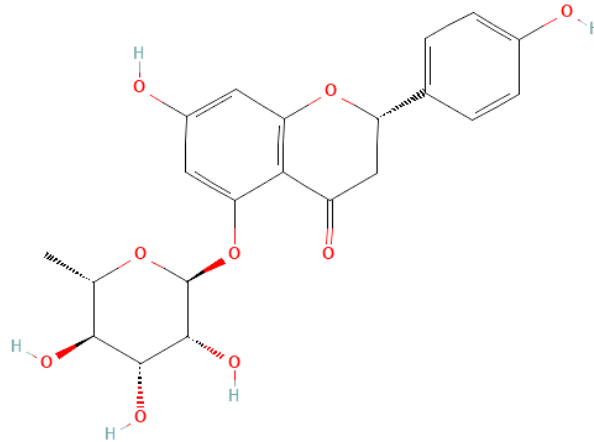


Abbildung 2: Strukturmolekül Naringenin-5-O-Rhamnosid [185]

Die Idee hinter der Entwicklung von N5R war, den in der Klinik limitierten Einsatz des therapeutisch vielversprechenden, aber schlecht bioverfügbaren Flavonoids Naringenin zu optimieren. Die beschriebene biochemische Modifikation von Naringenin zu N5R verfolgt das Ziel, eine Steigerung der therapeutischen Potenz durch Erhöhung der Hydrophilie zu erreichen. Außerdem ist die Einnahme von N5R durch den Patienten im Alltag einfacher, da es im Gegensatz zu Naringenin in einem Glas Wasser löslich ist und keine besonderen Lösungsmittel oder Verabreichungsformen erfordert. Neben der optimierten Bioverfügbarkeit und stärkeren antientzündlichen Wirkung wird durch den Einsatz von N5R durch das zusätzliche Zuckermolekül ein positiver Einfluss auf die Komposition der Darmmikrobiota erwartet. Durch die Spaltung der Rhamnosid-Verbindung könnte eine Verteilung der Mikrobiota-Zusammensetzung in Richtung gesundheitsfördernder Bakterien bewirkt werden. Insgesamt könnte sich ein verbesserter Einsatz durch N5R im Vergleich zu Naringenin in der klinischen Therapie ergeben.

N5R stellte sich darüber hinaus in nicht veröffentlichten initialen Experimenten der Universität Hamburg als besonders vielversprechend im Vergleich zu anderen synthetisierten Rhamnosiden dar und soll daher im Rahmen dieser Arbeit im spezifischen Kontext von Kolitis weiter erforscht werden.

1.3 Experimentelle Mausmodelle einer entzündlichen Darmerkrankung

1.3.1 DSS-Kolitis als chemisch induzierte Dickdarmentzündung

Das Modell der DSS-Kolitis ist ein in der Forschung weit verbreitetes Modell, da es leicht durchzuführen, reproduzierbar und einfach zu kontrollieren ist und gleichzeitig viele Ähnlichkeiten zur Colitis ulcerosa beim Menschen aufweist. Bei oraler Gabe von Dextransulfat Natriumsalz (DSS) im Trinkwasser von Nagetieren kann dabei chemisch eine akute oder chronische Darmentzündung erzeugt werden [186]. Das Ausmaß der Entzündung und die damit verbundene Schwere der Darmentzündung sind abhängig von der Konzentration des DSS und der Dauer der Gabe. Um eine akute Entzündungsreaktion auszulösen, wird das DSS einmalig für einen Zeitraum von in der Regel einer Woche gegeben, zur Induktion einer chronischen Entzündung in wiederkehrenden Zyklen [187]. Auch wenn die Wirkweise des DSS noch nicht vollständig verstanden ist, wird vermutet, dass das DSS durch die Komplexbildung mit mittellangen Fettsäuren die Membran des Kolonepithels durchdringen kann und dadurch zu einer Zerstörung der Integrität der Kolonozyten führt [188]. Das DSS greift die innere Mukusschicht des Darms an, sodass der schützende Schleim in seiner Funktionalität gestört ist und die Bakterien des Darms ihn passieren können. Es kommt zu einem Defekt der Tight junctions und durch die fehlende Schutzbarriere des Darmepithels zu einer Entzündungsreaktion [189, 190].

Eine DSS-Kolitis entspricht klinisch betrachtet am ehesten einer Colitis ulcerosa, wobei hauptsächlich der distale Abschnitt des Kolons befallen ist. Bei den Mäusen treten neben Gewichtsverlust blutig-schleimige Durchfälle auf und in der Histopathologie zeigen sich Kryptenabszesse und Ulzerationen der Darmwand [191, 192]. Zu beachten ist, dass eine DSS-Kolitis rein chemisch induziert ist und T- und B-Zellen in der Induktion der Krankheit keine Rolle spielen, wie es beim Menschen mit Colitis ulcerosa der Fall ist [193]. Erst nach mehreren Tagen in der späten Akutphase und der chronischen Phase sind vermehrt CD3⁺ Zellen im Kolon im Rahmen einer DSS-Kolitis detektierbar. Zu Beginn der Entzündungsreaktion sind vor allem die Zellen des unspezifischen angeborenen Immunsystems aktiv [194]. Die DSS-Kolitis kann in der Folge ebenfalls in Mäusen mit fehlender spezifischer erworbener Immunantwort, wie der lymphopenen *Recombination activating gene 1* (Rag1)^{-/-} Maus, ausgelöst werden und ermöglicht so z.B. die spezifische Erforschung des angeborenen Immunsystems [195].

1.3.2 T-Zell-Transfer-Kolitis

Die Durchführung einer T-Zell-Transfer-Kolitis ist ein beliebtes Verfahren in der Erforschung von CED, da sich in diesem Modell die Kolitis durch ein autoreaktives Immunsystem ausbildet in Analogie zum Menschen. Zur Induktion der Kolitis werden T-Zellen in eine Empfängermaus mit Immundefizienz transferiert. Es gibt unterschiedliche Modelle für die Durchführung der T-Zell-Transfer-Kolitis, wobei die CD45RB^{high}-Kolitis am häufigsten genutzt wird. Hierbei werden isolierte naive CD4⁺ T-Lymphozyten anhand ihrer Expression an CD45RB über Fluoreszenz-Markierung sortiert und in eine

immundefiziente Empfängermaus wie die lymphopene *Rag1*^{-/-} Maus transferiert. Durch den Transfer von naiven CD45RB^{high} T-Lymphozyten, welche sich in proentzündliche T-Effektorzellen differenzieren, in eine Maus ohne kompetente Immunantwort wird eine pathologische Entzündung im Kolon und im Dünndarm induziert. Die naiven CD45RB^{high}-Zellen reagieren dabei stark auf die Darmantigene und differenzieren in proinflammatorische TH1- und TH17-Zellen, aber nicht in antiinflammatorische Treg-Zellen. Sie schütten Zytokine aus, die in der Folge eine Pankolitis verursachen [196].

Insgesamt weist dieses Modell also Ähnlichkeit sowohl zum humanen Morbus Crohn (z.B. TH1- und TH17-Antwort) als auch zur Colitis ulcerosa (Ausbreitungsmuster) auf. Der Krankheitsverlauf einer T-Zell-Transfer-Kolitis dauert circa 4 bis 6 Wochen an und äußert sich zunehmend in fortschreitendem Gewichtsverlust und Diarrhoe der Maus. Histopathologisch zeigen sich eine transmurale Entzündung mit hoher Infiltration an neutrophilen Granulozyten und Kryptenabszesse [196-199]. Andere Modelle des adaptiven Transfers von T-Lymphozyten zur Induktion einer Kolonentzündung sind beispielsweise der Transfer von TH17-Zellen [200] oder CD8⁺ T-Lymphozyten in immundefiziente Mäuse [201].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das wissenschaftliche Ziel der Arbeit ist es, die therapeutische Anwendbarkeit von N5R bei CED zu untersuchen. In der Literatur finden sich Hinweise auf den positiven Einfluss von Flavonoiden und Flavonoid-Glykosiden. So wurden dem Flavonoid Naringenin in der Literatur bereits antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Naringenin-5-O-Rhamnosid (N5R) stellt eine neue und bislang nicht untersuchte Verbindung dar. Aufgrund des speziellen Rhamnoseresestes wird im Vergleich zu Naringenin eine erhöhte Stabilität des Moleküls erwartet, wodurch sich eine Langzeitwirkung und somit eine bessere therapeutische Effizienz ergeben könnte. Zusätzlich lässt die stark gesteigerte Wasserlöslichkeit auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit schließen. Somit ist anzunehmen, dass auch N5R einen positiven Einfluss auf das Entzündungsausmaß einer Kolitis hat und im Vergleich zu anderen Flavonoiden und Glykosiden ein aussichtsreicher Kandidat für eine therapeutische Anwendung bei CED ist. Möglicherweise stellt er sogar eine bessere Alternative im Vergleich zu seinem Vorgängermolekül Naringenin dar. Um diese Hypothese zu überprüfen, wird N5R zunächst *in vitro* getestet. Anschließend wird Mäusen mit einer DSS-induzierten Kolitis sowie Mäusen mit einer T-Zell-Transfer-Kolitis N5R oral appliziert. Als Kontrolle dient Naringenin, dessen positiver Einfluss bereits nachgewiesen werden konnte, und die Applikation eines Kontrollmediums ohne therapeutischen Effekt. Als Parameter der Analyse werden der Schweregrad der Kolitis *in vivo* (Koloskopie und Histologie) sowie die Aktivität des intestinalen Immunsystems *ex vivo* (Durchflusszytometrie) dienen. Darüber hinaus sollen Aufschlüsse über den möglichen Wirkmechanismus von N5R gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Die elementaren Chemikalien und Reagenzien im regelmäßigen Laborgebrauch wurden von den Herstellern Sigma-Aldrich, Merck, Tocris und Roth erworben. Alle weiteren spezifischen Materialien sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 1: Reagenzien für die *in vitro* Experimente und Tierversuche

| Reagenz | Hersteller |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Carboxymethylcellulose sodium | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| CD4 (L3T4) MikroBeads, Maus | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| Click's Medium | Irvine Scientific, Los Angeles, USA |
| Collagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i> | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dextran-Sodium-Sulfat (36000-50000 Da) | MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| Dithiothreitol (DTT) | PanReac AppliChem, Darmstadt |
| DNase | BD Bioscience, Heidelberg |
| Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 1 x und 10 x | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Honeywell Fluka™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Fetales Kälberserum (FBS) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Gepuffertes Peptonwasser (dehydriert) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (BHI) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Hanks' balanced salt solution (HBSS), 10X | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| L-Glutamin | Invitrogen, Carlsbad, USA |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Methylcellulose | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanone, C ₁₅ H ₁₂ O ₅), >98 % MW: 272,257 g/mol | Molekula, München |
| Naringenin-5-O-rhamnosid (N5R, C ₂₁ H ₂₂ O ₉), Prod. ID: 320 MW: 418,4 g/mol | Glyconic Projekt, Universität Hamburg |
| Naringenin, analytischer Standard, ≥95 % | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Penicillin-Streptomycin (Pen Strep), 10.000 U/ml | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Percoll | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| β-Mercaptoethanol | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| RPMI-Medium | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Thioglycolat-Medium | Merck, Darmstadt |
| Tryptanblau 0,4 %-Lösung | Sigma-Aldrich, Steinheim |

Tabelle 2: Reagenzien für die Durchflusszytometrie

| Reagenz | Hersteller |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| FACS Flow, 20l | BD Bioscience, Heidelberg |
| FACS-Reinigungslösung | BD Bioscience, Heidelberg |
| FACS-Spülungslösung | BD Bioscience, Heidelberg |
| Formaldehyd Lösung, Fixierung | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Nonidet P40 (NP40), Permeabilisierung | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SPHERO AccuCount Blank Particles | Spherotech Inc., Lake Forest, USA |
| Zombie UV, fixierbares Viabilität-Kit | BioLegend, London, England |

Tabelle 3: Reagenzien für die PCR-Genotypisierung

| Reagenz | Hersteller |
|----------------------------|----------------------------------------|
| 10x DreamTaq grüner Puffer | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

| | |
|---------------------------------|----------------------------------------|
| Agarose Ultra-Pure Company | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| dNTP-Mix | Fermentas, Waltham, USA |
| DreamTaq DNA Polymerase | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| EDTA 20mM | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter | Fermentas, Waltham, USA |
| NaCl 200mM | Carl Roth, Karlsruhe |
| Proteinase K | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| RNase freies Wasser | Carl Roth, Karlsruhe |
| Sodium Acetat, NaOAc 3M, pH 5,2 | PanReac AppliChem, Darmstadt |
| TE-Puffer, pH 8 | PanReac AppliChem, Darmstadt |

2.1.2 Primer

Tabelle 4: Primer für die Genotypisierung

| Zielgen | Primernamen | Primer Sequenz |
|-----------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| <i>Foxp3</i> ^{mRFP} -KI | FIR1 | CAA AAC CAA GAA AAG GTG GGC |
| | FIR2 | GGA ATG CTC GTC AAG AAG ACA GG |
| | FIR3 | CAT CTT GGA GAG TCG GTG TG |
| <i>Il17-a</i> ^{eGFP} -KI | IL-17A KI sense | CAC CAG CGC TGT GTC AAT |
| | IL-17A KI anti sense | ACA AAC ACG AAG CAG TTT GG |
| | IL-17A KI IRES | ACC GGC CTT ATT CCA AGC |
| <i>Ifn-γ</i> ^{Kat} -KI | SCIFNF1 | GCC CAA CAA CTT GTA TAC TTG GA |
| | SCIFNF2 | CGC AAT CAC AGT CTT GGC TA |
| | SC TURBO F2 | GCC CTG TGA TGC AGA AGA A |
| <i>Rag1</i> | Rag1WTF | GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG |
| | Rag1R | CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT |
| | Rag1MF | TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG |

2.1.3 Zytokine

Tabelle 5: Zytokine für die *in vitro* Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen

| Zytokin | Hersteller |
|----------------------------|----------------------------|
| Human TGF- β 1 | Biolegend, London, England |
| Maus-Interferon- γ | Biolegend, London, England |
| Maus-Interleukin-12 | PeptoTech GmbH, Hamburg |
| Maus-Interleukin-1 β | PeptoTech GmbH, Hamburg |
| Maus-Interleukin-2 | PeptoTech GmbH, Hamburg |
| Maus-Interleukin-23 | Biolegend, London, England |
| Maus-Interleukin-27 | Biolegend, London, England |
| Maus-Interleukin-6 | Biolegend, London, England |

2.1.4 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper für die *in vitro* Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen

| Antikörper | Klon | Hersteller |
|----------------------|-------|----------------------------|
| CD28 | 37.51 | Biolegend, London, England |
| CD3 | 2C11 | Biolegend, London, England |
| Interferon- γ | XMG | Biolegend, London, England |
| Interleukin-4 | 11B11 | Biolegend, London, England |

Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Antikörper | Klon | Färbung | Fluorochrome | Verdünnung | Hersteller |
|------------|-------|---------------|----------------------|------------|----------------------------|
| CD11b | M1/70 | Extrazellulär | PE-Cy7 | 1:400 | Biolegend, London, England |
| CD11c | N418 | Extrazellulär | PE-Cy7 | 1:400 | Biolegend, London, England |
| CD3 | 17A2 | Extrazellulär | AF700 | 1:100 | Biolegend, London, England |
| CD4 | RM4-5 | Extrazellulär | Pacific blue | 1:600 | Biolegend, London, England |
| CD4 | RM4-5 | Extrazellulär | PE-Cy7 | 1:600 | Biolegend, London, England |
| CD4 | RM4-5 | Extrazellulär | Brilliant violet 785 | 1:600 | Biolegend, London, England |

| | | | | | |
|----------------------|-----------|---------------|----------------------|--------|----------------------------|
| CD45 | 30-F11 | Extrazellulär | Brilliant violet 785 | 1:1000 | Biolegend, London, England |
| CD8 α | 53-6.7 | Extrazellulär | PE-Cy7 | 1:400 | Biolegend, London, England |
| Interleukin-10 | JES5-16E3 | Intrazellulär | APC | 1:100 | Biolegend, London, England |
| Interferon- γ | XMG1.2 | Intrazellulär | Brilliant violet 785 | 1:100 | Biolegend, London, England |
| N.K.1.1 | PK136 | Extrazellulär | Brilliant violet 421 | 1:600 | Biolegend, London, England |

2.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10x ACK-Puffer | 20,05 g NH ₄ Cl, 2,5 g KH ₂ PO ₄ , 0,093 g EDTA, 250 ml destilliertes H ₂ O |
| 10x TBS | 12,1 g Tris, 87,7 g NaCl, 1L destilliertes H ₂ O |
| Fix-Puffer | 3,64 % Formaldehyd in MACS-Puffer |
| MACS-Puffer | 2 mM EDTA, 1 % FBS in PBS |
| Perm-Puffer | 0,1 % NP40 in MACS-Puffer |
| Proteinase K-Puffer | 12,1 g Tris, 10 ml 0,5 M EDTA, 11,7 g NaCl, 5 ml SDS (20 %), 1 L destilliertes H ₂ O |
| TBE-Puffer | 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, aufgefüllt mit destilliertem H ₂ O zu einem Endvolumen von 1 L |
| Volles Click's Medium | Click's Medium ergänzt mit 10 % FBS, 1 % L- Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1:1000 β - Mercaptoethanol |

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|-------------------------|-------------------------------------|
| BD Microlance 3 Kanülen | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Einbettkassetten | Kabe Labortechnik, Nümbrecht |

| | |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Flexible Gavagiernadeln aus Plastik FTP-20-38 | Instech Laboratories, Plymouth Meeting, USA |
| Gewebekulturplatte 96-Well, flacher Boden | Sarstedt, Nümbrecht |
| MACS Separation Columns | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Objektträger | Carl Roth, Karlsruhe |
| Spritze 1ml | Braun, Kronberg im Taunus |
| Zellsieb 40, 70, 100 µm | Greiner, Kremsmünster, Österreich |

2.1.7 Geräte

Tabelle 10: verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Analysenwaage Praktum 224-1S | Sartorius, Göttingen |
| Axio Scope. A1 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| Axiocam MRc | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| Durchflusszytometer LSR II Fortessa | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Einbettssystem Tissue-Tek TEC | Sakura Finetek, Staufen im Breisgau |
| ColoView-System (Endoskop) | Karl Storz, Tuttlingen |
| MACS-Magnet: QuadroMACS Separator | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| Mikroskop DMIL LED | Leica Biosystem, Wetzlar |
| Mikrotom CUT 5062 | SLEE Medical, Nieder-Olm |
| Neubauer-Zählkammer (0,0025mm ²) | Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| PerfectBlue Gelsystem, Maxi M | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Präparationsbesteck | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Shandon Citadel 1000 Gewebe Prozessor | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Spektrophotometer: Nano-drop | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Thermal Cycler C1000 | Bio-Rad, Kalifornien, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg |
| UV Transilluminator Gel Doc TM XR+ | Bio-Rad, Kalifornien, USA |

| | |
|------------------------|-----------------------|
| Zentrifuge 5424 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge 5427 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge 5810/5427 R | Eppendorf AG, Hamburg |

2.1.8 Versuchstiere

Tabelle 11: Versuchstiere

| Mauslinie | Beschreibung |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C57Bl/6 | Wildtyp-Mäuse |
| DEREG | Expression des Diphtherie-Toxin (DTX) - Rezeptors auf Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3) ⁺ Treg-Zellen, Mäuse bei denen durch DTX-Injektion die Depletion der Foxp3 ⁺ Treg-Zellen möglich ist [202-204] |
| <i>Fir/Singer/Ifn-γ</i> ^{Katushka} | Koexpression von Fluoreszenzfarbstoffen für Foxp3, IL-17A, IFN-γ, Wildtyp-Reportermause mit Foxp3 ^{Monomeric Red Fluorescent Protein (mRFP) (Fir), Il-17a^{enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) (Singer) und Ifn-γ^{Katushka} [205, 206]}} |
| <i>Rag1</i> ^{-/-} | Homozygote Deletion für Rag1, Mäuse ohne reife B- und T-Lymphozyten [207] |

Die Tiere wurden unter spezifischen-Pathogen-freien (SPF)-Bedingungen in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) in einzelbelüfteten Käfigen gehalten. Die Raumtemperatur lag bei 20±2 Grad °C, die Humidität bei 55±10 % und der Hell-Dunkel-Rhythmus bei 12 Stunden. Futter und Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Für die Experimente wurden alters- und geschlechtsangepasste Mäuse genutzt. Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Vorlagen der ‘Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz’ in Hamburg genutzt und die Experimente wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung N019/2020 durchgeführt. Während der Versuche erfolgten eine tägliche Gewichtskontrolle und eine Aufzeichnung der Belastung gemäß dem Tierversuchsantrag. Bei Erfüllung der im Antrag definierten Bedingungen für einen Versuchsabbruch wurden die entsprechenden Tiere aus dem Experiment ausgeschlossen und umgehend euthanasiert. Abbruchkriterien für den Versuch stellten eine Reduktion des Gewichts der Mäuse um über 25 % des Ausgangsgewichtes oder einen durchschnittlichen endoskopischen Kolitis-Score von über 12 Punkten dar.

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Um den Genotyp der benutzten Mauslinien zu bestimmen, wurden sie per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genotypisiert. Die Reagenzien für die Genotypisierung sind in den Tabellen 3 und 9 gelistet. Zunächst wurden die Schwanzbiopsien bei 55 °C über Nacht durch Inkubation in 80 µl Proteinase K-Puffer mit 3 µl Proteinase K verdaut. Hierdurch wurde die DNA der Probe extrahiert. Die Hitzeinaktivierung der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Inkubation bei 95 °C für 15 Minuten. Zur Verdünnung der Proben wurden 200 µl destilliertes Wasser genutzt. Im nächsten Schritt wurde der spezifische Master Mix (siehe Tabelle 13 bis 16) zu 2 µl beziehungsweise 3 µl der Probe hinzugefügt.

Die Präsenz von *Il-17a^{eGFP}* Reportern wurde mit den Primern *IL-17A KI sense*, *IL-17A KI anti sense* und *IL-17A KI IRES* (siehe Tabelle 12) detektiert. Die PCR-Reaktion resultierte in einem Wildtyp-Produkt mit der Länge von 370 Basenpaaren (bp) und in einer Knock-in Amplifikation von 300 bp.

Tabelle 12: Master Mix Singer

| 26 µl + 3 µl DNA | Touchdown |
|---------------------------------|-----------|
| 10x Dream Taq master mix buffer | 3 µl |
| dNTPs (10 mM) | 0,6 µl |
| DreamTaq DNA Polymerase | 0,22 µl |
| IL-17A KI sense | 0,9 µl |
| IL-17A KI anti sense | 0,9 µl |
| IL-17A KI IRES | 0,9 µl |
| H ₂ O | 19,48 µl |

Die Präsenz von *Foxp3^{mRFP}* Reportern wurde mit den Primern *Foxp3-IRES-mRFP (FIR)1*, *FIR2* und *FIR3* detektiert (siehe Tabelle 13). Die PCR-Reaktion ergab ein Wildtyp-Produkt von 692 bp und eine Knock-in Amplifikation von 470 bp Länge.

Tabelle 13: Master Mix Fir

| 27 µl +3 µl DNA | Touchdown |
|----------------------------|-----------|
| 10x DreamTaq grüner Puffer | 3 µl |
| dNTPs (10 mM) | 3 µl |
| Dream Taq polymerase | 0,3 µl |
| FIR1 | 0,9 µl |
| FIR2 | 0,9 µl |
| FIR3 | 0,9 µl |
| H ₂ O | 18 µl |

Die Präsenz von *Ifn-γ*^{Katushka} Reportern wurde mit den Primern *SCIFNF1*, *SCIFNF2* und *SC TURBO F2* analysiert (siehe Tabelle 14). Die Wildtyp-Banden waren 450 bp und die Knock-In Banden 700 bp lang.

Tabelle 14: Master Mix IFN-γ-Katushka

| 13 µl + 2 µl DNA | Touchdown |
|---------------------------------|------------------|
| 10x Dream Taq master mix buffer | 1,5 µl |
| dNTPs (10 mM) | 0,3 µl |
| Dream Taq polymerase | 0,11 µl |
| SCIFNF1 | 0,45 µl |
| SCIFNF2 | 0,45 µl |
| SC TURBO F2 | 0,45 µl |
| H ₂ O | 9,74 µl |

Es wurden die Primer *Rag1 WTF*, *Rag1 R* und *Rag1 MF* (siehe Tabelle 15) für die Genotypisierung der *Rag1*^{-/-} Mäuse genutzt. Die Wildtyp-Banden zeigten eine Bandengröße von 474 bp, der Knock-Out eine Bandengröße von 530 bp.

Tabelle 15: Master Mix Rag1

| 22 µl + 3 µl DNA | Touchdown |
|---------------------------------|------------------|
| 10x Dream Taq master mix buffer | 2,5 µl |
| dNTPs (10 mM) | 1,5 µl |
| Dream Taq polymerase | 0,18 µl |
| Rag1 WTF | 0,75 µl |
| Rag1 R | 0,75 µl |
| Rag1 MF | 0,75 µl |
| H ₂ O | 15,57 µl |

Nach Mischung der DNA-Probe mit dem Master Mix erfolgte die Amplifikation der DNA in einem PCR-Cycler mit dem Amplifikationsprogramm Touchdown (siehe Tabelle 16). Die DNA-Proben wurden auf ein 1,5 % Agarosegel zur Trennung mittels Elektrophorese aufgetragen. Das Gel wurde mit 0,5x TBE-Puffer, Agarose und Ethidiumbromid hergestellt. Die Elektrophorese lief für 30 Minuten bei einer Spannung von 550 V. Im letzten Schritt wurden die PCR-Banden, welche durch Einlagerung des Ethidiumbromid im Gel gefärbt wurden, mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und ausgewertet.

Tabelle 16: Touchdown Programm

| Schritt | Temperatur in °C | Zeit in Minuten |
|---------|-----------------------------|-----------------|
| 1 | 94 | 5:00 |
| 2 | 94 | 0:40 |
| 3 | 65 (-0,3 °C/ Zyklus) | 0:40 |
| 4 | 72 | 0:55 |
| 5 | 39 x Wiederholung Schritt 2 | |
| 6 | 72 | 5:00 |
| 7 | 4 | ∞ |

2.2.1.1 Genotypisierung von Blutproben von DEREK Mäusen

Das Erscheinen des GFP markierten DTX-Rezeptor auf Foxp3⁺ Treg-Zellen in „*Depletion of Regulatory T cell*“ (DEREG) -Mäusen wurde durch die Genotypisierung von Blutproben kontrolliert. Für die Lyse der Erythrozyten wurde 10x Ammoniumchlorid-Kalium Lysepuffer (ACK-Lysepuffer) mit H₂O auf eine einfache Konzentration verdünnt. Die Blutprobe für die Genotypisierung wurde in 1 ml 1x ACK-Lysepuffer suspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 15 ml von 1x Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) / 1 % Fetales Kälberserum (FBS)-Puffer wurde die Lyse gestoppt. Die Zellen wurden im nächsten Schritt für 5 Minuten bei 350 rcf bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in einer 50 µl Antikörperverdünnung für 5 Minuten bei 4 °C mit CD4⁺ Antikörpern gefärbt (siehe Tabelle 7). Nach der Einwirkzeit wurden 250 µl PBS hinzugefügt und die Proben per Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.2 In vitro Zelldifferenzierung

2.2.2.1 Isolation von CD4⁺ T-Zellen unter Verwendung von magnetischer Zellseparation

Zur Isolation der CD4⁺ T-Zellen wurde die magnetische Zellseparation/ *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) genutzt [208]. Im ersten Schritt wurden die entnommenen Milzen und Lymphknoten aus *Fir/Singer/Ifn-γ^{Katushka}*-Mäusen durch ein steriles 100 µm Sieb gedrückt und mit MACS-Puffer gewaschen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und mit CD4⁺ T-Zell selektiven magnetischen Beads (Anti-CD4-Microbeads) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut mit MACS-Puffer gewaschen. Es wurden die MACS-Säulen vorbereitet, indem sie in einem Magneten platziert und mit 3 ml MACS-Puffer gefüllt wurden. Die Zellsuspension wurde durch ein steriles 100 µm Sieb gefiltert und in die Säule transferiert. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hatte, wurde sie erneut dreimal mit MACS-Puffer gewaschen. Die Spüllösung mit den CD4⁻ Zellen wurde verworfen. In der Säule befanden sich die CD4⁺ T-Zellen. Um sie zu gewinnen, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein 15 ml Falcon platziert. 5 ml MACS-Puffer wurde hinzugegeben und mit einem Stempel schnell herausgedrückt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Hierfür

wurden sie in einer 1:3-Verdünnung mit Tryptanblau-Lösung suspendiert. Es erfolgte die Konzentrierung auf 2×10^6 Zellen/ml in vollem Click's Medium. Nun wurden die Zellen auf Eis gelagert und die sterilen Naringenin- und N5R-Proben zubereitet.

2.2.2.2 *Th1/Th17/Treg Polarisierung mit/ ohne Inkubation von Naringenin und N5R*

Mit einer Analysenwaage wurden die entsprechenden Mengen an Naringenin und N5R steril abgewogen und mit der korrelierenden Menge an sterilem DMSO (0,1 %) für 10 mM, 50 mM und 100 mM-Ansätze verdünnt. Außerdem kam eine DMSO-Kontrolle ohne Flavonoid-Zugabe zum Einsatz. Es wurden im nächsten Schritt 2 µl der Flavonoid-DMSO-Lösung zu 1 ml der Zellsuspension hinzugefügt. Für die *in vitro* Differenzierung der CD4⁺ T-Helferzellen in verschiedene T-Helferzellsubtypen (TH17, TH1, Treg) wurden unterschiedliche polarisierende Zellkulturbedingungen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAb) und Zytokinen angesetzt (siehe Tabelle 17 bis 19). 100 µl der Antikörper-Zytokin-Mischungen wurden auf eine 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden gegeben und 100 µl CD4⁺ T-Zellen mit der entsprechenden Flavonoid-DMSO-Lösung hinzugefügt, sodass eine endgültige Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml mit jeweils 10 µM, 50 µM, 100 µM Naringenin oder N5R vorlag. Es erfolgte die fünftägige Kultivierung unter den entsprechenden Polarisationsbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂.

Tabelle 17: TH17-Polarisationsbedingungen

| Antikörper, Zytokine | Konzentration |
|----------------------|---------------|
| IL- 6 | 10 ng/ml |
| mAb CD28 | 2 µg/ml |
| mAb CD3 | 10 µg/ml |
| mAb IL- 4 | 10 µg/ml |
| mAb INF-γ | 10 µg/ml |
| TGF-β1 | 0,25 ng/ml |

Tabelle 18: TH1-Polarisationsbedingungen

| Antikörper, Zytokine | Konzentration |
|----------------------|---------------|
| IL-12 | 10 ng/ml |
| IL-2 | 100 U/ml |
| mAb CD28 | 10 µg/ml |
| mAb CD3 | 10 µg/ml |
| mAb IL- 4 | 10 µg/ml |

Tabelle 19: Treg-Polarisationsbedingungen

| Antikörper, Zytokine | Konzentration |
|----------------------|---------------|
| IL-2 | 50 U/ml |
| mAb CD28 | 2 µg/ml |
| mAb CD3 | 2 µg/ml |
| TGF-β1 | 2 ng/ml |

Nach den 5 Tagen wurden die Zellen für die extrazelluläre Färbung, wie in Abschnitt 2.2.9.2 beschrieben wird, vorbereitet und per Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 DSS-Kolitis

Den Mäusen wurde zur Induktion einer akuten DSS-Kolitis 1,5 % DSS im Trinkwasser für 7 Tage appliziert. Beim Einsatz der *Rag1*^{-/-} Mäuse wurde 2 % DSS verwendet [209]. Am Tag sieben wurde das DSS entfernt und durch normales Trinkwasser ersetzt. Die Mäuse wurden täglich zur Beobachtung des Gewichtsverlustes gewogen und täglich mit Carboxymethylcellulose, Naringenin und N5R gavagiert. Die endoskopische Kolitis-Bewertung erfolgt in der Regel an Tag acht, elf und 15. Am Tag 9 erfolgte die Zellisolation.

2.2.3.2 T-Zell-Transfer-Kolitis

Zur Induktion der T-Zell-Transfer-Kolitis wurden im ersten Schritt CD4⁺ T-Helferzellen aus der Milz und den Lymphknoten von Reporter-mäusen via MACS isoliert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Im nächsten Schritt wurden sie extrazellulär mit CD45RB^{high} Antikörpern markiert und per FACS-Sort sortiert. Anschließend wurden sie auf 0,8-1x 10⁶ Zellen/ml konzentriert und 200 µl Zellsuspension pro *Rag1*^{-/-} Empfängermaus intraperitoneal (i.p.) injiziert [210]. Es erfolgte eine Gewichtsbestimmung zweimal wöchentlich und eine tägliche Gavage an Naringenin, Carboxymethylcellulose und N5R. Ab Woche zwei erfolgte eine wöchentliche endoskopische Kontrolle.

2.2.3.3 DEREK-Zellen Rekonstitution in *Rag1*^{-/-} Mäusen

Zur Rekonstitution der CD4⁺-DEREG-T-Zellen in lymphopenen *Rag1*^{-/-} Mäusen wurden in einem ersten Schritt CD4⁺ T-Helferzellen aus der Milz und den Lymphknoten von DEREK Mäusen via MACS, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben, isoliert und gezählt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen den Mäusen zur Rekonstitution in einer Konzentration von 2x 10⁶ Zellen in 100 µl PBS retrobulbär injiziert. Die Etablierung des Zelltransfers nahm circa 4 Wochen in Anspruch. Der Erfolg der Rekonstitution wurde durch Genotypisierung der Blutproben der rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäuse, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, kontrolliert. Die mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäuse wurden alle 3 Tage mit

30 ng DTX /g Körpergewicht, gelöst in 100 µl PBS, i.p. injiziert, um die Foxp3⁺ Treg-Zellen zu depletieren. Die Kontrollgruppen erhielten 100 µl reines PBS.

2.2.4 Käfighaltung

Vorexperimente zeigten, dass Naringenin und N5R beziehungsweise deren Abbauprodukte nach der oralen Applikation im Stuhl von Mäusen nachweisbar sind. Um eine mögliche Koprophagie-bedingte Verzerrung zu vermeiden, wurden die unterschiedlichen Testgruppen daher getrennt voneinander auf die Käfige verteilt.

2.2.5 Orale Applikation von Naringenin und N5R

2.2.5.1 *Aufbereitung von Naringenin und N5R*

Carboxymethylcellulose stellte sich neben anderen getesteten Mitteln, wie beispielsweise Methylcellulose, NaCl, in Wasser verdünntes Tween 80 oder in Wasser verdünntes PEG, als bestes Lösungsmittel für Naringenin heraus und wurde daher als Verdünnungsagent für Naringenin gewählt. Die Carboxymethylcellulose wurde für die Zubereitung im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und 1 mg Naringenin in 200 µl Carboxymethylcellulose (50 mg/kg Körpergewicht) verdünnt. Danach wurde die Lösung für circa eine Minute gevortext.

Da N5R durch die chemische Modifikation zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit im Gegensatz zu Naringenin eher hydrophile Eigenschaften aufweist, wurde es zunächst in autoklaviertem Wasser gelöst. Um vergleichbare Grundbedingungen zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin-Probe zu gewährleisten, wurde es anschließend mit Carboxymethylcellulose (final 10 % H₂O) in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht gemischt. Die Lösungen wurden entweder frisch verabreicht oder nach der Zubereitung als Aliquots bei -20 °C eingefroren. Von einer Verabreichung von N5R und Naringenin im Futter der Mäuse wurde abgesehen, da durch die Gavage garantiert werden konnte, dass alle Mäuse täglich die gleiche Menge an N5R oder Naringenin appliziert bekamen.

2.2.5.2 *Gavage*

Die Mäuse wurden ab Tag fünf vor Versuchsbeginn sowohl im Modell der akuten DSS-Kolitis als auch im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis täglich mit N5R und Naringenin gavagiert. Hierfür wurden flexible Gavagiernadeln aus Plastik zum einmaligen Gebrauch verwendet [211, 212]. Die Kontrollgruppe erhielt 200 µl Carboxymethylcellulose. Die mit den Flavonoiden behandelten Mäuse wurden mit jeweils 50 µg N5R oder Naringenin /g Körpergewicht, gelöst in Carboxymethylcellulose, gavagiert. Durch die frühe Applikation an Tag fünf vor Versuchsbeginn wurde eine Steigerung der Wirkung von Naringenin und N5R erwartet. Die Gavage erfolgte abends immer zur selben Zeit, da Mäuse nachtaktiv sind und somit eine bessere Aufnahme der Flavonoide durch die Anpassung an ihren zirkadianen Rhythmus erwartet werden konnte [213, 214].

2.2.6 Etablierung eines kolitogenen Mikrobioms

Zur Etablierung des kolitogenen Mikrobioms ist eine fäkale Mikrobiota-Transplantation notwendig. Hierfür wurden entweder frische Stuhlproben oder eingefrorene Aliquots eines kolitogenen, gering-komplexen Mikrobioms (beinhaltet *Helicobacter hepaticus*) verwendet. Um frischen Stuhl für die Transplantation zu gewinnen, wurde der gesamte Darminhalt einer Donormaus mit einem kolitogenen, gering-komplexen Mikrobiom inklusive des Inhaltes des Coecums entnommen und in flüssiges Thioglykolat Medium gegeben. Der Stuhl wurde im nächsten Schritt durch ein 70 µm Sieb gefiltert und mit 15 ml *Brain Heart Infusion* (BHI) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 10 Minuten bei 500 rcf und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Zu diesem Zeitpunkt konnten die aufbereiteten Stuhlproben entweder direkt für die fäkale Mikrobiota-Transplantation genutzt oder zum Einfrieren aufbereitet und aliquotiert werden. Die frischen Stuhlproben zur direkten Verwendung wurden in 3 ml BHI resuspendiert. Zur Herstellung gefrorener Aliquots wurde das Pellet in 3 ml 20 % Glycerol in PBS resuspendiert und eingefroren. Im nächsten Schritt wurden den Empfängermausen 200 µl der frischen Stuhllösung gavagiert.

Um die gefrorenen Aliquots für die fäkale Mikrobiota-Transplantation zu nutzen, wurden sie für kurze Zeit im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in 13 ml BHI-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 rcf und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml BHI für ein Aliquot gelöst. Im nächsten Schritt wurde den Empfängermausen wie bei der frischen Stuhltransplantation 200 µl der Stuhllösung gavagiert. Die Mäuse wurden zur Etablierung der neuen Mikrobiota für 5 Wochen in ihren Käfigen gehalten.

2.2.7 Kleintierendoskopie

Die Kleintierendoskopie diente zur Einschätzung der Schwere der Kolitis und wurde verblindet mit einem Endoskop für Kleintiere der Firma Karl Storz durchgeführt [215]. Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert, sodass nach Einführung des Endoskops über den Anus bis zur linken Kolonflexur die Einstufung der Schwere der Darmentzündung nach gängigen Kriterien durchgeführt werden konnte [216]. Diese Kriterien beinhalten die Konsistenz des Stuhls, die Transparenz, Vaskularität und die Granularität des Kolongewebes sowie den Fibrinbelag. Dabei konnten die einzelnen Punkte auf einer Skala von 0 (keine Kolitis) bis 3 (maximale Ausprägung der Kolitis) evaluiert werden.

2.2.8 Organentnahme und Zellisolation

Am Tag der Zellisolation wurden die Mäuse zunächst mit einer Mischung aus CO₂ und O₂ in einem Verhältnis von 80 % CO₂ und 20 % O₂ anästhetisiert. Es erfolgte eine Euthanasie bei 100 % CO₂. Wenn keine Atmung und keine Reflexe mehr vorlagen, wurde eine cervikale Dislokation durchgeführt. Das Fell wurde mit 70 % Ethanol (EtOH) eingesprüht und zunächst die Haut und später das Peritoneum eröffnet. Die Lymphknoten wurden mesenterial und zum Teil inguinal, axillär und submandibulär entnommen. Im nächsten Schritt wurde die Milz entnommen und das Fett entfernt. Der Dickdarm wurde vom Anus

bis unterhalb des Zäkums abgetrennt und nach Entfernung des Fettes die Länge gemessen. Die Stuhlreste im Darm wurden gesammelt, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80 °C für spätere Analysen zurückgelegt. Distal des Kolons wurden zwei etwa 0,5 cm lange Stücke abgeschnitten. Der proximale Teil des analen Abschnittes wurde für eine mögliche Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation entnommen, auf Trockeneis gelagert und bei -80 °C aufbewahrt. Der weiter distale Teil wurde für die Histologie in entsprechend beschrifteten Einbettkassetten in 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelagert. Das restliche Kolon wurde longitudinal eröffnet, in 1x PBS gereinigt und für die spätere Zellisolation genau wie Milz und Lymphknoten auf Eis aufbewahrt.

2.2.8.1 Isolation der Lymphozyten aus dem Kolon

Für die Isolation der intraepithelialen Lymphozyten (IELs) wurde das Kolon in kleine Stücke geschnitten und in 10 ml Dithioerythritol (DTE) Lösung verdaut, nachdem frisches Dithiothreitol (DTT) mit der Konzentration 1,5 mg/10 ml hinzugefügt wurde. Die Proben wurden für 20 Minuten bei 37 °C im Inkubator horizontal liegend geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden zelluläre Stücke von der Lösung durch das Sieben durch ein 100 µm Sieb und mit 40 ml 1x PBS/ 1 % FBS gewaschen. Die IELs wurden bei 350 rcf und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert und auf Eis gelagert. Das Gewebe wurde weiter verdaut, um die Lymphozyten aus der Lamina propria zu isolieren. Hierfür wurde das Gewebe weiter mit einer Schere zerkleinert, sodass eine homogene Masse entstanden ist und in 4 ml Kollagenase Lösung mit 100 U/ml Kollagenase und 1000 U/ml DNase für 45 Minuten bei 37 °C horizontal schüttelnd weiter verdaut. Die Masse wurde durch ein 100 µm Sieb gedrückt, mit 1xPBS/1 % FBS gewaschen und auf das Zellpellet der IELS gegeben. Die zusammengeführten Lymphozyten des Kolons wurden erneut bei 350 rcf und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 3 ml 40 % Percoll suspendiert und vorsichtig auf 3 ml 67 % Percoll pipettiert. Der Gradient wurde bei Raumtemperatur und 400 rcf für 20 Minuten bei niedriger Beschleunigung und Abbremsung zentrifugiert. Die Grenzfläche wurde vorsichtig in 1 ml gesammelt und mit 14 ml 1x PBS/ 1 % FBS gewaschen. Die Zellen wurden schließlich erneut bei 350 rcf und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert und für die extrazelluläre Färbung vorbereitet (siehe Abschnitt 2.2.9.2).

2.2.8.2 Isolation der Lymphozyten aus den Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden durch ein 40 µm Sieb gedrückt und mit 1x PBS/ 1 % FBS gewaschen. Im nächsten Schritt folgte eine Zentrifugation der Zellsuspension in einem 50 ml Falcon für 5 Minuten bei 350 rcf bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen für die extrazelluläre Färbung vorbereitet (siehe Abschnitt 2.2.9.2).

2.2.9 Durchflusszytometrie und Zell-Sorting

Als Puffer zum Waschen der Zellen für die Durchflusszytologie/ Flow Cytometry (FACS) wurde 1x PBS/1 % FBS benutzt. Die Zentrifugation zur Erstellung eines Zellpellets erfolgte bei 350 rcf und 4 °C für 7 Minuten.

2.2.9.1 Lebendfärbung isolierter Zellen

Um lebende von toten Zellen abzugrenzen, wurden die isolierten Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Zombie UVTM Fixable Viability Kit gefärbt. Das heißt, die Zellen wurden im Dunkeln für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 µl Zombie-Färbung in 1xPBS in der Verdünnung 1:200 inkubiert. Die Zelloberflächen wurden danach gewaschen und die extrazelluläre Färbung begonnen.

2.2.9.2 Extrazelluläre Färbung

Bevor die extrazelluläre Färbung der isolierten Zellen durchgeführt wurde, erfolgte eine FC-γ-Rezeptor-Blockierung, um unspezifische Antikörperbindungen an Zellen zu vermeiden [217]. Hierfür wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit FC-Block (1:100) gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C eingewirkt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Fluoreszenz markierten Antikörpern verdünnt in 1x PBS/ FBS gefärbt. Die jeweiligen Verdünnungen sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Färbung der Zelloberflächen wurde im Dunkeln bei 4 °C für 20 Minuten durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 150 µl PBS/FBS resuspendiert.

2.2.9.3 Zellzählung über die Durchflusszytometrie

Zur Analyse der organspezifischen Anzahl an Zellen wurden SpheroTM AccuCount Blank Partikel benutzt. Diese wurden in den Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt und am FACS ausgewertet. Abhängig von der am FACS gezählten Nummer an Counting Beads wurde die Anzahl der Zellen nach Produktanleitung berechnet.

2.2.9.4 FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe wurde an einem LSR II Durchflusszytometer mit der Software FACS Diva durchgeführt. Die gesammelten Daten wurden mithilfe der Software Flowjo (Version 10.8.1) und Microsoft-Excel ausgewertet.

2.2.9.5 FACS-Sort

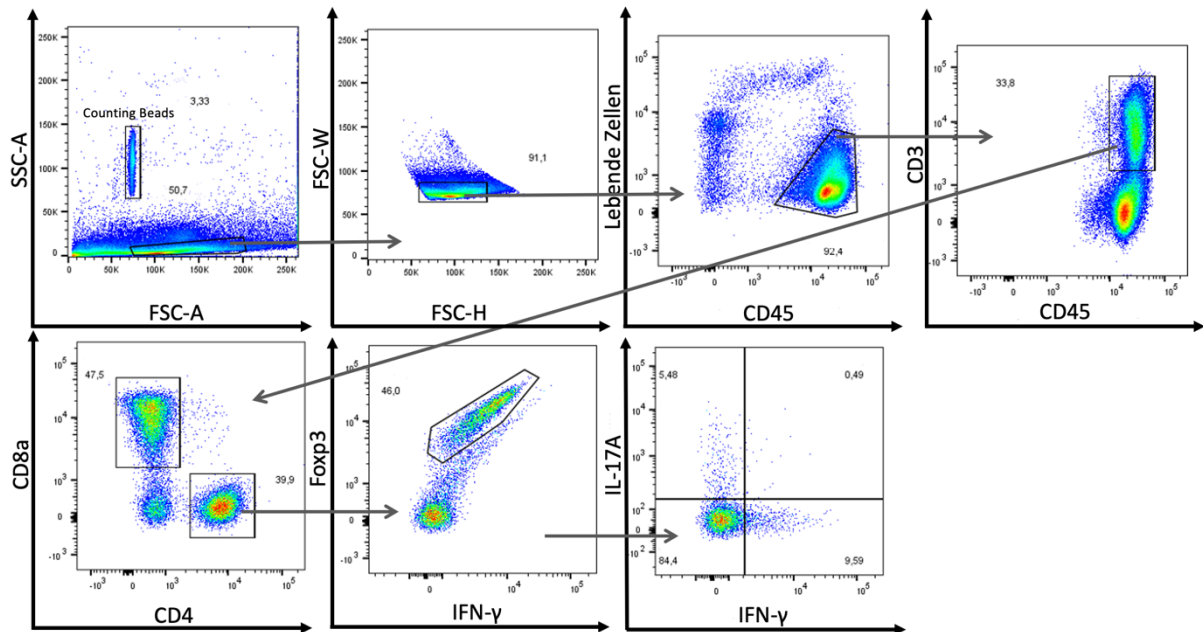
Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.9.2 beschrieben extrazellulär gefärbt und durch ein 40 µm Sieb gefiltert, um eine Verstopfung der Sorter-Düse zu vermeiden. Gesammelt wurden die Zellen in einem 15 ml Gefäß mit vollem Click's Medium. Das FACS-Sorting wurde an einer BD FACS Aria IIIu oder AriaFusion durchgeführt.

2.2.9.6 Gating-Strategie

Zunächst wurde die Population der Lymphozyten im FSC-A/SSC-A-Fenster durch ihre Größe und Granularität abgegrenzt. Durch Auswahl von Zellen mit linearem FSC-H/FFC-W-Verhältnis erfolgte die Auswahl von Einzelzellen. In der weiteren Analysestrategie wurden lebende CD45⁺ Immunzellen ausgewählt. In den folgenden Schritten wurden die spezifischen Immunzellen anhand der Expression ihrer zelltypischen Oberflächenmarker und der gewählten Färbung, wie in den Abbildungen 3 und 4 exemplarisch gezeigt, analysiert. Es wurde sich dabei entweder auf die Zellen des angeborenen oder des adaptiven Immunsystems konzentriert.

Tabelle 20: Zellen des adaptiven Immunsystems

| Zellpopulation | Oberflächenmarker bzw. Fluoreszenzfarbstoffe |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Leukozyten | Oberflächenmarker: CD45 ⁺ |
| Foxp3 ⁺ Treg-Zellen | Oberflächenmarker: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ Fluoreszenzfarbstoffe: <i>Foxp3</i> ⁺ <i>Ifn-γ</i> ⁻ |
| TH17-Zellen | Oberflächenmarker: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ Fluoreszenzfarbstoffe: <i>Foxp3</i> ⁻ <i>Ifn-γ</i> ⁻ <i>Il-17a</i> ⁺ |
| TH1-Zellen | Oberflächenmarker: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ Fluoreszenzfarbstoffe: <i>Foxp3</i> ⁻ <i>Ifn-γ</i> ⁺ <i>Il-17a</i> ⁻ |

Abbildung 3: Gating-Strategie der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen.

Gating-Strategie der *in vivo* entnommenen T-Zellen aus *Foxp3*^{RFP}, *Il17a*^{eGFP}, *Ifng*^{Katushka}-Reporter-mäusen. Von den CD4⁺ T-Zellen wurden für die Analyse der TH1- und TH17-Zellen im letzten Fenster die Foxp3⁺-Treg-Zellen subtrahiert (negatives Gate) und im Anschluss nach Zytokinproduktion in die TH1- und TH17-Zellen aufgeteilt. Die Analyse kam mit Anpassung an die jeweilige Färbung für alle Experimente zur Anwendung. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden Counting Beads verwendet.

Tabelle 21: Zellen des angeborenes Immunsystems

| Zellpopulation | Oberflächenmarker |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Leukozyten | CD45 ⁺ |
| Neutrophile Granulozyten | CD45 ⁺ CD3 ⁻ Ly6g ⁺ CD11b ⁺ |
| Monozyten/ Makrophagen (resident) | CD45 ⁺ CD3 ⁻ Ly6g ⁻ CD11b ⁺ CD11c ⁻ Ly6c ⁻ |
| Monozyten/ Makrophagen (inflammatorisch) | CD45 ⁺ CD3 ⁻ Ly6g ⁻ CD11b ⁺ CD11c ⁻ Ly6c ⁺ |
| Dendritische Zellen | CD45 ⁺ CD3 ⁻ NK1.1 ⁻ CD11c ⁺ |
| NK-Zellen | CD45 ⁺ CD3 ⁻ NK1.1 ⁺ CD11c ⁻ |

Um die insgesamt erfassten Zellen des angeborenen Immunsystems zu steigern, wurde auf eine spezifische Subcharakterisierung der einzelnen Zellen, wie beispielsweise der dendritischen Zellen und Monozyten beziehungsweise ihnen abgeleiteter Zellen, verzichtet.

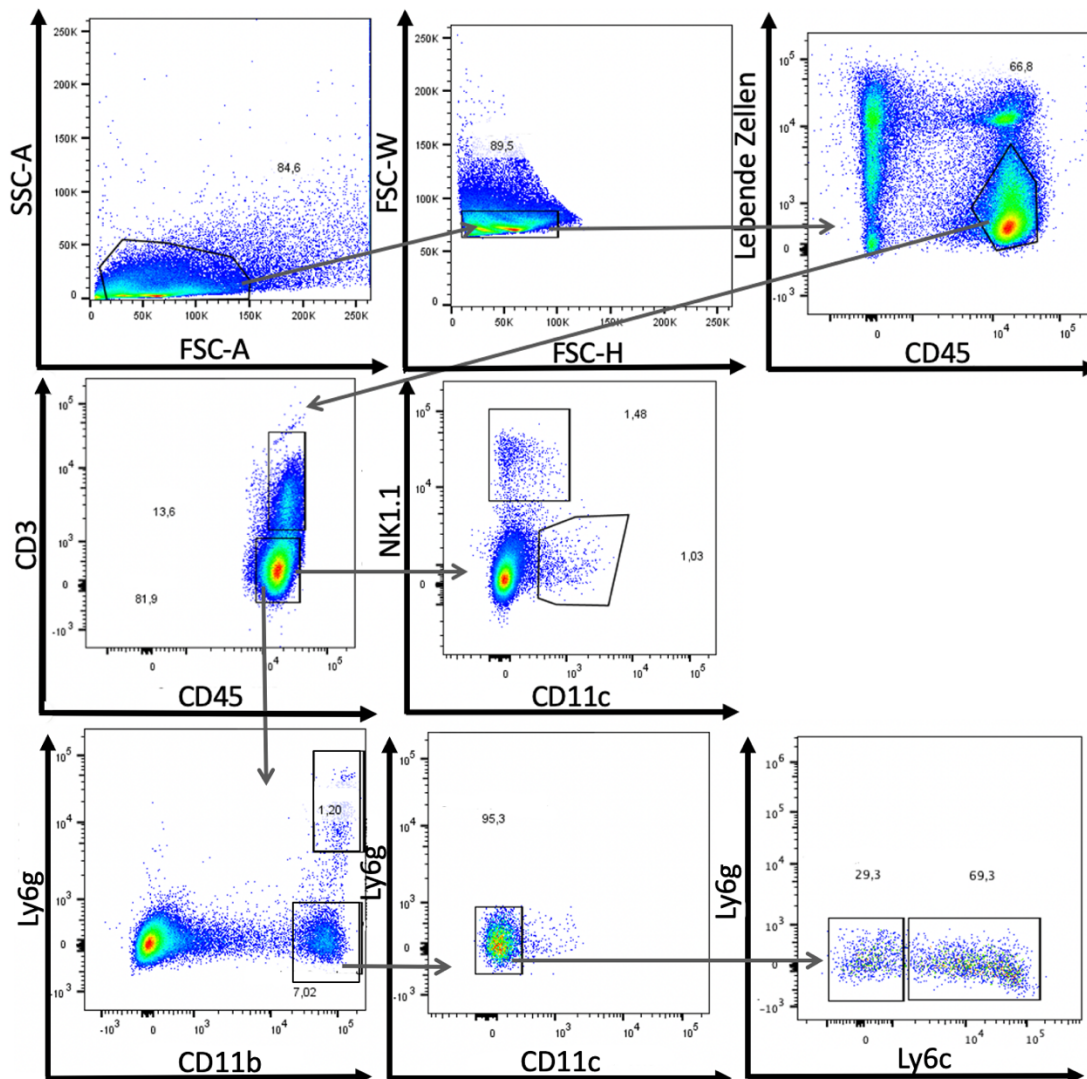


Abbildung 4: Gating-Strategie des angeborenes Immunsystems.

Gating-Strategie der *in vivo* entnommenen Leukozyten aus *Foxp3^{RFP}*, *Il17a^{eGFP}*, *Ifng^{Katushka}*-Reporter-mäusen. Anhand der zelltypischen Oberflächenmarker erfolgte eine Identifizierung der Monozyten/ Makrophagen,

dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen. Die Analyse kam mit Anpassung an die jeweilige Färbung für alle Experimente zur Anwendung.

2.2.10 Histologie

Um das Kolongewebe histologisch zu untersuchen, wurden die Proben nach der Entnahme für mindestens 24 Stunden in 4 % PFA fixiert. Das Paraformaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen des Gewebes für 10 Minuten mit frischem PBS auf einem Schüttler bei Raumtemperatur entfernt. Danach wurden die Proben in einer automatisch kontrollierten Abfolge an Schritten über insgesamt circa 15 Stunden entwässert. Hierfür wurden sie zunächst für 3 Stunden bei Raumtemperatur in 50 % EtOH gelagert und dann in immer höhere Konzentrationen mit 60 %, 70 %, 96 % und schließlich 100 % EtOH transferiert. Anschließend wurden die Proben zunächst in Xylol und dann in Paraffin gelagert und anschließend in Paraffin für das Schneiden eingebettet.

Zur Erleichterung des Schneidevorgangs wurden die entstandenen Paraffin-Blöcke bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert. Die Blöcke wurden am Mikrotom in feine Scheiben von 5 µm geschnitten und im nächsten Schritt auf einen Objektträger aus Glas transferiert. Es folgte ein Trocknungsprozess über Nacht bei 37 °C.

2.2.11 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Auswertung der Gewebestruktur und Detektion potenzieller Veränderungen wurden die histologischen Proben des Kolons mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt. Die Entfernung des Paraffins wurde durch ein Bad der Proben in Xylol in dreistufiger Abfolge für jeweils 10 Minuten durchgeführt. Als Nächstes wurden die Proben in drei kurzen Schwenken in Ethanol in absteigender Konzentration von 96 % EtOH, 80 % EtOH und schließlich 70 % EtOH rehydriert. Danach wurden die Objektträger in Leitungswasser gewaschen und für 20 Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt, um die Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum sichtbar zu machen.

Es wurde eine erneute Waschung mit Leitungswasser vollzogen. Im Anschluss erfolgte die einminütige Gegenfärbung der Proben mit Eosin, um die Membranstrukturen, Mitochondrien und das glatte endoplasmatische Retikulum zu färben. Die Proben wurden wieder in Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die Trocknung erfolgte in vier kurzen Schwenken in Ethanol in steigender Konzentration von 70 % EtOH, 80 % EtOH, 96 % EtOH und erneut 96 % EtOH. Als Nächstes wurden die Proben dreimal für 10 Minuten in Xylol fixiert. Abschließend wurden die Objektträger, mit dem gefärbten Kolongewebe, mit Kleber benetzt und mit einer dünnen Glasplatte abgedeckt. Die Begutachtung der Proben wurde durch einen Pathologen durchgeführt. Die Auswertung der Kolitis-Ausprägung orientierte sich an den gängigen Beurteilungskriterien.

2.2.12 Aufbereitung von Stuhlproben zur Detektion von Naringenin und N5R

Die Stuhlproben von mit Carboxymethylcellulose, Naringenin und N5R gavagierten Mäusen wurden für die Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) frisch entnommen und in Methanol aufbereitet.

2.2.13 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC wurde genutzt, um die Überreste an Naringenin und N5R in den murinen Stuhlproben zu detektieren. Hierfür wurden die in Methanol aufbereiteten Stuhlproben an die Abteilung für Mikrobiologie & Biotechnologie der Universität Hamburg übergeben, welche die HPLC-Messungen durchführte.

2.2.14 Statistische Analysen

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). Die Daten sind Einzelmessungen aus zwei (im Fall der *in vivo* Experimente) oder drei bis fünf (im Fall der *in vitro* Experimente) separaten Versuchen. Sie werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Für die *in vitro* Experimente (nichtparametrisch, gepaart) wurde die einfaktorielle *Analysis of variance* (ANOVA) in Form des Dunnett's Multiple Comparison Test genutzt.

In den *in vivo* Experimenten (nichtparametrisch, ungepaart) wurde für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Rangsummentest verwendet (Vergleich von

Naringenin und N5R zur Kontrolle). Bei einem signifikanten Unterschied erfolgte ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test der einzelnen Gruppe gegen die Kontrollgruppe. Für die Gewichts- und Endoskopieverläufe von mehr als zwei Gruppen über mehrere Tage wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Bei signifikanter Interaktion folgte jeweils ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test der einzelnen Gruppe gegen die Kontrollgruppe. Ein p-Wert von unter 5 % ($p = 0,05$) wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

N5R stellt eine neuartige Verbindung dar, deren Wirksamkeit in nicht publizierten initialen *in vitro* Versuchen der Universität Hamburg an humanen Keratinozyten, aber bisher nicht im Zusammenhang mit Darmentzündungen, getestet und mit seinem Vorläufermolekül Naringenin verglichen wurde. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Auswirkung N5Rs im Kontext von Kolitis untersucht. Hierfür wurde zunächst die Differenzierung von *in vitro* kultivierten CD4⁺ T-Helfer-Zellen als entscheidende Akteure in der Immunpathologie von Darmentzündungen unter Inkubation mit N5R im Vergleich zu Naringenin betrachtet. Im nächsten Schritt erfolgte die Testung *in vivo* im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Wirkmechanismus von N5R gegenüber Naringenin näher untersucht. Hierfür wurde eine durchflusszytometrische Zellanalyse während des Krankheitsschubs der akuten DSS-Kolitis durchgeführt. Um den isolierten Einfluss von N5R auf das angeborene Immunsystem zu betrachten, wurde die akute DSS-Kolitis in lymphopenen *Rag1*^{-/-} Mäusen wiederholt. Das Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis sowie eine akute DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen wurden verwendet, um Erkenntnisse über den spezifischen Einfluss von N5R auf T-Zellen *in vivo* zu erlangen.

3.1 *In vitro* Differenzierung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen

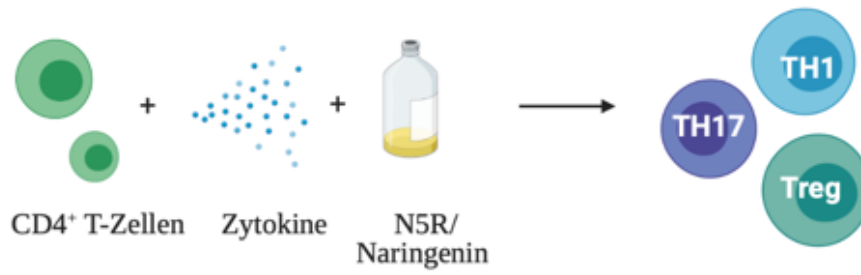
Zu Beginn wurde der Einfluss von N5R auf die *in vitro* Differenzierung von bestimmten CD4⁺ T-Helfer-Zellen betrachtet. TH1-, TH17- und Treg-Zellen sind wesentliche Akteure in der Immunpathologie von CED. Studien haben gezeigt, dass ein Ungleichgewicht in der Regulierung dieser Zellen, vor allem eine gestörte Homöostase der TH1-, TH17 und Treg-Zellen, zu intestinaler Entzündung führen kann [200, 218-221]. Daher wurden CD4⁺ T-Helfer-Zellen unter den entsprechenden polarisierenden Zellkulturbedingungen für TH1-, TH17- und Treg-Zellen mit verschiedenen Antikörpern und Zytokinen sowie mit N5R kultiviert. Naringenin diente als positive Kontrolle, da für das Vorgängermolekül von N5R bereits ein Effekt auf die Differenzierung von unterschiedlichen CD4⁺ T-Helfer-Zellen beschrieben wurde [149, 161, 162].

3.1.1 Einfluss von Naringenin

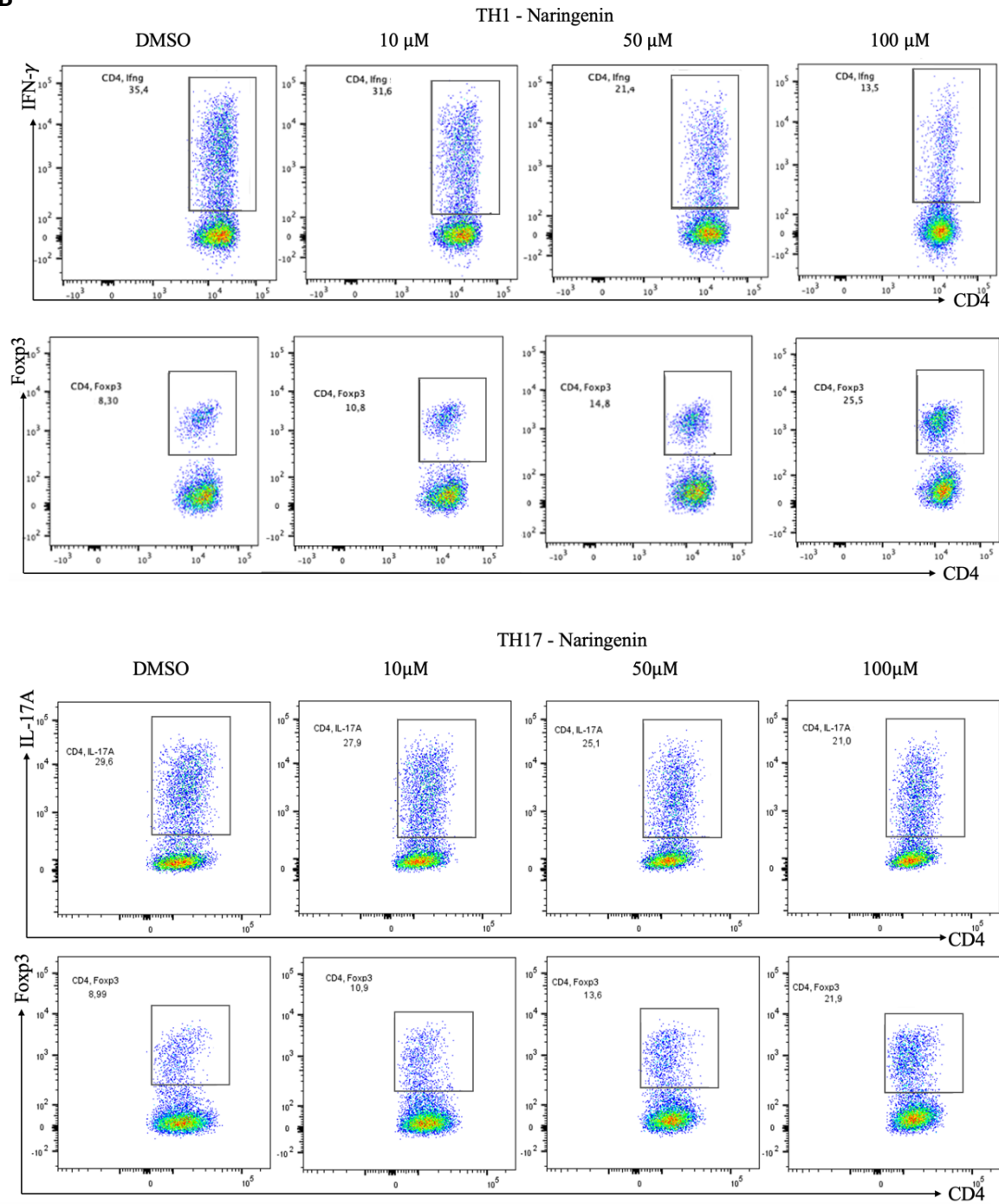
Zunächst wurde getestet, ob der bereits in der Literatur beschriebene Effekt von Naringenin auf die Differenzierung von verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen reproduziert werden konnte. Studien zeigten, dass Naringenin *in vitro* die Induktion der antientzündlichen Treg-Zellen fördert [161, 162] und die eher proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen sowohl in ihrer Differenzierung als auch in ihrer Proliferation inhibiert [149]. CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Milz von *Foxp3*^{RFP}, *Il17a*^{eGFP}, *Ifn-γ*^{Katushka}-Reporter-mäusen isoliert und *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen an Naringenin unter den entsprechenden polarisierenden Zellkulturbedingungen kultiviert. Ein zelltoxischer Effekt von Naringenin wurde dabei in den verwendeten Konzentrationen von 10 µM, 50 µM und 100 µM, welche auch in der Literatur beschrieben werden, ausgeschlossen [158]. Die untersuchten Zellpopulationen wurden anhand der von ihnen am meisten produzierten Zytokine als TH1- (IFN-γ⁺) und TH17-Zellen (IL-17A⁺) beziehungsweise im Fall der Treg-Zell-Population über die Expression des Haupttranskriptionsfaktors Foxp3 per Durchflusszytometrie detektiert.

Erwartungsgemäß konnten die bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bezüglich eines veränderten Differenzierungsverhaltens der untersuchten T-Zell-Subgruppen durch Naringenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle reproduziert werden. Es zeigte sich, dass Naringenin konzentrationsabhängig die Population der proinflammatorischen TH1-Zellen (**p = 0,0019 bei 100 µM) und TH17-Zellen (*p = 0,0428 bei 100 µM) senkte. Die Differenzierung der antiinflammatorischen Foxp3⁺ Treg-Zellen wurde hingegen durch Naringenin gefördert (*p = 0,0274 bei 100 µM). Interessanterweise erhöhte Naringenin auch unter nicht spezifisch für Treg-Zellen polarisierenden Zellkulturbedingungen die Treg-Zellen in den TH1- und TH17-Differenzierungskulturen (siehe Abbildung 5).

A



B



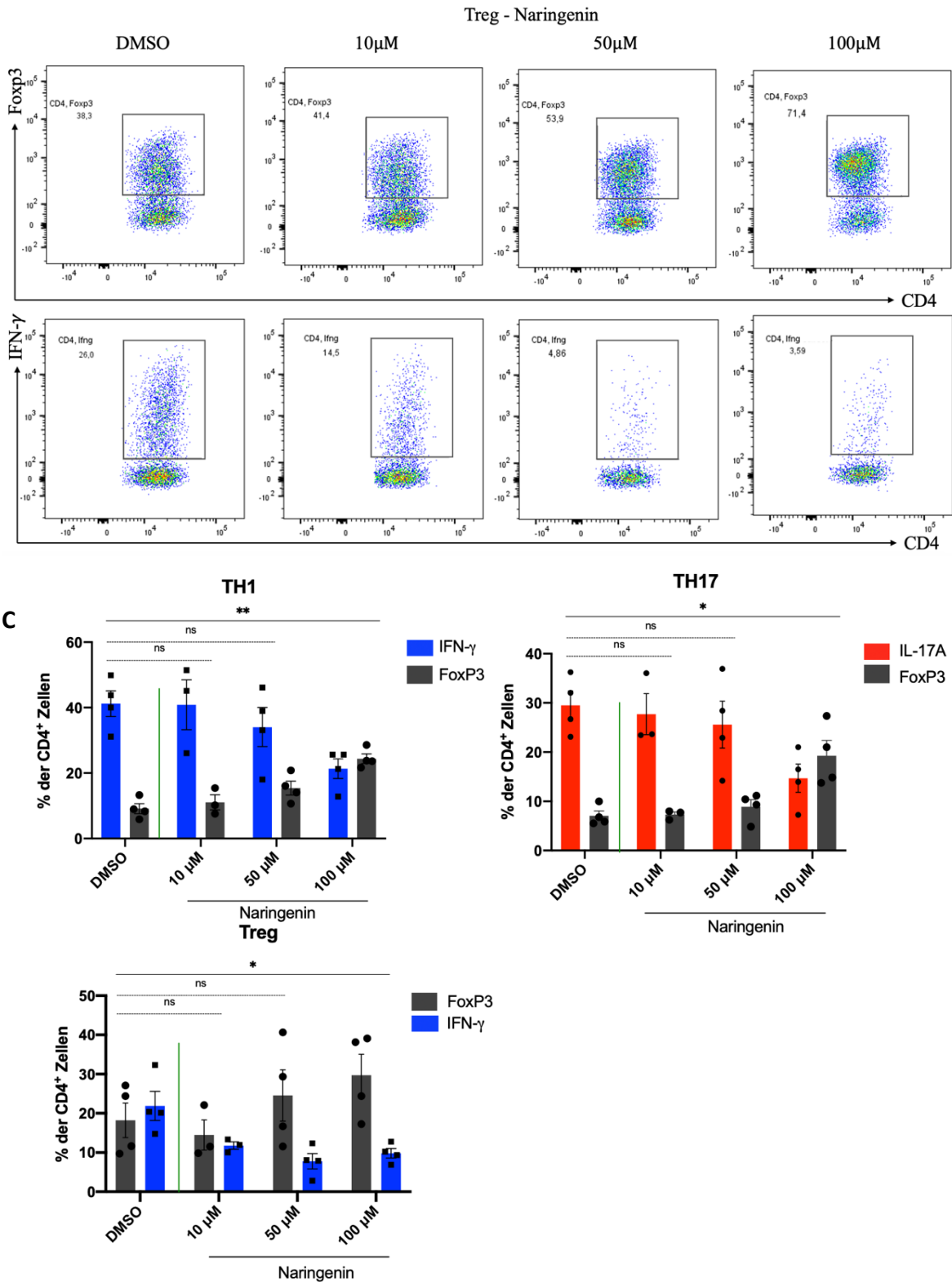
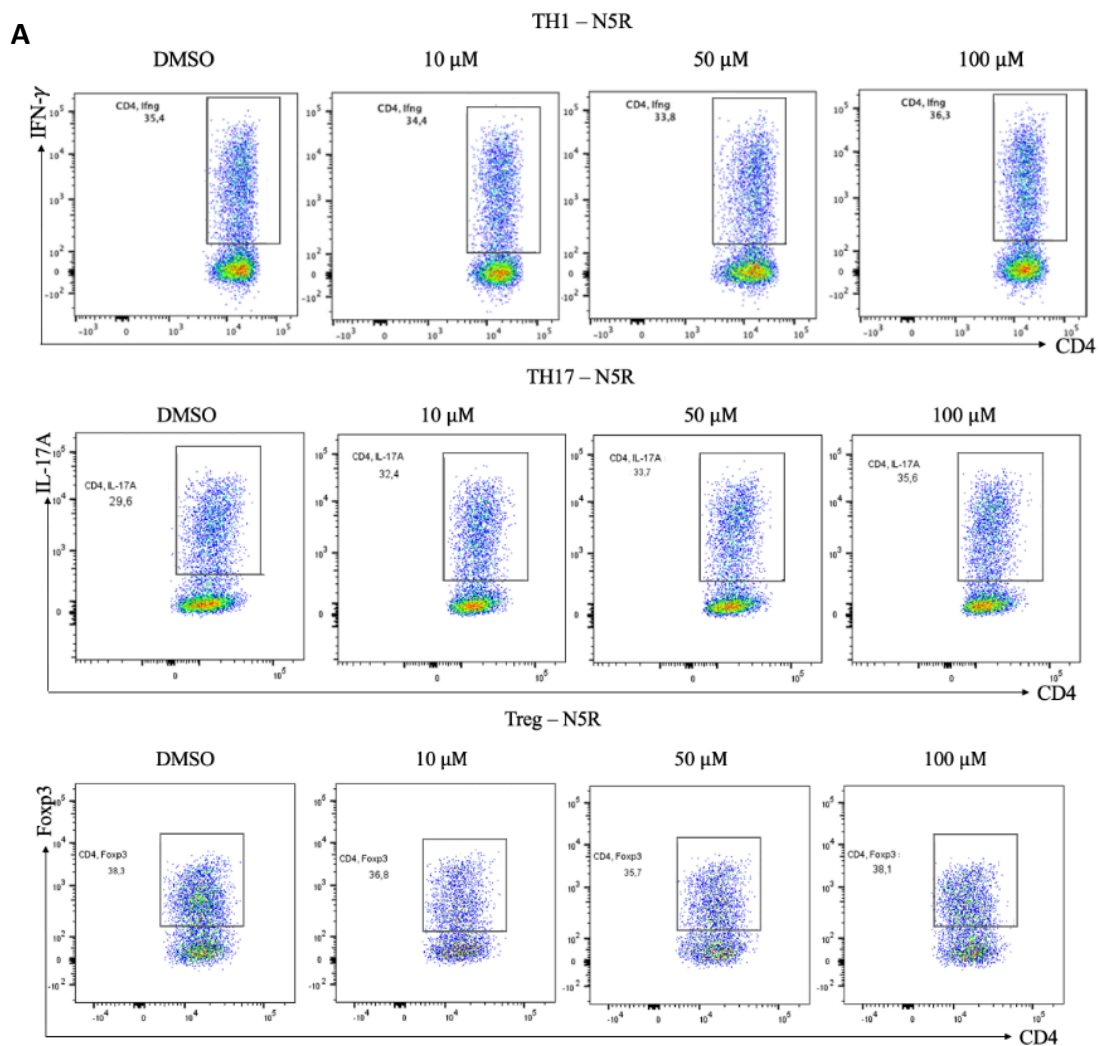


Abbildung 5: Naringenin reduziert die proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen und fördert die antiinflammatorischen Treg-Zellen.

Der Einfluss von Naringenin auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen aus *Foxp3*^{RFP}, *Il17a*^{GFP}, *Ifn-γ* *Katshka*-Reporter-mäusen unter TH1-, TH17- und Treg-Zellen-Polarisationsbedingungen *in vitro*; DMSO-Kontrolle im Vergleich zur 10 µM, 50 µM und 100 µM Naringenin. **A)** Experimentelles Setup im Zeitstrahl; **B)** Repräsentative durchflusszytometrische Analysen; **C)** Ergebnisse aus drei oder teilweise vier unabhängigen Experimenten mit Durchschnittswerten von technischen Duplikaten; die statistische Auswertung erfolgte mittels Dunnett's Multiple Comparison Test; *p < 0,05; **p < 0,01.

3.1.2 Einfluss von N5R

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von N5R auf die Differenzierung von TH1-, TH17- und Treg-Zellen im gleichen Versuchsaufbau wie für Naringenin getestet. CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von *Foxp3*^{RFP}, *Il17a*^{eGFP}, *Ifn-γ*^{Katushka}-Reporter-mäusen wurden *in vitro* unter den entsprechenden polarisierenden Zellkulturbedingungen kultiviert und N5R in den Konzentrationen 10 μM, 50 μM und 100 μM hinzugegeben. Das neuartige N5R zeigte in diesen Experimenten keine signifikante Wirksamkeit. Im beschriebenen Versuchsaufbau konnte kein Einfluss von N5R auf die TH1-, TH17 oder auf die Treg-Zellen unter den zelltypischen Kulturbedingungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert werden. (siehe Abbildung 6).



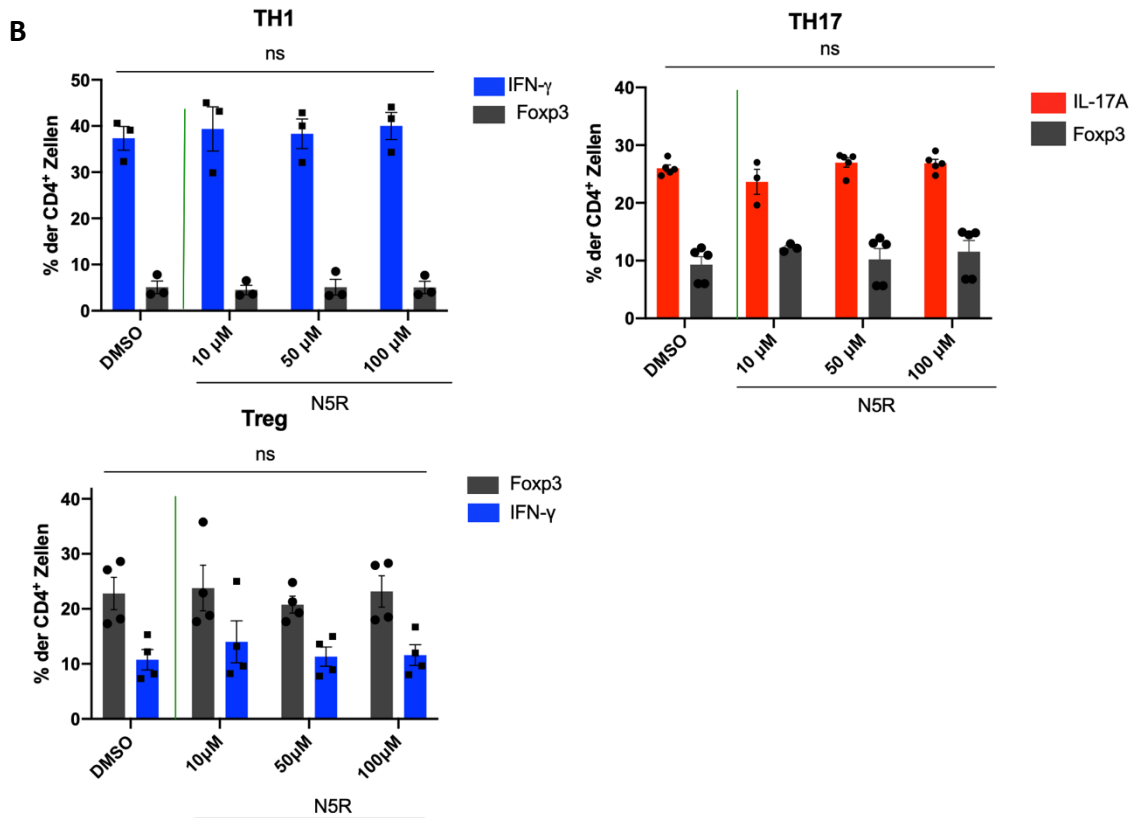


Abbildung 6: Kein Einfluss von N5R auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen unter TH1-, TH17- und Treg-Polarisationsbedingungen *in vitro*.

Der Einfluss von N5R auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen aus *Foxp3*^{RFP}, *Il17a*^{eGFP}, *Ifn- γ* ^{Katushka}-Reporterermäusen unter TH1-, TH17- und Treg-Zellen-Polarisationsbedingungen *in vitro*; DMSO-Kontrolle im Vergleich zu 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M N5R. **A**) Repräsentative durchflusszytometrische Analysen; **B**) Ergebnisse aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten mit Durchschnittswerten von technischen Duplikaten; die statistische Auswertung erfolgte mittels Dunnett's Multiple Comparison Test.

Zusammenfassend ließ sich in den durchgeführten *in vitro* Differenzierungen von TH1-, TH17- und Treg-Zellen unter Inkubation mit Naringenin und N5R nur der in der Literatur beschriebene Effekt von Naringenin reproduzieren, wohingegen das neuwertige N5R keine Änderungen im Differenzierungsverhalten der betrachteten CD4⁺ T-Zellen bewirkte. Naringenin senkte dabei konzentrationsabhängig die proentzündlichen TH1- und TH17-Zellen in den entsprechenden polarisierenden Zellkulturbedingungen und förderte die antientzündlichen Treg-Zellen.

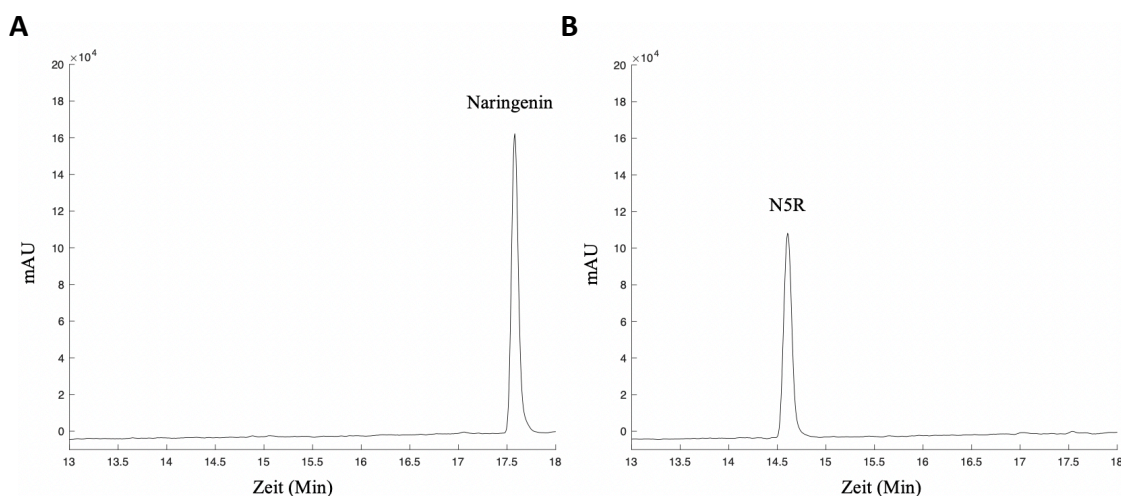
3.2 Einfluss von N5R auf den Verlauf einer Kolitis *in vivo*

Eine Hypothese für die ausbleibende Effektivität N5Rs *in vitro* könnte die fehlende enzymatische Spaltung des zusätzlichen Zuckermoleküls durch die intestinale Mikrobiota und die somit fehlende biologische Aktivierung von N5R sein. Es besteht die Möglichkeit, dass hierbei eine Analogie zur Pharmakokinetik des Flavonoids Quercetin und seinem Glykosid Quercitrin/3-Rhamnosylquercetin besteht. In der Studie von Comalada *et al.* entfaltete die verzuckerte Form des Flavonoids (Quercitrin/3-Rhamnosylquercetin) *in vitro* keine Wirkung, sondern nur *in vivo* und dies in einer höheren Potenz als sein Aglycon Quercetin [222]. Bei Annahme einer möglichen pharmakokinetischen Ähnlichkeit der Flavonoide Quercetin und Naringenin und der Wirkweise ihrer Rhamnoside sollte daher im folgenden Schritt die Testung N5Rs *in vivo* erfolgen.

3.2.1 Etablierung der Versuchsanordnung

Es ist bekannt, dass Mäuse den Kot ihrer Artgenossen verzehren, was als koprophages Verhalten bezeichnet wird [223-226]. Es gibt Hinweise darauf, dass Flavonoide wie Naringenin von der Darmmikrobiota in kleinere Polyphenole umgewandelt und über Urin und Stuhl ausgeschieden werden [227, 228]. Daher wurde angenommen, dass die verbleibenden Mengen von Naringenin, N5R und deren Stoffwechselprodukte in den Ausscheidungen der Mäuse eine pharmakologische Aktivität auf die Kontrollmäuse bei gemischten Käfigen aufweisen könnten. Vorexperimente bestätigten dieses Verhalten.

Zum Nachweis der Flavonoide in den Ausscheidungen der Mäuse wurden HPLC-Analysen von aufbereiteten Stuhlproben aller Testgruppen durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass geringe Mengen an Naringenin und N5R im Stuhl aller Mäuse bei gemischter, aber nicht bei separater Käfighaltung detektierbar waren (siehe Abbildung 7). Es wurde in der Konsequenz darauf geachtet, mögliche Koprophagie-bedingte Verzerrungen zu vermeiden, indem die unterschiedlichen Gruppen getrennt voneinander auf die Käfige verteilt wurden.



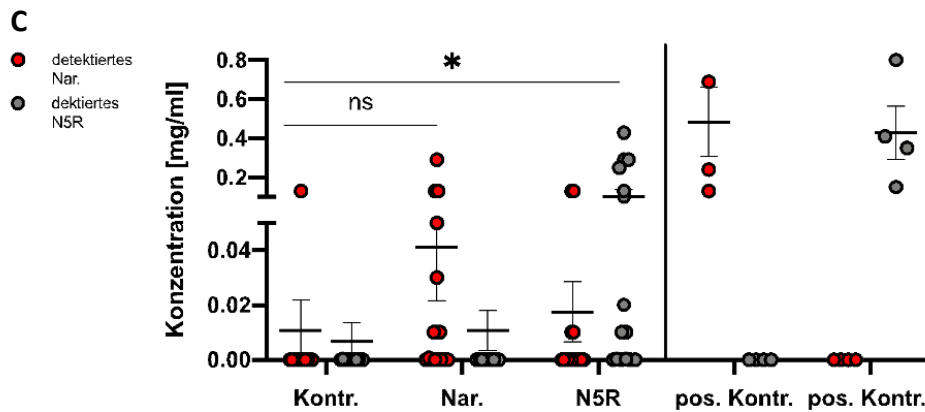


Abbildung 7: N5R und Naringenin lassen sich in sehr geringen Mengen im Stuhl der Mäuse nachweisen.

HPLC-Analysen von Stuhlproben von mit Carboxymethylcellulose und 50 mg/kg N5R bzw. Naringenin gavagierten Mäusen, extrahiert in Methanol; HPLC-Eichgeraden von **A**) Naringenin und **B**) N5R; Y-Achse: Milli-Absorbance Units (mAU). **C**) Konzentration an N5R und Naringenin in Stuhlproben von Mäusen der Kontroll-, N5R- und Naringeningruppe. Die Analysen wurden sowohl bei gemischter als auch getrennter Käfighaltung durchgeführt; $n_{\text{Kontrolle}} = 12$, $n_{\text{N5R}} = 16$ und $n_{\text{Naringenin}} = 16$. Positive Kontrollen von Naringenin mit $n_{\text{Kontrolle}} = 4$ und N5R mit $n_{\text{N5R}} = 4$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest sowie mittels Wilcoxon-Mann-Whitney für N5R bzw. Naringenin gegenüber der Kontrolle (**C**) * $p < 0,05$.

Um einen möglichen Käfig-Effekt, der beschreibt, dass eine Behandlungsgruppe im selben Käfig durch ein sich angleichendes Mikrobiom innerhalb der Gruppe eine erhöhte Ähnlichkeit im Versuch aufweist [229, 230], komplett auszuschließen, wäre eine Alleinhaltung der Tiere im Käfig nötig gewesen. Nach Abwägung der höheren Belastung bei Alleinhaltung für die Mäuse als soziale Gruppentiere [231] und aus logistischen Gründen wurde davon jedoch abgesehen. Da sich die Phänotypen von N5R und Naringenin in mehreren voneinander unabhängigen Versuchen reproduzieren ließen, ist ein alleiniger Käfig-Effekt unwahrscheinlich.

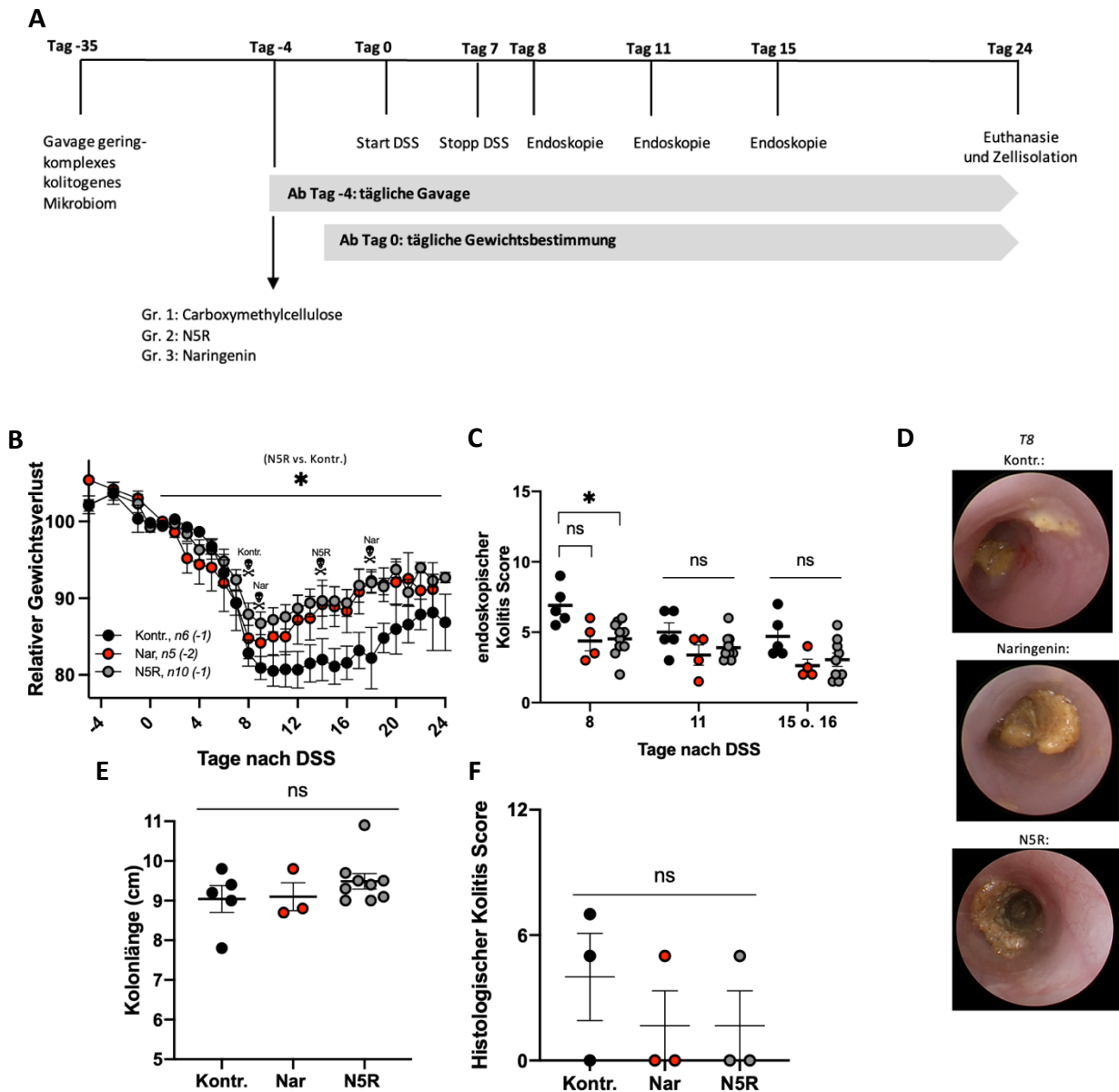
3.2.2 Akute DSS-Kolitis

Die Hypothese, dass N5R *in vivo* aktiv ist, sollte in einem nächsten Schritt im Modell der akuten DSS-Kolitis überprüft werden. Wie in Abbildung 8A gezeigt, wurde 5 Tage vor der Verabreichung des DSS mit der Gavage der Mäuse mit N5R und Naringenin, als positive Kontrolle begonnen. Die Kontrollgruppe erhielt reine Carboxymethylcellulose. Nach der Beobachtung des akuten Schubs und der anschließenden Remission der Kolitis wurde der Versuch an Tag 24 in der Phase der Remission beendet.

Gemäß der Veranschaulichung in Abbildung 8B-F entwickelten alle drei Gruppen eine Kolitis, deren Ausmaß durch die Kriterien Gewichtsverlust, endoskopischer und histologischer Kolitis-Score sowie die Kolonlänge beschrieben wird. Besonders am Peak der Kolitis sind deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Während die Kontrolltiere einen maximalen Gewichtsverlust von circa 20 % an Tag 9 aufwiesen, zeigten die Mäuse, die mit N5R gavagiert wurden, einen signifikant geringeren Gewichtsverlust (* $p = 0,0317$) von maximal 13 % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht und die Naringeningruppe einen Gewichtsverlust von 15 %. Die N5R- und die Naringeningruppe

erholten sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe schnell und gingen rasch in die Remissionsphase über. Die Kontrollmäuse wiesen insgesamt eine stärkere und längere Phase des akuten Schubs als die behandelten Mäuse auf. Auch im endoskopischen Kolitis-Score zeigte sich bei den Kontrollmäusen besonders zu Beginn des akuten Schubs eine stärkere, und im Vergleich zu den mit N5R behandelten Mäusen an Tag 8 signifikant erhöhte Entzündungsaktivität.

Im Verlauf der Remission glichen sich besonders die N5R- und die Naringeningruppe an, was sich in Bezug auf den relativen Gewichtsverlust, die Endoskopie, die Histologie und die Kolonlänge verdeutlichte. Hinsichtlich der Kolonlänge bildeten sich in der Phase der Remission an Tag 24 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ab. Die histologische Analyse des mit HE gefärbten Gewebes zeigte Kolongewebe, welches sich in der Remission befand. Leider konnte das histologische Scoring aufgrund mangelnder Qualität einzelner Präparate nicht mit allen Proben durchgeführt werden (siehe Abbildungsbeschreibung 8F). Das histologische Scoring ist nicht signifikant. Beispielhafte mikroskopische Ausschnitte sind in Abbildung 8G dargestellt.



G

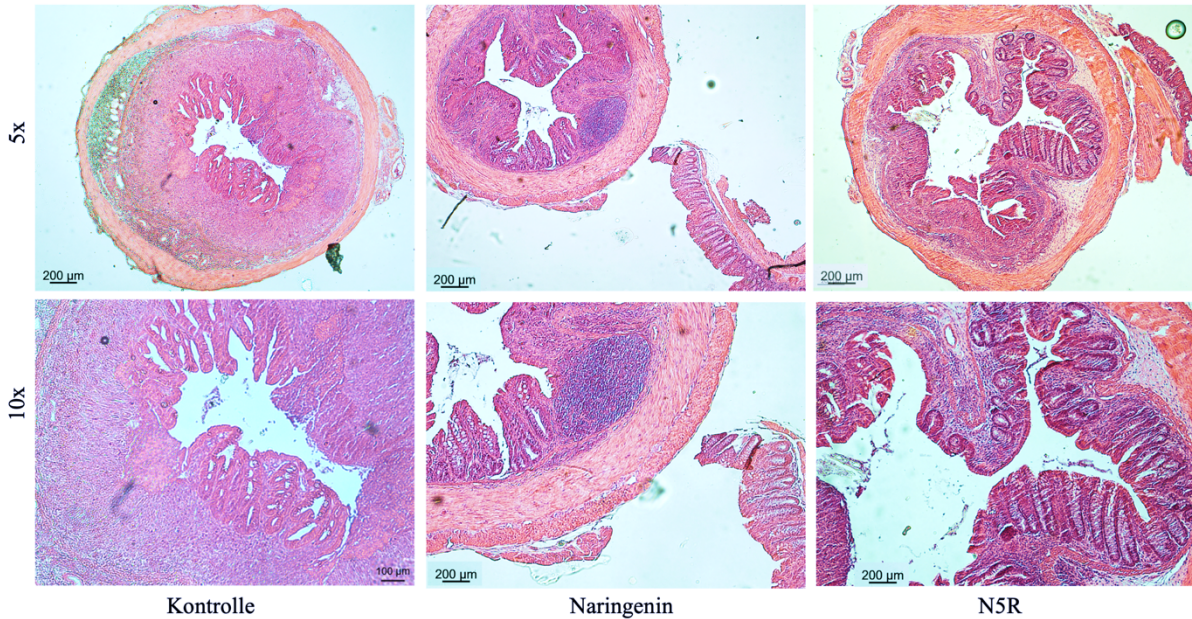


Abbildung 8: N5R und Naringenin sind protektiv im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) im Modell der akuten DSS-Kolitis (1,5 %) über einen Zeitraum von 24 Tagen im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg). **A)** Versuchsaufbau im Zeitstrahl; eine akute DSS-Kolitis wurde in zuvor mit einem kolitogenen Mikrobiom gavagierten Mäusen induziert. **B)** Körpergewichtsverlust; gemittelt prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Versuchsbeginn **C)** Endoskopischer Kolitis-Score; **D)** Repräsentative Koloskopie-Fotos; **E)** Kolonlänge; **F)** Histologischer Kolitis-Score; acht histologische Schnitte konnten wegen mangelnder Qualität nicht für das Scoring verwendet werden ($n_{\text{Kontrolle}} = 2$ und $n_{\text{N5R}} = 6$) **G)** Exemplarische HE-Übersicht bei fünffacher und zehnfacher Vergrößerung. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (Naringeningruppe nur ein Experiment; beim zweiten Experiment wurde aufgrund mangelnder Testgruppengröße nur Carboxymethylcellulose und N5R gavagiert und auf eine Testung der Positivkontrolle Naringenin verzichtet); $n_{\text{Kontrolle}} = 6$ (- 1; an Tag 8 verstorben), $n_{\text{N5R}} = 10$ (- 1; an Tag 14 verstorben) und $n_{\text{Naringenin}} = 5$ (- 2; eine Maus wurde an Tag 9 aufgrund einer Bissverletzung aus dem Versuch genommen, die zweite Maus verstarb an Tag 18). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA und mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für N5R bzw. Naringenin gegen die Kontrollgruppe (**B**, **C**) sowie Kruskal-Wallis-Rangsummentest (**E**, **F**); * $p < 0,05$.

Zusammenfassend wurde durch die Anwendung des DSS für 7 Tage eine Kolitis in den Mäusen ausgelöst, die klinisch bei Betrachtung des Gewichtsverlustes und der Endoskopie durch die Gabe von N5R in vergleichbarem Ausmaß wie Naringenin gelindert werden konnte. Dies gilt insbesondere für die Remission.

Als Nächstes stellte sich die Frage, warum N5R einen protektiven Einfluss auf den Verlauf der akuten DSS-Kolitis aufweist. Nach Literaturangaben zeigt das Vorläufermolekül Naringenin durch Einflussnahme auf Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems antientzündliche Eigenschaften (siehe Abschnitt 1.2.1.2). Die Hypothese lautete, dass N5R in ähnlicher Weise wirkt und dass der fehlende Effekt von N5R auf die T-Zellen *in vitro* möglicherweise *in vivo* nachgewiesen werden kann.

Zur Beantwortung dieser Hypothese sollten also mögliche zelluläre Veränderungen im angeborenen und adaptiven Immunsystem zum Höhepunkt des Krankheitsschubs analysiert werden, die eine Linderung der Krankheitsschwere durch N5R erklären könnten. Dazu wurden die Zellen der Tiere, entsprechend dem Vorversuch an Tag 9, an welchem die Tiere

den größten Gewichtsverlust zeigten, durchflusszytometrisch analysiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da im vorangegangenen Experiment an diesem Tag noch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden konnte. Er eignet sich somit dazu, Änderungen in der Immunzellkomposition zu analysieren, welche die anschließend abweichende Schwere der Kolitis im Verlauf der Remission erklären könnten.

Wie erwartet, zeigte die N5R-Gruppe an Tag 9 einen geringeren relativen Gewichtsverlust, der im Vergleich zur Kontrollgruppe in diesem Experiment signifikant war (**p = 0,0072). Überraschenderweise wies die Naringeningruppe in diesen Versuchen den größten relativen Gewichtsverlust von circa 15 % im Vergleich zum Ursprungsgewicht auf (siehe Abbildung 9A). Hinsichtlich des endoskopischen Kolitis-Scores, der Kolonlänge und der histopathologischen Auswertung HE-gefärbter Gewebeschnitte des Kolongewebes zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 9B-D).

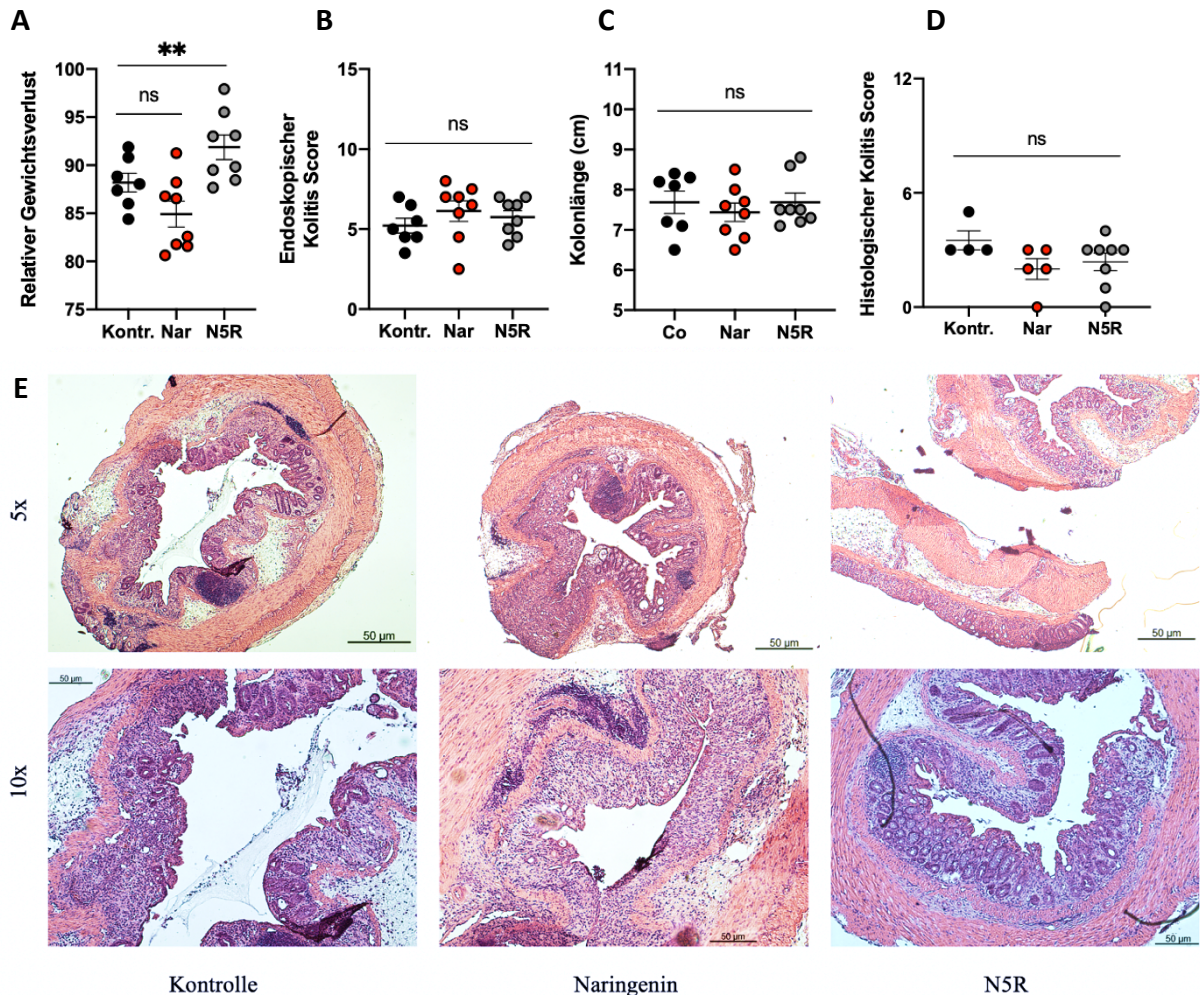


Abbildung 9: N5R zeigt eine niedrigere klinische Krankheitsaktivität an Tag 9 im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) im Modell der akuten DSS-Kolitis (1,5 %) an Tag 9 im Vergleich zur Kontrollgruppe und Naringenin (50 mg/kg). **A**) Körpergewichtsverlust; gemittelt prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Versuchsbeginn; **B**) Endoskopischer Kolitis-Score an Tag 8; **C**) Kolonlänge; **D**) Histologischer Kolitis-Score; sechs histologische Schnitte konnten wegen mangelnder Qualität nicht für das Scoring verwendet werden ($n_{\text{Kontrolle}} = 3$ und $n_{\text{Naringenin}} = 3$); **E**) exemplarische HE-Übersicht bei fünf- und zehnfacher Vergrößerung. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen

Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 7$, $n_{\text{N5R}} = 8$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest sowie bei (A) mittels Wilcoxon-Mann-Whitney für N5R gegenüber der Kontrolle; $**p < 0,01$.

Wie in Abbildung 10A dargestellt, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen in der durchflusszytometrischen Analyse der absoluten Zellzahlen der Leukozyten im Kolon und in den Mesenteriallymphknoten. Auch hinsichtlich der CD4^+ T-Zellen zeigten sich keine signifikanten Abweichungen zwischen der Kontroll- und der N5R-Gruppe im Kolon und den Mesenteriallymphknoten, aber eine Erhöhung der absoluten CD4^+ T-Zellzahl in der mit Naringenin behandelten Gruppe (siehe Abbildung 10B). Eine tieferliegende Analyse der CD4^+ T-Zellen erfolgte im nächsten Schritt.

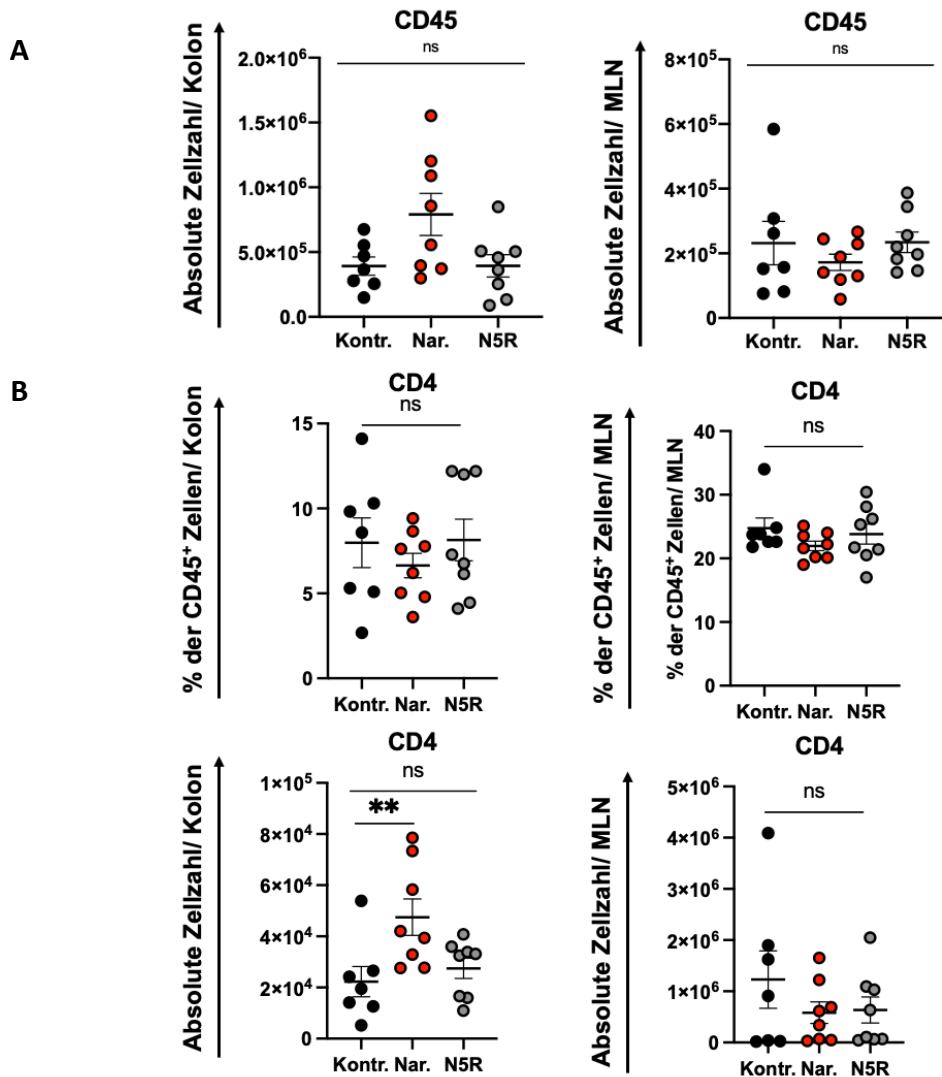


Abbildung 10: N5R hat keinen Einfluss auf Zellzahlen der Leukozyten und CD4^+ T-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) auf die CD45^+ und CD4^+ T-Zellen an Tag 9 im Modell der akuten DSS-Kolitis (1,5 %) im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg); durchflusszytometrische Charakterisierung der absoluten Zellzahlen der Leukozyten (CD45^+) und CD4^+ T-Zellen. **A)** Absolute Zellzahlen der CD45^+ Zellen im Kolon und den Mesenteriallymphknoten; **B)** Frequenzen und absolute Zellzahlen der CD4^+ T-Zellen im Kolon und den Mesenteriallymphknoten; Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 7$, $n_{\text{N5R}} = 8$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest und bei signifikantem Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; $**p < 0,01$.

Die Analyse der Subgruppen der CD4⁺T-Zellen im Kolon zeigte hingegen eine signifikante Erhöhung der Frequenz der Foxp3⁺Treg-Zellen (**p = 0,0036) bei den mit N5R gefütterten Mäusen (siehe Abbildung 11A) und eine Tendenz zur Zunahme in der absoluten Zellzahl der intestinalen Foxp3⁺Treg-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 11B). Dieser Anstieg war auf das Kolon beschränkt, in den Mesenteriallymphknoten wurden keine Unterschiede in der Frequenz und Anzahl von Foxp3⁺Treg-Zellen beobachtet. Die Naringeningruppe zeigte dabei keine signifikante Differenz zur Kontrollgruppe. Bezüglich der IFN- γ ⁺-TH1-Zellen und der IL-17A⁺-TH17-Zellen wurden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Kolongewebe und in den Mesenteriallymphknoten festgestellt.

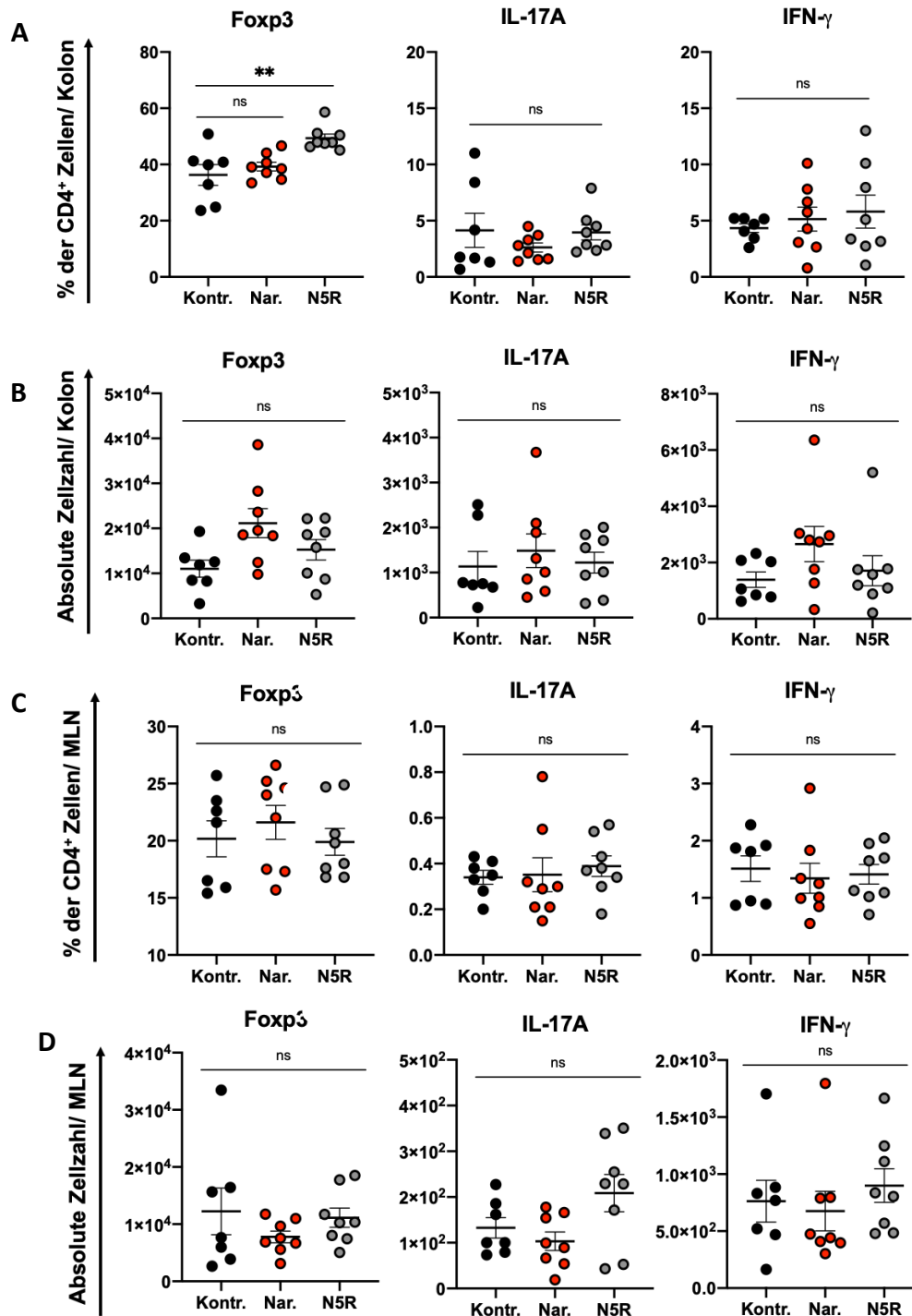


Abbildung 11: N5R erhöht die F_{oxp3}⁺ Treg-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis im Kolon.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) auf die Treg-, TH17- und TH1-Zellen an Tag 9 im Modell der akuten DSS-Kolitis (1,5 %) im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg); durchflusszytometrische Charakterisierung. **A)** Frequenzen der F_{oxp3}⁺, IL-17A⁺- und IFN- γ ⁺-Zellen im Kolon; **B)** Absolute Zellzahlen der F_{oxp3}⁺, IL-17A⁺ und IFN- γ ⁺-Zellen im Kolon; **C)** Frequenzen der F_{oxp3}⁺, IL-17A⁺- und IFN- γ ⁺-Zellen in den Mesenteriallymphknoten; **D)** Absolute Zellzahlen der F_{oxp3}⁺, IL-17A⁺- und IFN- γ ⁺-Zellen in den Mesenteriallymphknoten. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 7$, $n_{\text{N5R}} = 8$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest, sowie bei **A)** mittels Wilcoxon-Mann-Whitney für N5R gegenüber der Kontrolle; $**p < 0,01$.

In der Literatur wurde ein Effekt von Naringenin auf die Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.1.2), der im Folgenden in Bezug auf N5R untersucht werden sollte, da in diesem Zusammenhang auch ein indirekter Effekt von N5R über antigenpräsentierende Zellen auf die T-Zellen denkbar wäre. Interessanterweise bildete sich bei Betrachtung der relativen Zellzahlen des angeborenen Immunsystems eine signifikante Erhöhung der dendritischen Zellen (CD45⁺CD3⁻NK1.1⁻CD11c⁺) im Kolon der mit N5R behandelten Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe ($**p = 0,0014$) ab. Des Weiteren wurde eine signifikante Erhöhung an Monozyten und Makrophagen, sowohl des entzündlichen Phänotyps (CD45⁺CD3⁻Ly6g⁻CD11b⁺CD11c⁻Ly6c⁺) als auch des ansässigen eher antiinflammatorischen Phänotyps (CD45⁺CD3⁻Ly6g⁻CD11b⁺CD11c⁻Ly6c⁻), im Kolon der mit N5R gavagierten Mäuse beobachtet ($*p = 0,0488$ bzw. $*p = 0,0482$). Die Naringeningruppe hingegen zeigte keine signifikanten Abweichungen zur Kontrollgruppe. Unterschiede in der Infiltration von NK-Zellen (CD45⁺CD3⁻NK1.1⁺CD11c⁻) und neutrophilen Granulozyten (CD45⁺CD3⁻Ly6g⁺CD11b⁺) in das Kolon oder die Mesenteriallymphknoten wurden nicht detektiert. Dabei kommen neutrophile Granulozyten und Makrophagen physiologisch nicht oder nur in sehr geringer Konzentration in den Mesenteriallymphknoten vor und werden als Daten nicht gezeigt. Absolute Zellzahlen des angeborenen Immunsystems liegen leider nicht vor.

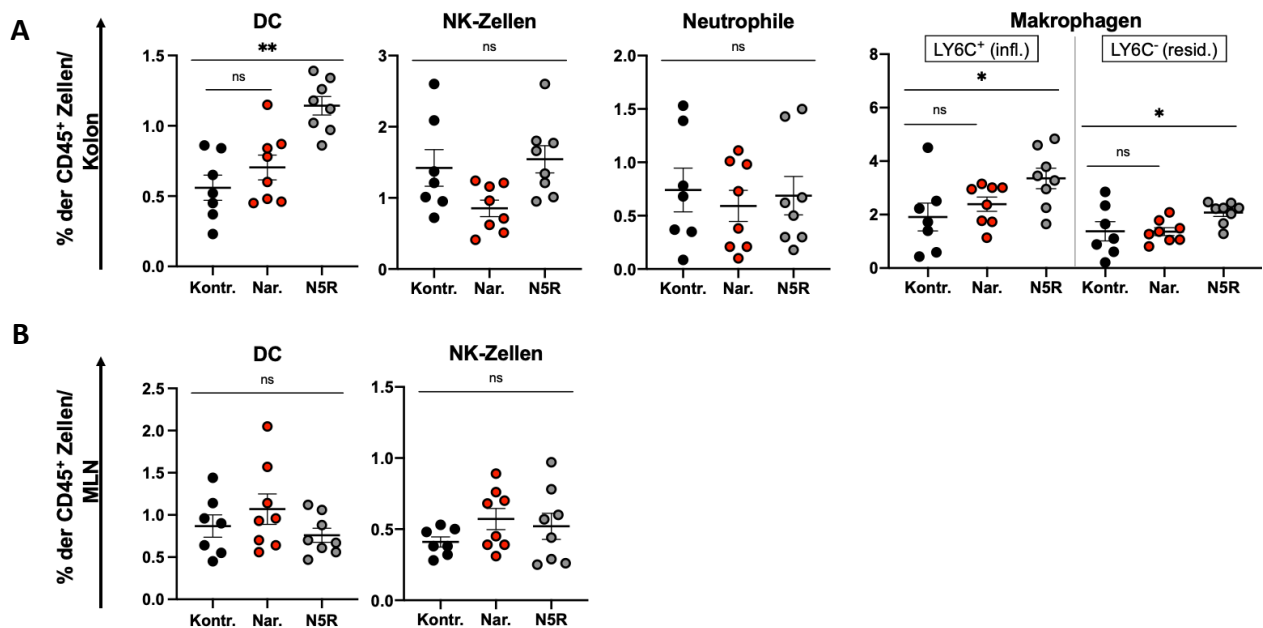


Abbildung 12: N5R erhöht die dendritischen Zellen sowie die inflammatorischen und residenten Monozyten/Makrophagen im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) auf die Zellen des angeborenen Immunsystems an Tag 9 im Modell der akuten DSS-Kolitis (1,5 %) im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg). **A)** Frequenzen der dendritischen Zellen (DC), NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen im Kolon; **B)** Frequenzen der DC, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen in den Mesenteriallymphknoten. Leider liegen keine absoluten Zellzahlen vor; jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 7$, $n_{\text{N5R}} = 8$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest sowie bei **A)** mittels Wilcoxon-Mann-Whitney für N5R gegenüber der Kontrolle; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass N5R *in vivo* die DSS-Kolitis mildert, begleitet von einer verstärkten Anreicherung von Treg-Zellen, dendritischen Zellen sowie Monozyten/Makrophagen im Kolon zum Höhepunkt des Krankheitsschubs. Diese Befunde korrespondieren mit den bekannten Effekten des Vorläufermoleküls Naringenin. Bemerkenswerterweise zeigt sich, dass N5R dabei offenbar wirkungsvoller ist als Naringenin. Im Gegensatz zur Behandlung mit N5R zeigte die Behandlung mit Naringenin keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lediglich wurde in der Naringeningruppe eine Erhöhung der absoluten CD4⁺ T-Zellen im Kolon im Rahmen der akuten DSS-Kolitis beobachtet.

3.2.3 Akute DSS-Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen

Die mildernde Wirkung von N5R im Verlauf der DSS-Kolitis könnte auf die Wechselwirkung sowohl mit den dendritischen Zellen und Monozyten und Makrophagen als auch mit Treg-Zellen zurückzuführen sein. Um den Mechanismus besser zu verstehen, sollte die isolierte Wirkung von N5R zunächst auf das angeborene Immunsystem betrachtet werden. Hierfür wurde das Modell der akuten DSS-Kolitis in lymphopenen *Rag1*^{-/-} Mäusen gewählt. *Rag1*^{-/-} Mäuse besitzen keine T- und B-Lymphozyten und ermöglichen daher die gesonderte Betrachtung des angeborenen Immunsystems *in vivo* ohne Einflussnahme des adaptiven Immunsystems. Die Durchführung der DSS-Kolitis erfolgte hierbei mit 2 % DSS, da die *Rag1*^{-/-} Mäuse in der Regel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger kolitogen auf das DSS reagieren [209]. Da sowohl die Klinik zum Zeitpunkt des Kolitis-Peaks bzw. der frühen Remissionsphase als auch die späte Remissionsphase berücksichtigt werden sollten, wurde das Experiment einmal an Tag 11 und einmal an Tag 21 beendet.

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, konnte die Kolitis in den *Rag1*^{-/-} Mäusen in allen drei Testgruppen erfolgreich induziert werden. Am 8. Tag zeigte sich dabei in allen Gruppen ein maximaler relativer Gewichtsverlust von etwa 20 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht. Auffällig war, dass die Kolitis in den *Rag1*^{-/-} Mäusen früher begann als in den Wildtyp-Mäusen. So war der Peak der Krankheit mit Tag 8 bereits früher erreicht und die Remissionsphase, beginnend ab Tag 9, setzte ebenfalls früher ein. Insgesamt war der Krankheitsschub durch das DSS in den *Rag1*^{-/-} Mäusen kürzer als in den Wildtyp-Mäusen.

Interessanterweise zeigte sich bei klinischer Betrachtung kein lindernder Effekt des Krankheitsverlaufs durch N5R oder Naringenin im Vergleich zur Kontrollgruppe weder im

Kolitis-Peak noch in der Remissionsphase, wie zuvor in Abschnitt 3.2.3 detektiert. Weder der relative Gewichtsverlust, der endoskopische Kolitis-Score noch die Kolonlänge wiesen in der frühen oder späten Remissionsphase signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (siehe Abbildung 13A-C).

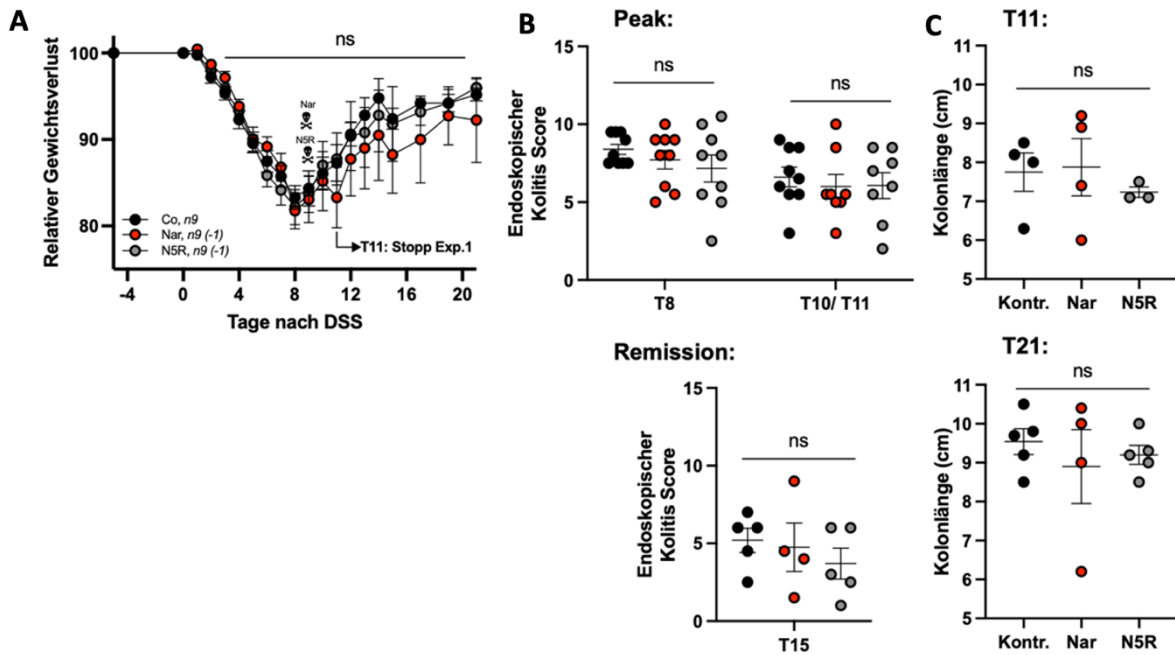


Abbildung 13: Kein Einfluss von N5R und Naringenin im Modell der akuten DSS-Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) im Modell der akuten DSS-Kolitis (2 %) in *Rag1*^{-/-} Mäusen über einen Zeitraum von 11 (Peak) bzw. 21 Tagen (Remission) im Vergleich zur Kontrollgruppe und Naringenin (50 mg/kg). **A**) Körpergewichtsverlust; gemittelt prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Versuchsbeginn; **B**) Endoskopischer Kolitis-Score an Tag 8, 10/11 (für Experiment 1 und 2) und 15 (für Experiment 2) **C**) Kolonlänge an Tag 11 und 21. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 9$ (- 1; an Tag 9 verstorben), $n_{\text{N5R}} = 9$ (- 1; an Tag 9 verstorben) und $n_{\text{Naringenin}} = 9$; die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA (**A**, **B**) und Kruskal-Wallis-Rangsummentest (**C**).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die Zellen des angeborenen Immunsystems allein möglicherweise nicht in der Lage sind den protektiven Effekt von N5R zu vermitteln. Vielmehr könnte die Bedeutung der T-Zellen, ob eigenständig oder in Wechselwirkung mit dendritischen Zellen und Monozyten/Makrophagen, im Vordergrund stehen. Daher wurde in diesem Versuch auf eine durchflusszytometrische Zellanalyse verzichtet und als nächster Schritt die Interaktion von N5R mit dem adaptiven Immunsystem näher untersucht.

3.2.4 T-Zell-Transfer-Kolitis

Im Modell der akuten DSS-Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen wurde festgestellt, dass der therapeutische Nutzen von N5R ausbleibt, sobald die Reaktion des adaptiven Immunsystems entfällt. Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass N5R seine schützende Wirkung hauptsächlich über das adaptive Immunsystem entfaltet. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Experimente und der aktuellen Studienlage zur Wirkungsweise von Naringenin wurde die Hypothese aufgestellt, dass N5R seine protektive Wirkung

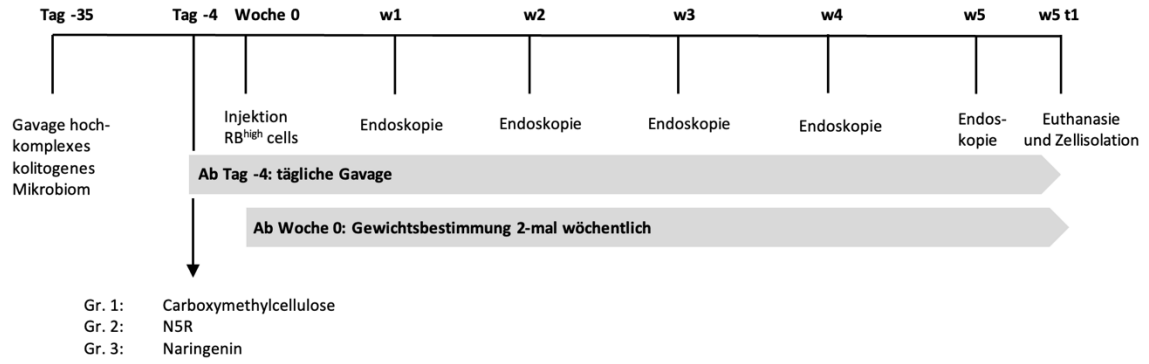
überwiegend über T-Zellen bewirkt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das T-Zell-Transfer-Kolitis-Modell herangezogen.

Die T-Zell-Transfer-Kolitis weist Ähnlichkeiten mit einer CED auf, weil sie ebenfalls durch ein autoimmunes Geschehen und ein Ungleichgewicht in der Verteilung der T-Zellen charakterisiert ist. Es wurden *Foxp3^{RFP}*, *Il17a^{eGFP}*, *Ifng^{Katushka}*-Reportermause als Donormäuse für den Transfer von CD4⁺Foxp3^{RFP}-CD45RB^{high} naiven T-Zellen in lymphopene *Rag1^{-/-}* Mäuse genutzt. Nach Transfer expandieren die CD4⁺Foxp3^{RFP}-CD45RB^{high} naiven T-Zellen in der *Rag1^{-/-}* Empfängermaus und differenzieren in die proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen. Dabei zeigen die transferierten Zellen keine Fähigkeit zur Entwicklung in antientzündliche Treg-Zellen, was die Induktion einer Pankolitis zur Folge hat. 4 Tage vor der Injektion der CD4⁺Foxp3^{RFP}-CD45RB^{high} naiven T-Zellen wurde mit der täglichen Gavage sowie ab der Injektion mit der zweiwöchentlichen Gewichtsbestimmung begonnen. Am Ende des Versuchs nach 5 Wochen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen (siehe Zeitstrahl in Abbildung 14A).

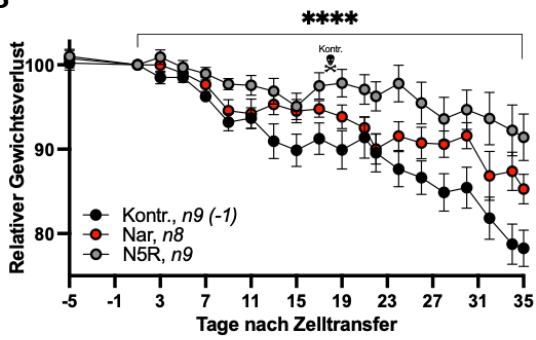
Wie in den Abbildungen 14B-G ersichtlich ist, entwickelte sich bei allen drei Gruppen eine Kolitis. Das Ausmaß der Darmentzündung wurde anhand der Kriterien Gewichtsverlust, endoskopischer Kolitis-Score, Kolonlänge und histologischer Kolitis-Score bewertet. Insgesamt wiesen die Mäuse, die mit N5R behandelt wurden, den mildesten Krankheitsverlauf auf. Dies spiegelte sich insbesondere in einem signifikant geringeren relativen Gewichtsverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe wider (****p < 0,0001). Auch die Mäuse in der Naringeningruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gewisse Linderung der Krankheitsaktivität in Bezug auf den relativen Gewichtsverlust, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei den mit N5R behandelten Mäusen. Bereits nach 3 Wochen waren erste Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar, wobei zu diesem Zeitpunkt nur der Einfluss von N5R im Vergleich zur Kontrollgruppe als protektiv erschien. Am Ende des fünfwöchigen Versuchs wies die N5R-Gruppe einen Gewichtsverlust von etwa 9 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht auf, während die Naringeningruppe etwa 15 % und die Kontrollgruppe etwa 21 % an Gewicht verloren hatten.

In Bezug auf den endoskopischen Kolitis-Score zeigten die mit N5R behandelten Mäuse ab Woche 4 eine signifikant niedrigere Entzündung des Darmgewebes. Auch die Naringeningruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Woche 3 eine niedrigere Entzündungsaktivität im endoskopischen Kolitis-Score. Interessanterweise spiegelte sich der signifikant niedrigere Endoskopie-Score der Naringeningruppe an Tag 21 nicht im Gewichtsverlust wider. Die Kolonlänge unterschied sich nur minimal zwischen den Gruppen, wobei tendenziell die Kola der Naringenin- und N5R-Gruppe etwas länger waren. Der histologische Kolitis-Score zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der N5R-Gruppe (*p = 0,0216) mit einer höheren Entzündungsaktivität der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 14E).

A



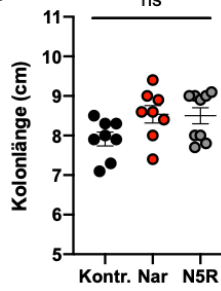
B



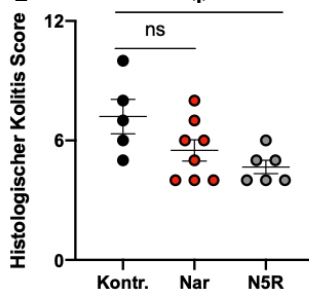
C



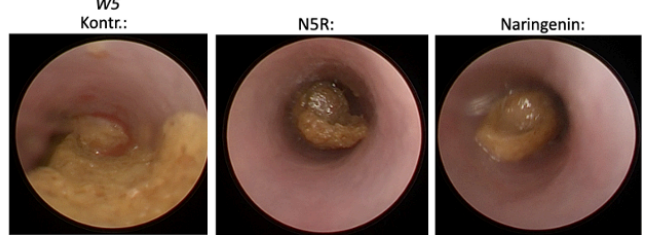
D



E



F



G

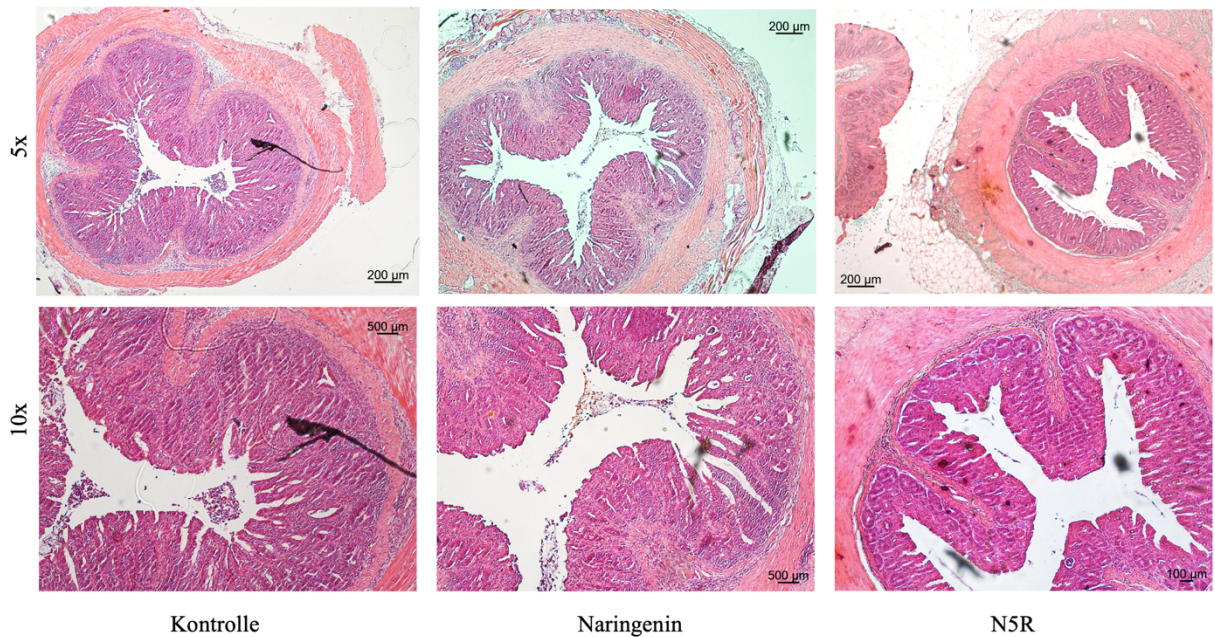


Abbildung 14: Niedrigere klinische Krankheitsaktivität durch N5R im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) im Modell der adaptiven T-Zell-Transfer-Kolitis über 5 Wochen im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg). **A**) Versuchsaufbau im Zeitstrahl; eine T-Zell-Transfer-Kolitis wurde in zuvor mit einem kolitogenen Mikrobiom gavagierten Mäusen induziert; **B**) Körpergewichtsverlust; gemittelt prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Versuchsbeginn; **C**) endoskopischer Kolitis-Score; **D**) Kolonlänge; **E**) Histologischer Kolitis-Score, sechs histologische Schnitte konnten wegen mangelnder Qualität nicht für das Scoring verwendet werden ($n_{\text{Kontrolle}} = 3$ und $n_{\text{N5R}} = 3$); **F**) Repräsentative Koloskopie-Fotos; **G**) Exemplarische HE-Übersicht bei fünffacher und zehnfacher Vergrößerung. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 9$ (- 1; an Tag 18 verstorben), $n_{\text{N5R}} = 9$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; statistischer Test; die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA (**B**, **C**) und Wilcoxon-Mann-Whitney für N5R bzw. Naringenin gegenüber der Kontrolle (**C**) sowie Kruskal-Wallis-Rangsummentest (**D**, **E**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zusammenfassend zeigten die mit N5R behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant milderen Verlauf der Transfer-Kolitis. Die Naringeningruppe wies ebenfalls eine gewisse Linderung auf, jedoch nicht so ausgeprägt wie die mit N5R gavagierten Mäuse. Dies deutet darauf hin, dass N5R einen krankheitslindernden Effekt vermittelt, der über eine Beeinflussung der T-Zellen erfolgt. Eine Untersuchung auf zellulärer Ebene erfolgte im nächsten Schritt.

Wie in Abbildung 15A dargestellt, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten (CD45^+) sowie den Frequenzen und absoluten Zellzahlen der CD4^+ T-Zellen im Kolon und den Mesenteriallymphknoten (siehe Abbildung 15B). Im Anschluss wurde eine detaillierte Analyse der CD4^+ T-Zellen durchgeführt.

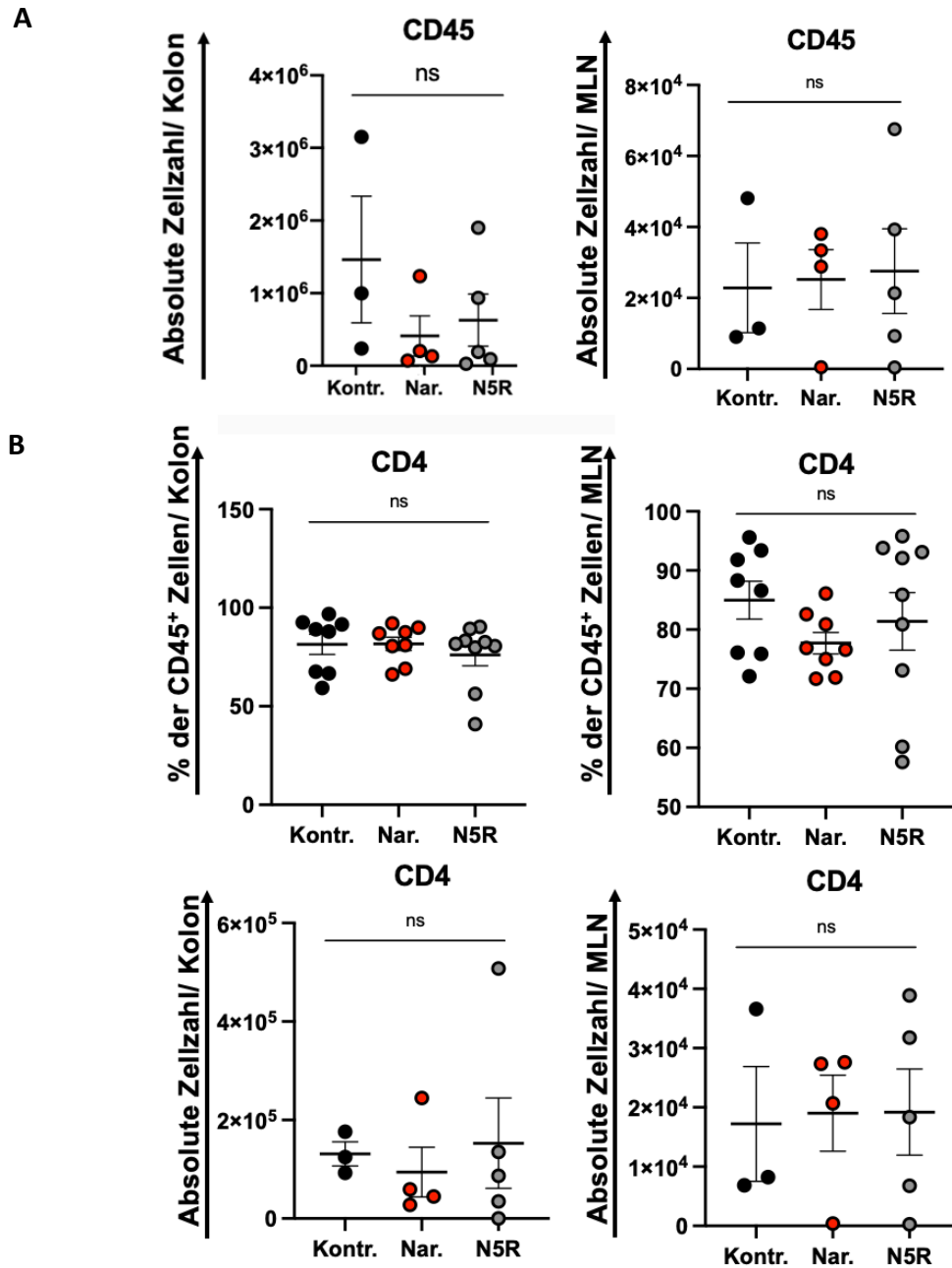


Abbildung 15: N5R hat keinen Einfluss auf die Zellzahlen der Leukozyten und CD4⁺ T-Zellen im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) auf die CD45⁺ und CD4⁺ Zellen im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg) nach 5 Wochen; durchflusszytometrische Charakterisierung der absoluten Zellzahlen der Leukozyten (CD45⁺) und CD4⁺ T-Zellen. **A)** Absolute Zellzahlen der CD45⁺ Zellen im Kolon und den Mesenteriallymphknoten; **B)** Frequenzen und absolute Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellen im Kolon und den Mesenteriallymphknoten. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; leider liegen für das zweite Experiment keine absoluten Zellzahlen vor; $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{N5R}} = 9$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest.

Die prozentualen Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellsubtypen wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Kolon und den Mesenteriallymphknoten zwischen den Gruppen auf, wobei lediglich eine leichte Tendenz zu einer Reduktion der IL-17A⁺ TH17-Zellen im Kolon der

mit N5R behandelten Mäuse zu beobachten war. Aufgrund eines technischen Fehlers im zweiten Experiment konnten leider keine Counting Beads zur Messung der absoluten Zellzahlen verwendet werden und es werden lediglich die absoluten Zellzahlen des ersten Experiments dargestellt. Hier zeigte sich eine nicht signifikante leichte Abnahme der IL-17A⁺ TH17-Zellen und der IFN- γ ⁺-TH1-Zellen bei der N5R- und Naringeningruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im Kolon. Es konnte keine Induktion von Treg-Zellen in das Kolon oder die Mesenteriallymphknoten bei den Gruppen beobachtet werden.

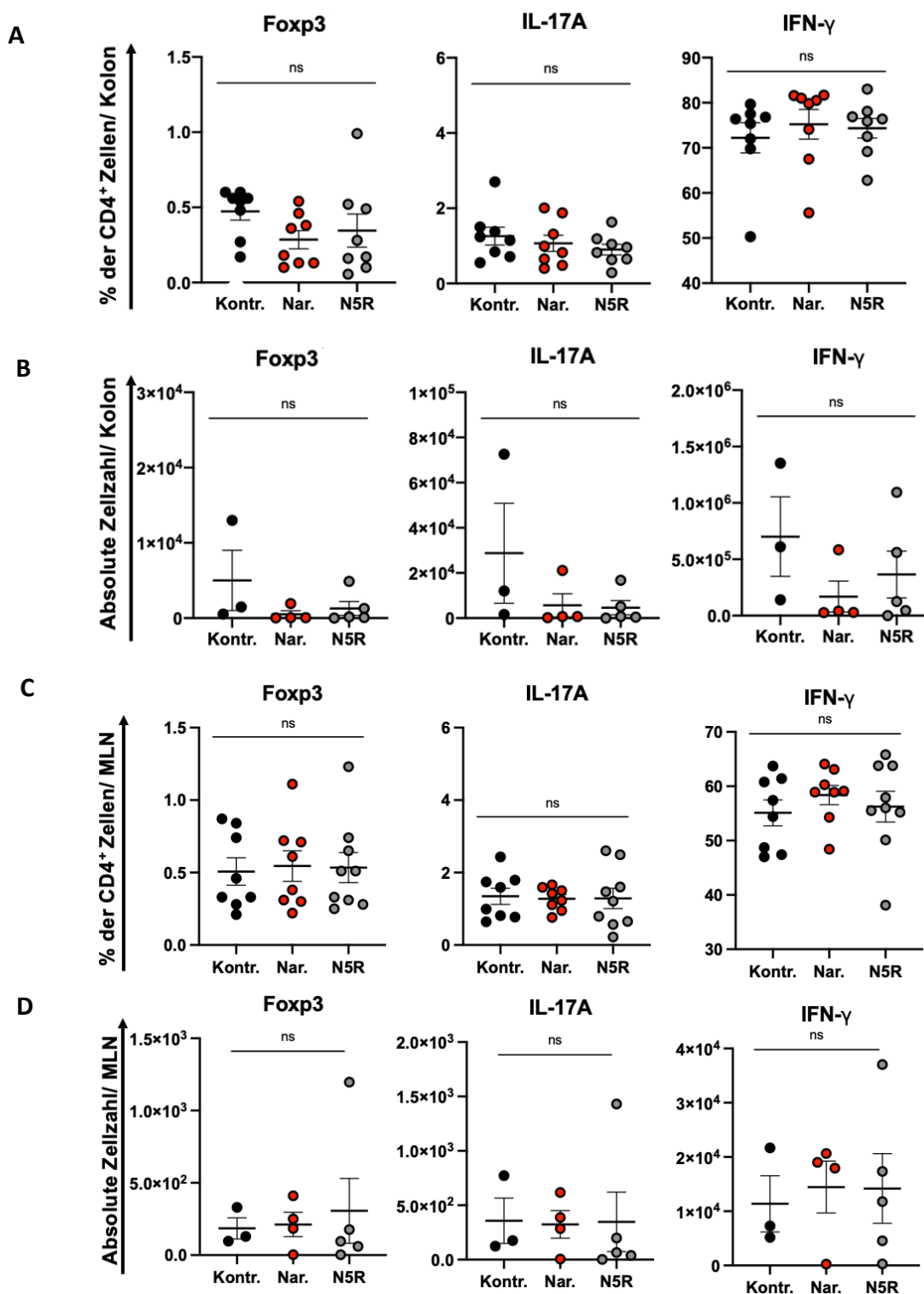


Abbildung 16: N5R zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Zellanalyse des adaptiven Immunsystems an Tag 35 im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) auf die Treg-, TH17- und TH1-Zellen im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg) nach 5 Wochen; durchflusszytometrische Charakterisierung. **A)** Frequenzen der F oxp3^+ , IL-17A $^-$ und IFN- γ^+ -Zellen im Kolon; **B)** Absolute Zellzahlen der F oxp3^+ , IL-17A $^-$ und IFN- γ^+ -Zellen im Kolon; **C)** Frequenzen der F oxp3^+ , IL-17A $^-$ und IFN- γ^+ -Zellen in den Mesenteriallymphknoten; **D)** Absolute Zellzahlen der F oxp3^+ , IL-17A $^-$ und IFN- γ^+ -Zellen in den Mesenteriallymphknoten. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; leider liegen für das zweite Experiment keine absoluten Zellzahlen vor; $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{N5R}} = 9 - 1$ (aufgrund eines technischen Fehlers bei der Färbung der CD4 $^+$ T-Zellen im zweiten Experiment konnte eine Probe der mit N5R behandelten Mäuse nicht verwendet werden) und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest.

Die Analyse der Zellen des angeborenen Immunsystems, zu finden in Abbildung 17, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen im Kolon und den Mesenteriallymphknoten. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen kommen physiologisch nicht oder nur in sehr geringer Konzentration in den Mesenteriallymphknoten vor und werden daher in der Darstellung nicht berücksichtigt. Es liegen leider keine absoluten Zellzahlen vor.

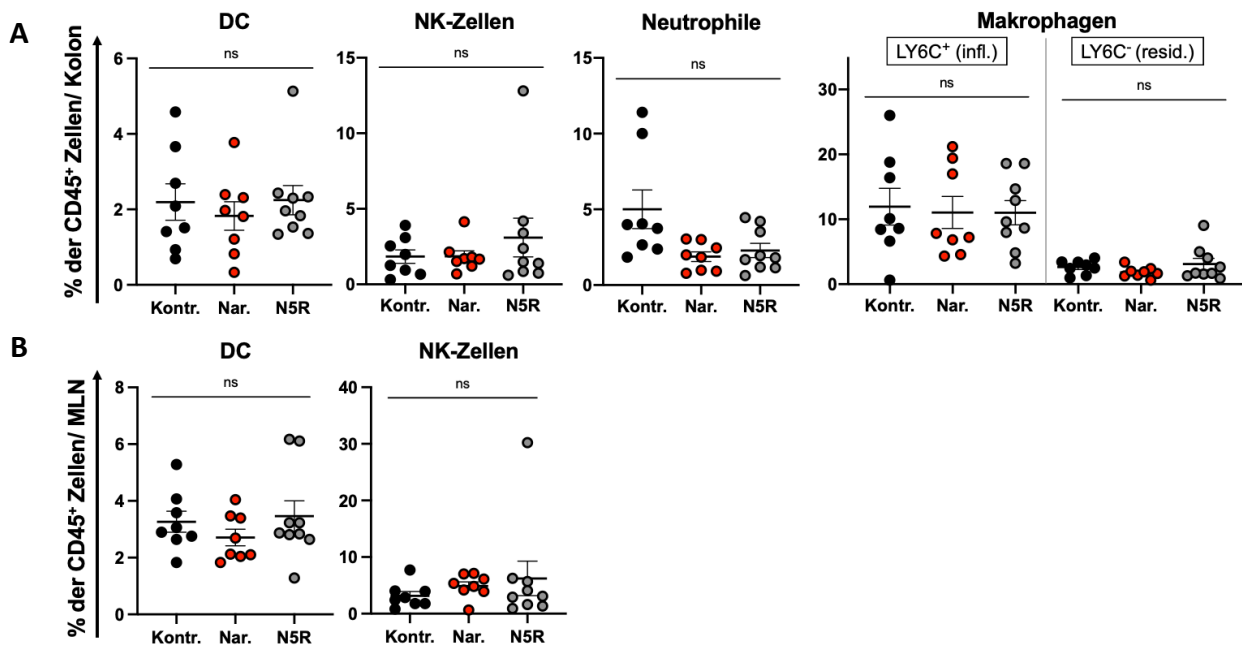


Abbildung 17: N5R zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Zellanalyse des angeborenen Immunsystems an Tag 35 im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) auf die Zellen des angeborenen Immunsystems nach 5 Wochen im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle und Naringenin (50 mg/kg); durchflusszytometrische Charakterisierung. **A)** Frequenzen der DC, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen im Kolon; **B)** Frequenzen der DC, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen in den Mesenteriallymphknoten; leider liegen keine absoluten Zellzahlen vor; jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten; $n_{\text{Kontrolle}} = 8$, $n_{\text{N5R}} = 9$ und $n_{\text{Naringenin}} = 8$; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Rangsummentest.

Zusammengefasst deutete sich klinisch an, dass T-Zellen vermutlich eine Rolle bei der Reduktion der Krankheitsschwere durch N5R spielen, obwohl keine Verminderung der T-Effektorzellen und keine Induktion von Treg-Zellen an Tag 35, weder durch N5R noch durch Naringenin, zu beobachten war.

3.2.5 Akute DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen

In der Zellanalyse am 9. Tag im Modell der akuten DSS-Kolitis konnte eine signifikante Zunahme der Foxp3⁺ Treg-Zellen durch die orale Verabreichung von N5R festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.2.4). Ebenso wurde in der *in vitro* Differenzierung von CD4⁺ Treg-, TH1- und TH17-Zellen in allen drei Zellkulturen eine Förderung der Foxp3⁺ Treg-Zell-Population unter dem Einfluss von Naringenin, dem Vorläufermolekül von N5R, beobachtet (siehe Abschnitt 3.1.1).

Im T-Zell-Transfer-Kolitis-Modell zeigte N5R und zu einem geringeren Ausmaß auch Naringenin hingegen eine Reduktion der Krankheitslast am ehesten über eine Beeinflussung der T-Effektorzellen. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Treg-Zellen möglicherweise einen additiven Effekt im Wirkmechanismus von N5R besitzen.

Um die spezifische Rolle der Treg-Zellen zu untersuchen, wurde das Modell der akuten DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen gewählt. In diesem Modell können die in den *Rag1*^{-/-} Mäusen rekonstituierten DEREK-Treg-Zellen durch DTX-Injektion spezifisch depletiert werden. Die Foxp3⁺ Treg-Zellen von transgenen DEREK-Mäusen exprimieren hierfür einen DTX-Rezeptor, über den die Depletion vermittelt wird, sowie eGFP zur durchflusszytometrischen Detektion [232]. Aufgrund der langen Versuchsdauer über mehrere Wochen wurde entschieden, die Rekonstitution der DEREK-Zellen in *Rag1*^{-/-} Mäusen durchzuführen, anstatt direkt auf DEREK-Mäuse zurückzugreifen. Eine längere Injektion von DEREK-Mäusen mit DTX birgt das Risiko, dass das murine Immunsystem Antikörper gegen das DTX bildet. Dies wiederum könnte zur Folge haben, dass die Foxp3⁺ Treg-Zellen möglicherweise nicht mehr vollständig ausgeschaltet werden könnten [204, 233]. Daher wurde für den Einsatz im Modell der akuten DSS-Kolitis eine alternative Methode gewählt, bei der CD4⁺ DEREK-T-Zellen in lymphopenen *Rag1*^{-/-} Mäusen rekonstituiert werden. *Rag1*^{-/-} Mäusen, die keine B-Lymphozyten besitzen, können keine Antikörper gegen das DTX bilden. Somit ist eine effektive Depletion der Foxp3⁺ Treg-Zellen in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen auch über einen längeren Zeitraum gewährleistet.

Zur Rekonstitution der CD4⁺ DEREK-T-Zellen wurden zunächst CD4⁺ T-Helferzellen aus Milz und Lymphknoten von DEREK-Mäusen isoliert. Nach dem Zelltransfer in die *Rag1*^{-/-} Mäuse wurden die DEREK-Zellen für etwa 4 Wochen etabliert. Zur Evaluierung des Rekonstitutionserfolgs der DEREK-Zellen wurde nach diesem Zeitraum die eGFP-Expression der Treg-Zellen im Blut der rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäuse überprüft.

Nach erfolgreicher Rekonstitution wurde eine akute DSS-Kolitis in den Mäusen wie zuvor beschrieben induziert. Vor Beginn des Experiments erhielten die Testgruppen neben der täglichen Gavage von N5R und Carboxymethylcellulose alle 3 Tage DTX-Injektionen zur gezielten Depletion der Foxp3⁺ Treg-Zellen. Den Kontrollgruppen wurde hingegen nur

reines PBS injiziert. Die tägliche Gewichtskontrolle begann mit der Verabreichung von DSS (siehe Zeitstrahl in Abbildung 15A). Da der Versuchsaufbau bei der Testung von N5R im Vergleich zu Carboxymethylcellulose bereits vier Testgruppen umfasste, wurde auf die Prüfung von Naringenin verzichtet. Zudem zeigten die vorherigen *in vivo* Experimente bereits, dass N5R eine vergleichbare oder sogar stärkere protektive Wirkung als Naringenin entfalten konnte. Daher wurde Naringenin nicht mehr als Positivkontrolle benötigt.

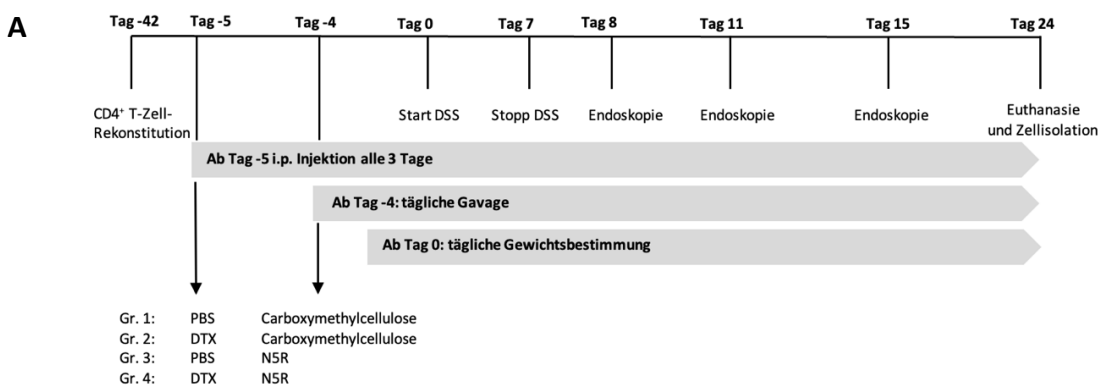
Alle Testgruppen entwickelten eine Kolitis. Auffällig war, dass die Tiere, bei denen die Treg-Zellen depletiert wurden, insgesamt kränker waren als die Tiere mit Treg-Zellen. Bei einem Vergleich der Gruppen mit und ohne N5R wurde deutlich, dass der schützende Effekt von N5R nur in Anwesenheit von Treg-Zellen sichtbar war.

In der N5R-Gruppe mit Treg-Zellen wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Carboxymethylcellulose ein geringerer Körpergewichtsverlust beobachtet. Die Tiere zeigten einen maximalen relativen Gewichtsverlust von 8 % und eine kürzere Krankheitsdauer mit einem schnelleren Einsetzen der Remission (siehe Abbildung 16B). Im endoskopischen Kolitis-Score zeigte sich in der Gruppe mit Treg-Zellen unter dem Einfluss von N5R eine Tendenz zur Protektion (siehe Abbildung 15C).

In den Versuchsgruppen, in denen die Treg-DEREG-Zellen durch DTX-Injektion depletiert wurden, zeigte sich insgesamt eine stärkere Krankheitsaktivität im Vergleich zu den Gruppen in Anwesenheit der Treg-Zellen. Hier war kein schützender Effekt von N5R zu beobachten. Die Carboxymethylcellulosegruppe ohne Treg-Zellen wies einen maximalen Gewichtsverlust von etwa 19 % auf, während die N5R-Gruppe ohne Treg-Zellen einen maximalen Gewichtsverlust von 23 % zeigte. Interessanterweise besaß die Kontrollgruppe ohne Treg-Zellen in der Endoskopie den geringsten endoskopischen Kolitis-Score. Hinsichtlich der Kolonlänge wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (siehe Abbildung 16D).

Leider traten im zweiten Experiment technische Probleme bei der Versuchsdurchführung auf, weshalb die Ergebnisse nicht verwendet werden konnten.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Experiment nur bei Gegenwart von Treg-Zellen in den Mäusen eine Linderung der Krankheitsaktivität durch N5R. Allerdings ist der alleinige erste Versuch statistisch nicht aussagekräftig und muss wiederholt werden, um weitere Erkenntnisse treffen zu können.



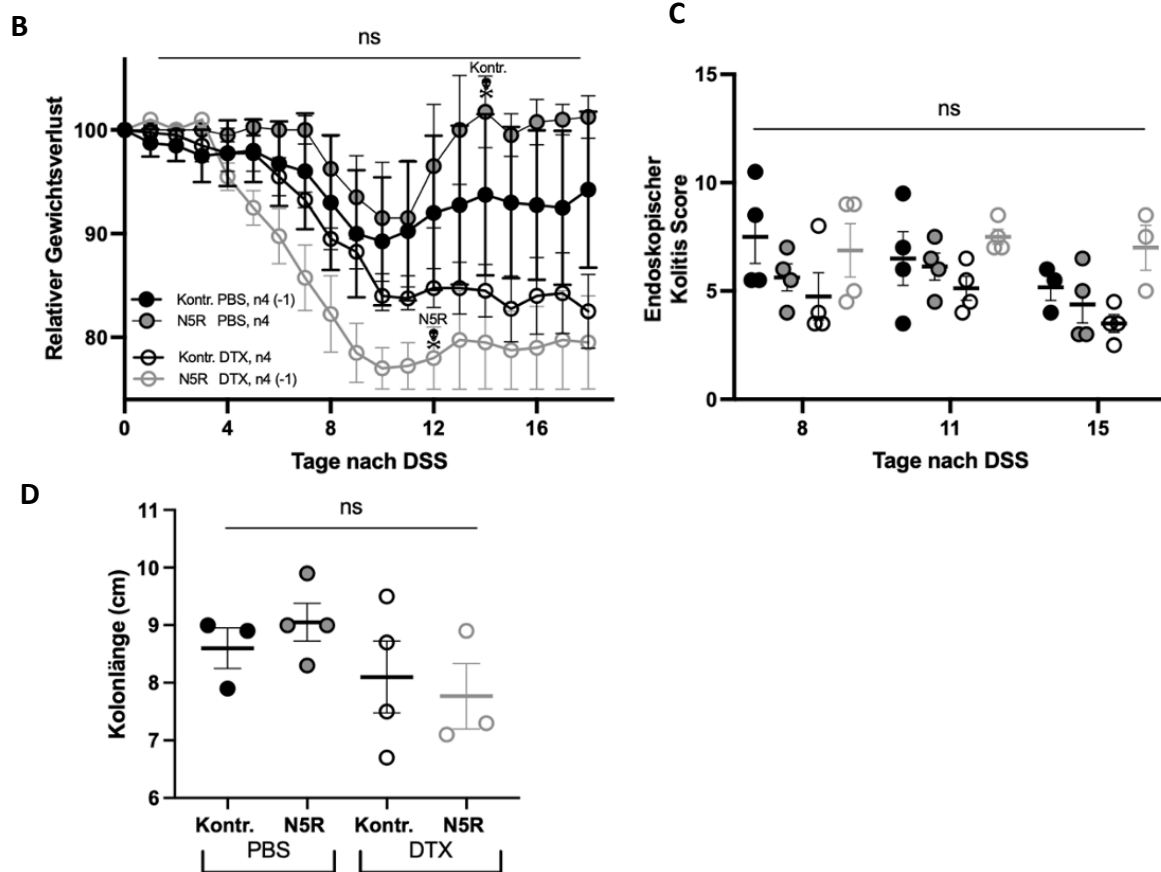


Abbildung 18: N5R ist im Modell der DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen nur in Anwesenheit von Treg-Zellen protektiv.

Der Einfluss von N5R (50 mg/kg) im Modell der DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Carboxymethylcellulose-Kontrolle über einen Zeitraum von 18 Tagen. **A**) Versuchsaufbau im Zeitstrahl; eine akute DSS-Kolitis wurde in mit DEREK-Zellen rekonstituierten *Rag1*^{-/-} Mäusen induziert. **B**) Körpergewichtsverlust; gemittelt prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Versuchsbeginn **C**) Endoskopischer Kolitis-Score; **D**) Kolonlänge. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Daten aus einem unabhängigen Experiment; $n_{\text{Kontrolle + PBS}} = 4$ (- 1; an Tag 14 verstorben), $n_{\text{N5R + PBS}} = 4$, $n_{\text{Kontrolle + DTX}} = 4$ und $n_{\text{N5R + DTX}} = 4$ (- 1; an Tag 13 verstorben); die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA (**B**, **C**) und Kruskal-Wallis-Rangsummentest (**D**).

4 Diskussion

Die Erforschung und Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von CED ist von großer Bedeutung. Dabei ist es wichtig, neben potenziellen Wechsel- und Nebenwirkungen auch die Angriffsorte neuer Medikamente zu berücksichtigen.

Ziel dieser Arbeit war es den Einsatz von N5R, einer neuartigen Flavonoid-Rhamnosid-Verbindung, bei experimentell induzierter Kolitis im Vergleich zu seinem Vorläufermolekül Naringenin zu untersuchen. Darüber hinaus sollten mögliche zugrunde liegende Wirkmechanismen von N5R identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen, in Zukunft neue Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit CED zu entwickeln.

4.1 N5R hat, im Gegensatz zu Naringenin, keinen Einfluss auf die Differenzierung von T-Helfer-Zellen *in vitro*.

Bei der Untersuchung des Einflusses von N5R und Naringenin auf die Differenzierung von CD4⁺ TH1-, TH17- und Treg-Zellen *in vitro* wurde festgestellt, dass N5R keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen hat. Nur Naringenin bewirkte eine Veränderung im Differenzierungsverhalten der Zellen. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich, dass Naringenin die eher proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen in ihrer Differenzierung inhibierte und die antientzündlichen Treg-Zellen förderte [149, 161, 162].

Unter Berücksichtigung der Literatur zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung anderer Flavonoid-Zucker-Verbindungen ist anzunehmen, dass N5R *in vivo* durch die intestinale Mikrobiota in die aktive Form Naringenin umgewandelt wird. Infolgedessen kommt es unter statischen *in vitro* Bedingungen, in denen die erforderlichen, zur Hydrolyse befähigten Darmbakterien fehlen, wahrscheinlich nicht zur notwendigen Spaltung und Aktivierung von N5R. Die Funktion als Prodrug könnte daher die mangelnde Wirksamkeit von N5R im Vergleich zu Naringenin in den durchgeführten *in vitro* Differenzierungen erklären. Ein analoges Verhalten wurde bei dem Aglykon Quercetin und seinem Rhamnosid Quercitrin/3-Rhamnosylquercetin beobachtet. Dabei zeigte sich, dass das Rhamnosid Quercitrin/3-Rhamnosylquercetin *in vitro* keine Wirkung entfaltete, aber vielversprechende Resultate bei experimentell induzierter Kolitis in Ratten zeigte. Im Gegensatz dazu war sein Aglykon Quercetin *in vitro* wirksam, zeigte jedoch *in vivo* im Vergleich eine schwächere Wirkung in unterschiedlichen Kolitis-Modellen. [222, 234, 235].

Comalada *et al.* untersuchten in einer Studie die beschriebene Diskrepanz bezüglich der Wirkungsentfaltung zwischen dem Aglykon und seinem Rhamnosid in *in vivo* und *in vitro* Versuchen. Im Rahmen einer fäkalen Fermentation zeigten sie, dass das Rhamnosid Quercitrin/3-Rhamnosylquercetin durch Inkubation mit frischen Stuhlproben von Ratten in die aktive Form, das Aglykon Quercetin, umgewandelt werden kann. Die Forschergruppe simulierte somit eine *in vitro* Hydrolyse der Rhamnosid-Bindung durch im Kolon ansässige

Bakterien, die in den Stuhlproben enthalten waren. Sie kamen zu dem Schluss, dass Quercitrin/3-Rhamnosylquercetin als Propharmakon fungiert und durch die zusätzliche Rhamnosid-Bindung einen sicheren Transport und die Freisetzung seiner aktiven Form, Quercetin, in das Darmlumen ermöglicht [222]. Es ist davon auszugehen, dass die meisten Glykosid-Flavonoid-Verbindungen aufgrund ihrer zusätzlichen Zucker-Bindung während der Passage durch den Magen-Darm-Trakt, im Gegensatz zu ihrer aglykosidischen Form, resistent gegen die Hydrolyse durch die Magensäure sind. Daher erreichen sie im intakten Zustand das Duodenum, ihre Aglykone hingegen nicht. Erst im Darm erfolgt vermutlich die Spaltung in die aktive Form durch die Rhamnosidasen der intestinalen Kommensalen. Im Kontrast dazu werden die Aglykone oder ihre Abbauprodukte wahrscheinlich bereits im Dünndarm resorbiert und erreichen somit selten den Dickdarm [140].

Für N5R ist ein ähnliches Verhalten anzunehmen. Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass Naringenin, als das Vorläufermolekül, die pharmakologisch aktive Form von N5R repräsentiert. Das Prodrug N5R kann wahrscheinlich erst durch die Spaltung durch die intestinale Mikrobiota pharmakologisch aktiv werden und zeigte daher keinen Einfluss auf die Differenzierung von CD4⁺ TH1-, TH17- und Treg-T-Helfer-Zellen *in vitro*.

4.2 N5R ist im Modell der akuten DSS-Kolitis protektiv.

Im Rahmen der akuten DSS-Kolitis zeigte sich, dass die Verabreichung von N5R die Krankheitsaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe wirksam reduzierte. Diese Ergebnisse stützen die in Abschnitt 4.1 aufgestellte Hypothese, dass N5R als Prodrug fungiert und erst *in vivo* durch die Hydrolyse durch die intestinale Mikrobiota aktiviert wird.

Hinsichtlich des relativen Gewichtsverlustes erholten sich die N5R- und die Naringeningruppe als Positivkontrolle schneller vom akuten Schub der Kolitis als die Kontrollgruppe. In der Remissionsphase verlief der relative Gewichtsverlust in den Flavonoidgruppen ähnlich. Die N5R-Gruppe wies dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant niedrigeren endoskopischen Kolitis-Score am Peak der Kolitis auf. Die Vermutung, dass N5R aufgrund des zusätzlichen Rhamnosids in der Molekülverbindung insgesamt stabiler im Verlauf des Magen-Darm-Trakts ist und aufgrund seiner erhöhten Hydrophilie eine verbesserte Bioverfügbarkeit mit effektiveren Therapieergebnissen im Vergleich zu Naringenin zeigen würde, konnte jedoch zunächst nicht eindeutig bestätigt werden.

Es muss jedoch beachtet werden, dass im zweiten Versuch des *in vivo* Experiments der akuten DSS-Kolitis aufgrund einer unzureichenden Testgruppengröße auf die Testung von Naringenin als Positivkontrolle verzichtet wurde. Daher sind die Ergebnisse in Bezug auf den Vergleich von Naringenin und N5R nicht ausreichend aussagekräftig. Der Fokus lag in diesen ersten *in vivo* Experimenten primär darauf, zu überprüfen, ob N5R generell *in vivo* wirksam war. In den darauffolgenden Experimenten wurde der Vergleich zwischen Naringenin und N5R hinsichtlich ihrer therapeutischen Anwendbarkeit durchgeführt.

Dennoch war bereits in der Planung und Vorbereitung der Experimente eine erleichterte Aufbereitung von N5R durch dessen erhöhte Wasserlöslichkeit erkennbar. Im klinischen Kontext könnten sich durch die vereinfachte Anwendung von N5R im Vergleich zu Naringenin Vorteile ergeben. Die Applikation von Naringenin erfordert spezifische Lösungsmittel. Im Gegensatz dazu kann N5R in einem Glas Wasser aufgelöst werden und durch eine unkomplizierte Handhabung die Adhärenz des Patienten fördern, die therapeutische Maßnahme regelmäßig durchzuführen.

In den Versuchen dieser Arbeit wurden Naringenin und N5R unter Zugabe des lipophilen Lösungsmittels Carboxymethylcellulose, als gängiges Trägermedium für Flavonoide, verabreicht. Dabei wurde N5R zunächst in Wasser gelöst, da es als hydrophiles Molekül in Carboxymethylcellulose nicht gut lösbar ist. Die Entscheidung, N5R nicht ausschließlich in Wasser zu lösen, wurde getroffen, um vergleichbare Grundbedingungen zur Kontroll- und Naringeningruppe herzustellen. Es ist anzunehmen, dass diese Aufbereitung von N5R möglicherweise nicht die optimalen Voraussetzungen für die Wirkungsentfaltung von N5R als hydrophiles Molekül darstellt. Dennoch war die Einheitlichkeit der Versuchsbedingungen in den Testgruppen, auch in den darauffolgenden Experimenten, von größter Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird eine allgemein empfohlene aktive Dosis für Aglykone im Bereich von 10 mg/kg bis 200 mg/kg und für Glykoside im Bereich von 10 mg/kg bis 25 mg/kg angegeben [236]. Für die *in vivo* Experimente wurde eine einheitliche Konzentration von Naringenin und N5R von 50 mg/kg festgelegt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Diese Konzentration basiert auf vorhandener Literatur zu *in vivo* Experimenten mit Naringenin [143, 144].

In den anschließenden Experimenten wurde, im Sinne der oben beschriebenen Vergleichbarkeit, die Applikationsweise von N5R und Naringenin beibehalten. Möglicherweise könnte durch eine modifizierte Applikation und Anpassung der Dosis von N5R eine Steigerung seiner protektiven Wirkung erreicht werden. Es sollte in Zukunft weiter erforscht werden, welche Aufbereitungsform von N5R optimale therapeutische Ergebnisse erzielt. Eine Titration könnte beispielsweise Aufschlüsse über eine möglicherweise bessere Bioverfügbarkeit von N5R im Vergleich zu Naringenin geben.

Interessanterweise zeigten sich aber auch bei einer einheitlichen Konzentration von 50 mg/kg in den anschließenden Untersuchungen bei der Analyse der akuten DSS-Kolitis an Tag 9 und der T-Zell-Transfer-Kolitis bessere Ergebnisse bei der Gabe von N5R im Vergleich zu Naringenin. Eine mögliche Erklärung könnte eine höhere Stabilität und längere Haltbarkeit von N5R durch die zusätzliche Rhamnosid-Verbindung sein. Dies kann darauf hindeuten, dass N5R im Vergleich zu Naringenin gewisse Vorteile in der Anwendung aufweist und bei Lagerung, Zubereitung und Applikation beständiger ist.

4.3 N5R erhöht dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen im Modell der akuten DSS-Kolitis.

N5R, das mutmaßliche Prodrug von Naringenin, stimulierte am 9. Tag der DSS-Kolitis dendritischen Zellen sowie Monozyten und Makrophagen des angeborenen Immunsystems im Kolon. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Erkenntnissen über die Wirkung seines Vorläufermoleküls. So wird in der Literatur beschrieben, dass Naringenin die Aktivierung von dendritischen Zellen reduziert und die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen in einen antientzündlichen Phänotyp fördert [147, 154, 155, 158, 159]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte jedoch keine Beeinflussung der Zellen des angeborenen Immunsystems durch Naringenin festgestellt werden.

Die Behandlung mit N5R hingegen führte zu einer signifikanten Zunahme der dendritischen Zellen im Kolon der Mäuse, während in den Mesenteriallymphknoten eine nicht signifikante Abnahme dieser Zellen zu verzeichnen war. N5R scheint somit zu diesem Zeitpunkt im Kolon, nicht jedoch in den Mesenteriallymphknoten, zu wirken. Es ist denkbar, dass die dendritischen Zellen im Kolon durch N5R weniger aktiviert sind und weniger in die Mesenteriallymphknoten migrieren. N5R könnte die Entzündungsreaktion im Rahmen einer DSS-Kolitis reduzieren und im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Aktivierung dendritischer Zellen durch Pathogene bewirken, welche durch eine weniger entzündete Darmschleimhaut vermindert eindringen können. Es ist denkbar, dass bei mit N5R gefütterten Mäusen im Vergleich zur Kontroll- und Naringeningruppe eine höhere Anzahl an ruhenden dendritischen Zellen im Kolon vorhanden ist. Es wäre also interessant, die dendritischen Zellen in diesem Kontext näher zu untersuchen.

Der beobachtete Einfluss von N5R auf dendritische Zellen könnte darüber hinaus entscheidend für die Modulation von T-Zellen sein. Die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen sind unerlässlich für die Aktivierung von T-Lymphozyten. Infolge der möglicherweise verringerten Aktivierung dendritischer Zellen durch N5R könnte es zu einem verminderten Priming zirkulierender T-Zellen kommen. Dies ist vereinbar mit den in der Literatur beschriebenen Auswirkungen von Naringenin auf T-Zellen beziehungsweise auf das Priming von dendritischen Zellen gegenüber T-Zellen [158]. Es besteht also die Möglichkeit, dass der Effekt N5Rs beziehungsweise Naringenins auf die T-Zellen weniger ausgeprägt ist, sobald die Wirkung auf die dendritischen Zellen entfällt. Allerdings deuten die *in vitro* Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 an, dass N5R oder seine aktive Form Naringenin direkt auf T-Zellen wirkt - möglicherweise durch Interaktion mit STAT-Proteinen oder über den AhR [149, 161, 164, 169]. Parallel zu diesem zellspezifischen Effekt wäre ebenfalls eine zusätzliche Orchestrierung der T-Zellen durch die antigenpräsentierenden Zellen, wie oben beschrieben, möglich.

Im Kolongewebe der mit N5R behandelten Mäuse zeigte sich zudem eine signifikante prozentuale Zunahme von Monozyten und Makrophagen, sowohl des residenten als auch des inflammatorischen Subtyps, im Vergleich zur Kontroll- und Naringeningruppe. Warum

N5R diese beiden Zellpopulationen im Kolongewebe erhöht waren, ist unklar. Eine mögliche Erklärung könnte in einer lokalisierten und reduzierten systemischen Entzündungsreaktion durch N5R liegen. Dies könnte dazu führen, dass weniger Monozyten/Makrophagen auswandern, um weitere Immunzellen durch die Freisetzung von Botenstoffen und Antigenpräsentation zu rekrutieren und somit hauptsächlich im Kolon aufzufinden sind. Im Rahmen einer lokal begrenzten Immunantwort auf das DSS könnten die Monozyten und Makrophagen, sowohl resident als auch inflammatorisch, also im Kolon verweilen. Makrophagen sind zudem in geringerem Maße an der Antigenpräsentation beteiligt und spielen durch die Freisetzung von Zytokinen eine bedeutende Rolle bei der Polarisierung reaktiver T-Zellen zu TH1-Zellen [237-239]. Daher ist es denkbar, dass sie, wie zuvor in Bezug auf die dendritischen Zellen beschrieben, gegebenenfalls eine Rolle in der beeinflussenden Wirkung von N5R auf T-Zellen spielen.

Die durchgeführte durchflusszytometrische Charakterisierung der dendritischen Zellen sowie der Monozyten und Makrophagen erfolgte oberflächlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst eine allgemeine Analyse erfolgen, um den Einfluss N5Rs auf das angeborene und adaptive Immunsystem zu vergleichen. Eine detailliertere Aufschlüsselung der Zelltypen ist vonnöten, um präzisere Aussagen über die Interaktionen von N5R mit den jeweiligen Zellen treffen zu können, sei es hinsichtlich aktivierter oder ruhender dendritischer Zellen oder des M1- bzw. M2-Phänotyps der Makrophagen.

4.4 Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind nicht verantwortlich für den beobachteten protektiven Einfluss von N5R im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Die Beobachtung, dass N5R im Rahmen einer akuten DSS-Kolitis einen Einfluss auf die Akkumulation von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen hat, führte zu der Frage, ob N5R über diese Zellen einen protektiven Einfluss entfaltet. Zur Analyse des Einflusses des angeborenen Immunsystems im Wirkmechanismus von N5R wurde das Modell der akuten DSS-Kolitis in lymphopenen *Rag1*^{-/-} Mäusen gewählt. *Rag1*^{-/-} Mäuse besitzen keine T- und B-Lymphozyten und ermöglichen daher die gesonderte Betrachtung des angeborenen Immunsystems *in vivo* ohne Einflussnahme des adaptiven Immunsystems.

In Abschnitt 3.2.2 konnte nachgewiesen werden, dass N5R nicht nur Einfluss auf dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen nimmt, sondern auch die Foxp3⁺-Treg-Zellen erhöht, welche dem adaptiven Immunsystem zuzuordnen sind. Daher sollte im Modell der akuten DSS-Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen untersucht werden, wie bedeutsam die Wechselwirkung zwischen beiden Seiten im Wirkmechanismus von N5R ist. Das angeborene Immunsystem zeigt eine enge Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem. Dendritische Zellen spielen dabei eine Schlüsselrolle bei der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen. Makrophagen tragen in geringerem Maße zur Antigenpräsentation bei und sind in Bezug auf die Phagozytose von Pathogenen sowie der Polarisierung reaktiver T-Zellen zu TH1-Zellen von Bedeutung [237-239]. Es ist möglich, dass N5R eine multifaktorielle Wirkung auf die beschriebenen Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems ausübt. Ebenso könnte eine isolierte, zellspezifische Wirkung N5Rs

vorliegen, die lediglich in der Konsequenz Auswirkungen auf miteinander in Kontakt stehenden Zellen hat. Durch genetische Modifikation und Ausschaltung des *Rag1* Gens weisen *Rag1*^{-/-} Mäuse keine Zellen des adaptiven Immunsystems, also keine reifen T- und B-Lymphozyten, auf. Der Einsatz dieser Knock-Out-Mäuse eignet sich besonders gut, um bei einer Fragestellung zwischen der Bedeutung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems zu differenzieren.

Im Rahmen der akuten DSS-Kolitis konnte unter der Verwendung von *Rag1*^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass die Wirkung von N5R und Naringenin auf das angeborene Immunsystem allein nicht ausreichend für einen krankheitslindernden Effekt ist, wenn die Antwort des adaptiven Immunsystems entfällt. In der akuten DSS-Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen war die protektive Wirkung von N5R aufgehoben. Sowohl die N5R- als auch die Naringeningruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ähnliche Klinik hinsichtlich der Parameter relativer Gewichtsverlust, endoskopischer Kolitis-Score und Kolonlänge. Da also beim Einsatz von lymphopenen *Rag1*^{-/-} Mäusen der protektive Effekt von N5R aufgehoben war, der zuvor in Wildtyp-Mäusen registriert wurde, ist anzunehmen, dass das angeborene Immunsystem im Wirkmechanismus von N5R eine eher untergeordnete Rolle spielt bzw. nur einen additiven Effekt durch eine Interaktion der antigenpräsentierenden Zellen mit den T-Zellen aufweist. Die Veränderungen in den Frequenzen der dendritischen Zellen sowie Monozyten und Makrophagen, die an Tag 9 im Modell der akuten DSS-Kolitis in mit N5R gavagierten Wildtyp-Mäusen registriert wurden, sind also wahrscheinlich nicht allein ursächlich für die Linderung der Krankheitslast. Die auf zellulärer Ebene festgestellten Veränderungen im angeborenen Immunsystem könnten entweder auf direkte Wechselwirkungen mit N5R zurückzuführen sein oder sich aus einem insgesamt entzündungshemmenden Milieu durch N5R ergeben, ohne jedoch allein ohne Beteiligung von T- und B-Zellen einen signifikanten Einfluss auf die klinischen Parameter auszuüben.

In Anbetracht der vorangegangenen Ergebnisse bestätigte sich daher die Vermutung, dass T-Zellen eine Schlüsselrolle im Mechanismus von N5R einnehmen. Dies ist in Einklang mit den *in vitro* T-Zell-Differenzierungen aus Abschnitt 3.1. Hierbei zeigte Naringenin, die aktive Form des Prodrug N5R, einen direkten Einfluss auf die Differenzierung der T-Zellen, ohne dass andere antigenpräsentierende Zellen in der *in vitro* Kultur anwesend waren. Es ist daher denkbar, dass N5R seine Wirkung vor allem über T-Zellen und vermutlich besonders über TH1-, TH17- und Treg-Zellen entfaltet.

4.5 N5R beeinflusst T-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis.

Bei der Analyse der CD4⁺ T-Zellen am 9. Tag der akuten DSS-Kolitis zeigte sich eine signifikante Zunahme der Frequenz der Foxp3⁺ Treg-Zellen im Kolon bei den mit N5R behandelten Mäusen sowie eine Tendenz zur Erhöhung der absoluten Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies steht im Einklang mit den *in vitro* T-Zell-Differenzierungen aus Abschnitt 3.1. Dabei zeigte Naringenin, das Vorläufermolekül N5Rs, einen fördernden Einfluss auf die Treg-Zell-Population.

Diese Ergebnisse stützen die bereits oben dargelegte Annahme, dass N5R als Prodrug fungiert und im Kolon durch die intestinale Mikrobiota zu Naringenin hydrolysiert wird. Dort kann das aus N5R freigesetzte Naringenin vermutlich den beschriebenen Effekt auf die Treg-Zellen entfalten. Im Gegensatz zur Behandlung mit N5R bewirkte die Behandlung mit Naringenin in den durchgeführten Experimenten keine signifikanten Unterschiede im T-Zell-Profil. Dies könnte auf eine verminderte Stabilität Naringenins im Vergleich zu N5R hindeuten. Eine weiterführende Diskussion des Vergleichs zwischen N5R und Naringenin erfolgt dabei in Abschnitt 4.8.

Die beobachtete Förderung der antiinflammatorischen Treg-Zellen durch N5R könnte entscheidend für die lindernde Wirkung von N5R auf den Krankheitsverlauf sein. Treg-Zellen unterdrücken einerseits Entzündungsreaktionen und regulieren andererseits das Immunsystem, um immunologische Toleranz zu fördern und Autoimmunität vorzubeugen. Die Treg-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Pathologie von CED und zeigen Veränderungen bei betroffenen Patienten [27]. Eine über N5R vermittelte Förderung der Treg-Zellen könnte daher in der Therapie von CED ein wichtiger Angriffspunkt sein.

In den initialen *in vitro* T-Zell-Differenzierungen wurden neben der Stimulation der Treg-Zellen durch das Vorläufermolekül Naringenin auch Veränderungen der T-Effektorzellen beobachtet. Bei der Annahme, dass N5R das Prodrug von Naringenin darstellt, wäre eine Beeinflussung der T-Effektorzellen im Kolon durch orale N5R-Applikation ebenfalls denkbar. Dieser Einfluss spiegelte sich jedoch nicht in der Zellanalyse der akuten DSS-Kolitis an Tag 9 wider. Die Abwesenheit von Veränderungen in den Frequenzen der TH1- und TH17-Zellen der N5R-Gruppe in der akuten DSS-Kolitis könnte durch den Zeitpunkt der Analyse erklärt werden. Es handelt sich hierbei um eine Momentaufnahme, die nicht die Komplexität des Systems widerspiegelt. Das zelluläre Profil unterliegt Schwankungen. Es wäre denkbar, dass eine anfängliche Förderung der Treg-Zellen durch N5R oder seine aktive Form Naringenin dazu führt, dass z.B. erst in der Folge weniger proinflammatorische TH1- und TH17-Zellen differenzieren und proliferieren.

Die zelluläre Verteilung unter dem Einfluss von N5R könnte in Zukunft durch eine durchflusszytometrische Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten während der DSS-Kolitis genauer untersucht werden. Dies würde einen umfassenderen Einblick in die dynamischen Veränderungen des Zellprofils ermöglichen und potenzielle zeitabhängige Effekte von N5R auf die Immunantwort aufdecken.

4.6 N5R ist protektiv im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis.

Im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis zeigte sich eine stark protektive Wirkung durch die Applikation von N5R, in geringerem Maße auch durch Naringenin im Vergleich zur Kontrollgruppe. In diesem Modell differenzieren die zu Beginn des Experiments injizierten naiven CD45RB^{high}-Zellen in die proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen, ohne die Fähigkeit zur Differenzierung in antientzündliche Treg-Zellen. Es kommt in der Folge zur Ausbildung einer Pankolitis [196]. Die Durchflusszytometrie 5 Wochen nach

Versuchsbeginn bestätigte, dass in den durchgeführten Experimenten keine Foxp3⁺ Treg-Zellen in den Versuchsgruppen vorlagen. Somit führte die Verabreichung von N5R oder Naringenin nicht zu einer Induktion dieser Zellpopulation, wie es zuvor in der akuten DSS-Kolitis unter N5R und in den *in vitro* CD4⁺ T-Zell-Differenzierungen unter dem Vorläufermolekül Naringenin der Fall war. Vor allem der Effekt auf die TH1- und TH17-Zellen scheint daher im Kontext der T-Zell-Transfer-Kolitis entscheidend zu sein.

Bei der Analyse des zellulären Profils zu Versuchsende zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen hinsichtlich der TH1- und TH17-Zellen in den prozentualen und absoluten Zellzahlen. Dies könnte jedoch auf den späten Zeitpunkt der Analyse zurückzuführen sein und erfordert weitere Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten der Transfer-Kolitis, um präzisere Schlussfolgerungen zu ziehen. Es ist anzunehmen, dass in den ersten Wochen möglicherweise entscheidende immunologische Interaktionen durch die Wirkung von N5R und Naringenin stattfinden, die am Ende der Transfer-Kolitis, wenn insgesamt eine hohe Entzündungsaktivität vorliegt, nicht mehr nachweisbar sind.

Außerdem erfolgte keine weitere Charakterisierung der TH1- und TH17-Zellen hinsichtlich einer pro- oder antiinflammatorischen Aktivierung. In diesem Zusammenhang wäre es z.B. denkbar, dass die TH17-Zellen unter dem Einfluss von N5R oder Naringenin zwar in ihrer Anzahl nicht beeinflusst wurden, jedoch das antientzündlich wirkende Zytokin IL-10 produzieren. Es bedarf weiterer Untersuchungen des Profils der T-Effektorzellen, um genauere Aussagen treffen zu können.

In den *in vitro* Differenzierungen der TH1- und TH17-Zellen unter Inkubation mit Naringenin, dem Vorläufermolekül von N5R, wurden deutliche Veränderungen der TH1- und TH17-Populationen beobachtet. Dies stützt die Hypothese, dass proentzündliche T-Effektorzellen im Rahmen der T-Zell-Kolitis wahrscheinlich unter dem Einfluss von N5R gehemmt werden, wodurch die Entzündungsreaktion insgesamt milder verläuft. Mögliche Signalwege könnten, wie in Abschnitt 1.2.1.2 beschrieben, Interaktionen mit STAT-Proteinen, dem AhR oder dem *Toll-like* Rezeptor/ NF-κB-Signalweg darstellen [148, 149, 161, 164-169]. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass T-Zellen eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus von N5R spielen. Im Kontext der T-Zell-Transfer-Kolitis scheinen TH1- und TH17-Zellen wahrscheinlich den Hauptangriffsort von N5R darzustellen.

Die Naringeningruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine geringere Krankheitsaktivität in Bezug auf den relativen Gewichtsverlust und den endoskopischen Kolitis-Score. Dennoch war der schützende Effekt von Naringenin nicht so deutlich ausgeprägt wie der von N5R. Dieses Verhalten bestätigt die zuvor formulierte Hypothese, dass N5R eine insgesamt stabilere und wirkungsvollere Form seines Vorläufermoleküls Naringenin darstellt (siehe Abschnitt 4.8), wobei seine schützende Wirkung vermutlich vor allem über T-Zellen entfaltet wird.

4.7 CD4⁺ T-Effektorzellen und besonders Treg-Zellen spielen vermutlich eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus von N5R.

Basierend auf den vorangegangenen Experimenten bestand die Hypothese, dass Treg-Zellen im Wirkmechanismus von N5R neben den T-Effektorzellen eine Schlüsselfunktion einnehmen. Im Modell der akuten DSS-Kolitis wurde eine Zunahme der Frequenz der Treg-Zellen am 9. Tag bei den mit N5R behandelten Mäusen festgestellt. Zudem zeigte das Vorläufermolekül Naringenin in allen Kulturansätzen eine deutliche Förderung der Treg-Zellen in den *in vitro* CD4⁺ TH1-, TH17- und Treg-Zell-Differenzierungen.

Interessanterweise erwies sich die Applikation von N5R in der CD45RB^{high}-Kolitis als protektiv, obwohl in diesem Modell nur wenige Treg-Zellen (< 1 %) vorhanden sind und auch nicht durch N5R induziert wurden. Die T-Zell-Transfer-Kolitis ist dabei primär durch TH1- und TH17-Zellen vermittelt. Dies legt nahe, dass Treg-Zellen nicht alleiniger Angriffspunkt für N5R sind und N5R auch ohne Treg-Zellen wirksam ist. In einem finalen Schritt sollte der spezifische und möglicherweise additive Einfluss der Treg-Zellen im Wirkmechanismus von N5R, welcher in den oben genannten Experimenten sehr prägnant war, weiter definiert werden.

In *Rag1*^{-/-} Mäusen, die mit DREG-Zellen rekonstituiert werden, ist durch eine Injektion von DTX eine spezifische Depletion der Treg-Zellen möglich. In diesem Modell manifestierte sich im Rahmen einer akuten DSS-Kolitis nur dann ein schützender Effekt von N5R, wenn die Treg-Zellen nicht depletiert wurden. Die Verabreichung von DTX und die resultierende Depletion der Treg-Zellen hoben jedoch die krankheitslindernde Wirkung von N5R auf. Somit deutet es darauf hin, dass das Vorhandensein von Treg-Zellen erforderlich ist, damit N5R seine schützende Wirkung im Kontext der DSS-Kolitis entfalten kann.

Die vorliegenden Ergebnisse stammen dabei aus nur einem durchgeführten Experiment, da der zweite Versuch aufgrund technischer Fehler nicht auswertbar war. Die statistische Gültigkeit ist daher nicht ausreichend beurteilbar, und es ist notwendig, das Experiment für präzisere Aussagen zu wiederholen. Dennoch liefern die vorliegenden Versuchsergebnisse in Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten Hinweise darauf, dass die Interaktion von N5R mit den Treg-Zellen besonders im Modell der akuten DSS-Kolitis eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Einerseits scheinen Treg-Zellen eine wichtige Funktion im Wirkmechanismus von N5R beziehungsweise seines Vorläufermoleküls Naringenin im Modell der akuten DSS-Kolitis und in der *in vitro* CD4⁺ T-Zell-Differenzierung zu übernehmen. Andererseits zeigte N5R im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis, auch ohne Vorliegen von Treg-Zellen, vermutlich über eine Beeinflussung der TH1- und TH17-Zellen einen lindernden Effekt auf den Krankheitsverlauf. Dieses unterschiedliche Verhalten in den verschiedenen Modellen zeigt, dass der Wirkmechanismus von N5R in Zukunft noch weiterer Erforschung bedarf.

Die Wirkung von N5R könnte in den beiden Modellen unterschiedlich sein, da ihre Pathophysiologie auf verschiedenen zellulären Mechanismen beruht. Die akute DSS-Kolitis zeichnet sich durch einen Defekt der Schleimhautbarriere aufgrund des toxischen DSS aus und ähnelt in ihrer Pathologie am ehesten einer Colitis ulcerosa. In dieser chemisch induzierten Form der DSS-Kolitis spielen T-Zellen erst im späteren Verlauf eine Rolle, nicht jedoch bei der Induktion der Kolitis, die im Einklang mit den hier erhobenen Daten durch eine Aktivierung von Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen charakterisiert ist

[193, 194]. Im Gegensatz dazu sind bei der T-Zell-Transfer-Kolitis bereits bei der Induktion der Kolitis T-Zellen involviert. So ist die T-Zell-Transfer-Kolitis durch ein autoreaktives Immunsystem geprägt und rein durch T-Effektorzellen vermittelt. Dieser Mechanismus ist beim menschlichen Morbus Crohn ähnlich [196].

Die Unterschiede in der Krankheitsentwicklung der beiden Kolitis-Modelle könnten potenziell variierende Wirkmechanismen und Angriffspunkte von N5R aufzeigen. Bei einer künftigen Nutzung von N5R bei CED-Patienten könnten demnach unterschiedliche Interventionsmöglichkeiten mit N5R erreicht werden, abhängig davon, ob z.B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn vorliegt. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass T-Zellen grundlegend für die Wirkung von N5R sind und die Treg-Zellen wahrscheinlich einen additiven Einfluss im Wirkmechanismus von N5R haben.

4.8 N5R zeigt in zwei *in vivo* Kolitis-Modellen bessere Ergebnisse als sein Vorläufermolekül Naringenin.

Die Beobachtung der zum Teil mangelnden oder eingeschränkten Wirksamkeit von Naringenin im Vergleich zu N5R in den durchgeführten *in vivo* Experimenten unterstützt die Annahme, dass Naringenins Wirkung nicht konstant ist und möglicherweise unvorhersehbaren Wechselwirkungen unterliegt, welche die Stabilität des Moleküls beeinträchtigen können. Potenzielle Einflussfaktoren könnten die Lagerung, Zubereitung und Applikation betreffen (siehe Abschnitt 4.1). Es ist anzunehmen, dass mögliche Negativergebnisse über Naringenin nicht veröffentlicht wurden und die vorliegende Literatur durch ausschließliche Positivergebnisse verzerrt ist, im Sinne eines *Publication Bias*.

Diese Arbeit deutet darauf hin, dass N5R im Vergleich zu Naringenin eine stabilere Aufbereitung darstellt und möglicherweise eine bessere Alternative in der Therapie von CED ist. Zusätzliche Studien könnten in Zukunft wertvoll sein, um genauere Aussagen über die Vorteile der Verzuckerung von Naringenin und die Haltbarkeit des Flavanons zu treffen. Dabei sollten biochemisch stabile Varianten von Naringenin, wie beispielsweise Naringin (Naringenin-7-neohesperidoside), dem Ausgangsprodukt von Naringenin, als Vergleich herangezogen werden.

Ein interessanter Aspekt ist in diesem Kontext der potenziell additive Einfluss auf die Mikrobiota-Zusammensetzung durch das zusätzliche Zuckermolekül von N5R. Bei der oralen Verabreichung spalten intestinale Kommensale wahrscheinlich zunächst die Glykosid-Bindungen von N5R auf, wodurch die aktive Form Naringenin freigesetzt wird. Dieser Prozess könnte einerseits das Wachstum probiotischer Mikroorganismen fördern und sich positiv auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auswirken. Andererseits ermöglicht die Spaltung der Zuckermoleküle den Übergang in die aktive Form Naringenin. Naringenin und sein Vorläufermolekül Naringin haben laut Literatur einen positiven Einfluss auf die Komposition der Mikrobiota [174]. Eine gesunde Mikrobiota unterstützt die Darmbarriere, indem sie beispielsweise die Schleimproduktion fördern oder

entzündungshemmende Signale aussenden kann [146, 240]. In diesem Kontext wurde in experimentellen Kolitis-Modellen unter einer Naringenin-Diät eine verbesserte Integrität der Darmoberfläche und der Lamina propria nachgewiesen [143]. N5R könnte diesen Effekt, wie oben beschrieben, noch verstärken.

Es besteht also die Möglichkeit, dass N5R im Vergleich zu Naringenin einen stärkeren positiven Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota hat. Dies könnte dazu führen, dass im Vergleich weniger pathogene Bakterien die Schleimhautbarriere des Darms durchdringen. Es wäre außerdem denkbar, dass bestimmte Darmbakterien durch N5R-Gabe überrepräsentiert werden, die ebenfalls die Treg-Zell-Akkumulation verstärken oder die Reifung/ Funktion der Zellen des angeborenen Immunsystems beeinflussen. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.3 in *Rag1^{-/-}* Mäusen zeigen jedoch, dass der vermeintliche Effekt von N5R auf die Mikrobiota-Zusammensetzung nicht ausreicht, um die Schwere der akuten DSS-Kolitis zu lindern, wenn die Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem ausbleibt. Nichtsdestotrotz ist die Verzuckerung von N5R allein durch die erhöhte Stabilität in der Passage des GI-Traktes ein Vorteil gegenüber Naringenin (siehe Abschnitt 4.1) und vermag darüber hinaus additive positive Effekte auf die Mikrobiota besitzen.

4.9 Fazit und Ausblick

Die Entwicklung neuer Therapeutika ist in der Behandlung von CED von großer Bedeutung. Das Flavonoid Naringenin könnte hierbei zukünftig als potenzielles Therapeutikum und Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden. Vielmehr könnte die modifizierte Form von Naringenin, N5R, einen noch vielversprechenderen Kandidaten in der Therapie von CED darstellen. So belegt diese Arbeit erstmalig, dass N5R bessere therapeutische Ergebnisse als sein Vorläufermolekül Naringenin erzielen kann. N5R fungiert vermutlich als Prodrug und wird von der Darmmikrobiota zu seiner aktiven Form, Naringenin, hydrolysiert. Dabei spielt das adaptive Immunsystem, in Form der T-Zellen, eine entscheidende Rolle in der Wirkungsweise dieser neuartigen Verbindung.

Naringenin, die aktive Form des Prodrug, zeigt molekulare Mechanismen mit pleiotropen Effekten, die verschiedene zelluläre Signalwege auf verschiedenen Ebenen in der Ätiologie von Krankheiten involvieren (siehe Abschnitt 1.2.1.2). In diesem Kontext ist anzunehmen, dass N5R neben dem Einfluss auf T-Zellen auch durch komplexe, möglicherweise teilweise unspezifische Interaktionen ein breites Wirkungsspektrum bietet. Somit könnte das Prodrug N5R nicht nur bei einer einzelnen spezifischen Krankheit wie der Kolitis eingesetzt werden, sondern wahrscheinlich auch bei weiteren Krankheiten, bei denen sein Vorläufermolekül bereits getestet wird. Die Verzuckerung von N5R verleiht dem Molekül Stabilität bei der Passage durch den Magen-Darm-Trakt, insbesondere gegenüber der Magensäure und hydrolysierenden Verdauungsenzymen. Vermutlich kann das Prodrug ohne Spaltung der glykosidischen Bindung durch die intestinale Mikrobiota nicht aktiv werden. Daher wäre es entscheidend, je nach vorliegender Krankheit, Angriffsort und gewünschter Pharmakokinetik zu entscheiden, ob die verzuckerte oder glykosidische Darreichungsform von Naringenin verabreicht werden soll.

Ein interessanter Aspekt ist zudem die Interaktion von N5R mit der Darmmikrobiota, die künftig mittels 16S-ribosomale RNA (rRNA)- und metagenomischen Analysen an murinen und humanen Stuhlproben weiter erforscht werden könnte. Des Weiteren vermögen Studien über die Auswirkungen von N5R auf Stoffwechselmetaboliten, insbesondere bestimmte kurzkettige Fettsäuren (SCFA), die mit der Mikrobiota in Verbindung stehen, in *Metabolomics*-Analysen entscheidende Erkenntnisse liefern. Experimente mit keimfreien Mäusen könnten hierbei Einsichten über die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglichen. Das gnotobiotische Tiermodell erlaubt eine präzise Ernährungskontrolle sowie eine gezielte Besiedelung des gastrointestinalen Trakts mit Mikroorganismen. Dadurch wäre eine Erforschung der Wirkung von N5R auf die mikrobielle Zusammensetzung weniger komplex und bestimmte Fragestellungen leichter nachvollziehbar.

Die in dieser Arbeit im Tiermodell präsentierten Forschungsergebnisse, zusammen mit den bisher veröffentlichten Studien über Naringenin, deuten darauf hin, dass der Einsatz von N5R in der klinischen Therapie zur Prävention und Behandlung von CED sinnvoll sein könnte. Es ist anzumerken, dass der tägliche Bedarf an Naringenin für kurative Zwecke nicht durch die üblichen Mahlzeiten gedeckt wird [169]. Da N5R ein biochemisch synthetisiertes Molekül ist und nicht natürlicherweise in der Nahrung vorkommt, ist eine Supplementierung in beiden Fällen erforderlich. Weitere Studien sind unerlässlich, um das Verständnis über die allgemeinen Auswirkungen von N5R zu vertiefen. Bis dahin kann in der Ernährungsberatung und besonders bei Patienten mit Krankheitsleiden dazu geraten werden, auf eine flavonoidreiche Kost mit viel Obst und Gemüse zurückzugreifen. Zusätzlich könnten gezielte Empfehlungen für spezielle Lebensmittel wie z.B. Grapefruits oder auch Nahrungsergänzungsmittel mit einer besonders hohen Anreicherung von Naringenin in Betracht gezogen werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung auf Deutsch

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn sind durch eine Störung der intestinalen Barriere, ein verändertes Mikrobiom sowie eine unkontrollierte Immunantwort gekennzeichnet. In der Therapie kommen zurzeit unterschiedliche Medikamente zum Einsatz, die vor allem die Entzündungsreaktion modulieren. Ziel ist dabei die Kontrolle akuter entzündlicher Schübe und die Erhaltung von Remission. In den letzten Jahrzehnten haben sich die therapeutischen Möglichkeiten stetig weiterentwickelt, sodass heutzutage eine Bandbreite an Medikamenten zur Verfügung steht. Neben konventionellen immunregulatorischen Medikamenten wie z.B. Glukokortikoiden, 5-Aminosalicylsäure oder Azathioprin kann eine zielgerichtete Therapie durch *Biologika* und *Small Molecules* zum Einsatz kommen. Obwohl in den vergangenen Jahren deutliche Fortschritte in den Behandlungsmöglichkeiten erzielt und damit die Lebensqualität von Patienten mit CED gesteigert werden konnte, weisen alle zurzeit eingesetzten Medikamente Nebenwirkungen und Limitationen auf. Daher ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen von großer Relevanz.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einsatz einer neuen Verbindung, Naringenin-5-O-Rhamnosid (N5R), in der Therapie von CED zu untersuchen. Das Vorläufermolekül des N5Rs, Naringenin, wurde aufgrund seiner vielseitigen biologischen Eigenschaften bereits als potenzieller Kandidat in der Therapie von CED diskutiert. Naringenin ist ein Flavonoid und weist als Polyphenol antientzündliche und antioxidative Effekte auf. Nichtsdestotrotz ist es durch seine hohe Lipophilie schlecht bioverfügbar und sein therapeutischer Einsatz limitiert. Durch die Entwicklung von N5R könnte diese Limitation behoben werden. N5R weist ein zusätzliches Zuckermolekül auf, wodurch die neuartige Verbindung im Vergleich zum Naringenin hydrophiler und damit besser bioverfügbar ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass N5R durch die Glykosylierung zusätzliche protektive Eigenschaften entfalten kann. In einem ersten Schritt sollte in dieser Arbeit die Wirksamkeit von N5R im Vergleich zu Naringenin untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit ging es um die Identifikation eines möglichen Wirkungsmechanismus von N5R.

Um die Wirksamkeit von N5R zu untersuchen, wurden zunächst *in vitro* Differenzierungen von CD4⁺ T-Zellen, die als entscheidende Akteure in der Pathologie von CED beschrieben werden, betrachtet. Hierbei wurde ein Effekt des Vorläufermoleküls Naringenin auf die T-Zellen beobachtet, jedoch nicht von N5R. So förderte Naringenin im Gegensatz zu N5R die Differenzierung der antientzündlichen Treg-Zellen und hemmte die Differenzierung der proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen. Da angenommen wird, dass N5R erst nach Spaltung durch die intestinale Mikrobiota in seine biologisch aktive Form Naringenin umgewandelt wird, erfolgte daraufhin die Testung von N5R *in vivo*. Hierbei wurde der Einfluss von N5R im murinen Modell der akuten DSS-Kolitis im Vergleich zu Naringenin betrachtet. Es zeigte sich ein protektiver Effekt sowohl von N5R als auch von Naringenin

im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um den Wirkmechanismus des N5R zu untersuchen, wurde eine Zellanalyse per Durchflusszytometrie an Tag 9 der DSS-Kolitis durchgeführt. In der Analyse der T-Zellen ließ sich eine signifikante Erhöhung der Foxp3⁺ Treg-Zellen nachweisen. Um den Einfluss des angeborenen Immunsystems bei der Wirkungsweise von N5R genauer zu erforschen, wurde in einem nächsten Schritt das Modell der akuten DSS-Kolitis in lymphopenen Mäusen wiederholt. Hier zeigte sich ohne Beteiligung des adaptiven Immunsystems eine Aufhebung des protektiven Effektes von N5R. Dies führte zu der Annahme, dass das adaptiven Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des protektiven Einflusses von N5R spielt. Daher wurde N5R nachfolgend im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis, welche durch die Expansion von proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen gekennzeichnet ist, untersucht. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein stark protektiver Effekt durch N5R und in geringerem Ausmaß auch durch Naringenin. In einem finalen Schritt wurde die Interaktion von N5R mit Treg-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten lymphopenen Mäusen erforscht. In diesem Modell lassen sich die Treg-Zellen spezifisch ausschalten. In der Kontrollgruppe ohne Depletion der Treg-Zellen ließ sich erneut ein protektiver Effekt von N5R nachweisen. Nach Depletion der Treg-Zellen war der protektive Effekt von N5R nicht vorhanden. Diese Ergebnisse deuten an, dass T- Zellen und speziell Treg-Zellen eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus von N5R spielen.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass N5R ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in Tiermodellen für CED ist und eine optimierte Alternative zu seinem Vorläufermolekül Naringenin darstellt, da es einfacher anzuwenden und teilweise wirksamer ist. Es besteht die Annahme, dass N5R diesen Effekt zumindest teilweise über eine Induktion von Treg-Zellen und eine Hemmung proinflammatorischer T-Zellen bewirkt. Das Nutrazeutikum N5R könnte in Zukunft in der Therapie von CED neben den etablierten Medikamenten einen wichtigen Therapiepfeiler darstellen.

5.2 Summary in English

Chronic inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis and Crohn's disease, are characterized by a disruption of the intestinal barrier, an altered microbiome, and an uncontrolled immune response. Various drugs are currently used in therapy, which primarily modulates the inflammatory response. The aim is to control acute inflammatory episodes and to maintain remission. Over the past decades, therapeutic options have steadily evolved, so a wide range of drugs is available today. In addition to conventional immunoregulatory drugs, such as glucocorticoids, 5-aminosalicylic acid, or azathioprine, targeted therapy by biologics and small molecules can be used. Although significant progress in treatment options has been achieved in recent years, thus improving the quality of life of patients with IBD, all currently used drugs have side effects and limitations. Therefore, the development of new therapeutic options is of great relevance.

This work aims to investigate the use of a new compound, Naringenin-5-O-Rhamnoside (N5R), in the therapy of IBD. The precursor molecule of N5R, naringenin, has already been

discussed as a potential candidate in the therapy of IBD due to its versatile biological properties. Naringenin is a flavonoid and exhibits anti-inflammatory and antioxidant effects as a polyphenol. However, its poor bioavailability, caused by its high lipophilicity, limits naringenin's therapeutic use. The development of N5R could overcome this limitation. N5R features an additional sugar molecule, making the novel compound more hydrophilic and thus more bioavailable compared to naringenin. Furthermore, there is a possibility that N5R may display additional protective properties through glycosylation. In the first step, this work will investigate the efficacy of N5R compared to naringenin. The second part of the work will focus on the identification of a possible mechanism of action of N5R.

To investigate the efficacy of N5R, *in vitro* differentiation of CD4⁺ T cells, which are described as crucial players in the pathology of IBD, was first considered. Here, an effect of the precursor molecule naringenin on T cells was observed, but not of N5R. Thus, in contrast to N5R, naringenin promoted the differentiation of anti-inflammatory Treg cells and inhibited the differentiation of proinflammatory TH1 and TH17 cells. Since it is assumed that N5R is converted to its biologically active form, naringenin, only after cleavage by the intestinal microbiome, N5R was then tested *in vivo*. Here, the influence of N5R in the murine model of acute DSS-colitis was assessed in comparison to naringenin. It showed a protective effect of N5R and naringenin compared to the control group. To investigate the mechanism of action of N5R, cell analysis by flow cytometry was performed on day nine of DSS-colitis. A significant increase in Foxp3⁺ Treg cells could be detected in the analysis of T cells. To further explore the influence of the innate immune system in the mode of action of N5R, the next step was to repeat the model of acute DSS-colitis in lymphopenic mice. Here, the protective effect of N5R was shown to be abrogated without the involvement of the adaptive immune system. This led to the assumption that the presence of the adaptive immune system is essential for N5R to exert its protective effects. Therefore, subsequently, N5R was investigated in the model of T cell transfer colitis, which is characterized by the expansion of proinflammatory TH1 and TH17 cells. A strong protective effect by N5R and to a lesser extent by naringenin was shown compared with the control group. In a final step, the role of Foxp3⁺ Treg cells in mediating the protective effects of N5R was explored in the model of acute DSS-colitis. To this end lymphopenic mice were reconstituted with DEREG cells. In this model, Treg cells can be specifically deleted. In the control group, without deletion of Treg cells, a protective effect of N5R could again be demonstrated. After the deletion of Treg cells, the protective effect of N5R was not present. Taken together, the results suggest T cells, and specifically Treg cells play a crucial role mediating the effect of N5R.

Overall, this work shows that N5R is a promising therapeutic approach in animal models for IBD and represents an optimized alternative to its precursor molecule, naringenin, due to its easier application and partially increased efficacy. Furthermore, our data suggest that the protective effect of N5R is mediated at least in part via expansion of Treg cells and inhibition of proinflammatory T cells. In the future, the nutraceutical N5R could represent an important therapeutic pillar in the therapy of IBD, in addition to the established drugs. However, further translational work is required to establish its use in clinic.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|----------------------------------------------|
| ACK-Lysepuffer..... | <i>Ammoniumchlorid-Kalium Lysepuffer</i> |
| AhR..... | Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor |
| ANCA..... | Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper |
| ANOVA..... | Analysis of variance |
| ASCA..... | Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper |
| BHI..... | Brain Heart Infusion |
| bp..... | Basenpaare |
| CD..... | Cluster of Differentiation |
| CED..... | Chronisch Entzündliche Darmerkrankung |
| CRP..... | C-reaktive Protein |
| CYP..... | Cytochrom P450 |
| DAI..... | Disease Activity Index |
| DC..... | dendritische Zellen |
| DEREG..... | Depletion of Regulatory T cell |
| DSS..... | Dextransulfat Natriumsalz |
| DTE..... | Dithioerythritol |
| DTT..... | Dithioerythritol |
| DTX..... | Diphtherie-Toxin |
| eGFP..... | enhanced Green Fluorescent Protein |
| EtOH..... | Ethanol |
| FACS..... | Flow Cytometry |
| FBS..... | Fetales Kälberserum |
| FIR..... | Foxp3-IRES-mRFP |
| Foxp3..... | Forkhead-Box-Protein P3 |
| GWAS..... | genomweite Assoziationsstudien |
| HE-Färbung..... | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| HPLC..... | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| i.p..... | intraepitoneal |
| IELs..... | intraepitheliale Lymphozyten |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| IL..... | Interleukin |
| IL-22BP..... | IL-22 binding protein |
| IMID..... | immunvermittelte entzündliche Erkrankung |
| JAK-Inhibitor..... | Januskinase-Inhibitor |
| mAB..... | monoklonale Antikörper |
| MACS..... | magnetische Zellseparation |
| mAU..... | Milli-Absorbance Units |
| mRFP..... | Monomeric Red Fluorescent Protein |
| mRNA..... | Messenger-Ribonukleinsäure |
| N5R..... | Naringenin-5-O-Rhamnosid |
| NF-AT..... | nuclear factor of activated T cells |

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------|
| NF- κ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NK-Zellen | natürliche Killerzelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOD2 | Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2 |
| ÖGD | Ösophagogastroduodenoskopie |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Rag1 | Recombination activating gene 1 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rRNA | ribosomale RNA |
| S1P | Sphingosin-1-phosphat |
| SCFA | kurzkettige Fettsäuren |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| SPF | spezifisch-Pathogen-frei |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| STRIDE | Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease |
| TH1-Zellen | Typ-1-T-Helferzellen |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| Treg-Zellen | regulatorische T-Zellen |
| UKE | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Strukturmolekül Naringenin [132] | 15 |
| Abbildung 2: Strukturmolekül Naringenin-5-O-Rhamnosid [185] | 19 |
| Abbildung 3: Gating-Strategie der CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen. | 39 |
| Abbildung 4: Gating-Strategie des angeborenes Immunsystems. | 40 |
| Abbildung 5: Naringenin reduziert die proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen und fördert die antiinflammatorischen Treg-Zellen. | 47 |
| Abbildung 6: Kein Einfluss von N5R auf die Differenzierung von CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen unter TH1-, TH17- und Treg-Polarisationsbedingungen <i>in vitro</i> . | 49 |
| Abbildung 7: N5R und Naringenin lassen sich in sehr geringen Mengen im Stuhl der Mäuse nachweisen. | 51 |
| Abbildung 8: N5R und Naringenin sind protektiv im Modell der akuten DSS-Kolitis. | 53 |
| Abbildung 9: N5R zeigt eine niedrigere klinische Krankheitsaktivität an Tag 9 im Modell der akuten DSS-Kolitis. | 54 |
| Abbildung 10: N5R hat keinen Einfluss auf Zellzahlen der Leukozyten und CD4 ⁺ T-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis. | 55 |
| Abbildung 11: N5R erhöht die Foxp3 ⁺ Treg-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis im Kolon. | 57 |
| Abbildung 12: N5R erhöht die dendritischen Zellen sowie die inflammatorischen und residenten Monozyten/Makrophagen im Modell der akuten DSS-Kolitis. | 58 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 13: Kein Einfluss von N5R und Naringenin im Modell der akuten DSS-Kolitis in <i>Rag1</i> ^{-/-} Mäusen..... | 59 |
| Abbildung 14: Niedrigere klinische Krankheitsaktivität durch N5R im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers..... | 62 |
| Abbildung 15: N5R hat keinen Einfluss auf die Zellzahlen der Leukozyten und CD4 ⁺ T-Zellen im Modell des adaptiven T-Zell-Transfers..... | 63 |
| Abbildung 16: N5R zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Zellanalyse des adaptiven Immunsystems an Tag 35 im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis..... | 65 |
| Abbildung 17: N5R zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Zellanalyse des angeborenen Immunsystems an Tag 35 im Modell der T-Zell-Transfer-Kolitis. | 65 |
| Abbildung 18: N5R ist im Modell der DSS-Kolitis in mit DEREK-Zellen rekonstituierten <i>Rag1</i> ^{-/-} Mäusen nur in Anwesenheit von Treg-Zellen protektiv..... | 68 |

8 Tabellenverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Reagenzien für die <i>in vitro</i> Experimente und Tierversuche..... | 23 |
| Tabelle 2: Reagenzien für die Durchflusszytometrie | 24 |
| Tabelle 3: Reagenzien für die PCR-Genotypisierung | 24 |
| Tabelle 4: Primer für die Genotypisierung | 25 |
| Tabelle 5: Zytokine für die <i>in vitro</i> Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen..... | 26 |
| Tabelle 6: Antikörper für die <i>in vitro</i> Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen | 26 |
| Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie | 26 |
| Tabelle 8: Puffer und Lösungen | 27 |
| Tabelle 9: Verbrauchsmaterial..... | 27 |
| Tabelle 10: verwendete Geräte | 28 |
| Tabelle 11: Versuchstiere | 29 |
| Tabelle 12: Master Mix Singer..... | 30 |
| Tabelle 13: Master Mix Fir..... | 30 |
| Tabelle 14: Master Mix IFN- γ -Katushka | 31 |
| Tabelle 15: Master Mix Rag1 | 31 |
| Tabelle 16: Touchdown Programm | 32 |
| Tabelle 17: TH17-Polarisationsbedingungen | 33 |
| Tabelle 18: TH1-Polarisationsbedingungen | 33 |
| Tabelle 19: Treg-Polarisationsbedingungen..... | 34 |
| Tabelle 20: Zellen des adaptiven Immunsystems..... | 39 |
| Tabelle 21: Zellen des angeborenes Immunsystems | 40 |

9 Literaturverzeichnis

1. Khalili, H., et al., *Microscopic Colitis and Risk of Inflammatory Bowel Disease in a Nationwide Cohort Study*. *Gastroenterology*, 2020. **158**(6): p. 1574-1583.e2.
2. Shastri, S.A., et al., *Proton pump inhibitors use and risk of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of observational studies*. *Med Pharm Rep*, 2022. **95**(4): p. 357-369.
3. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(6): p. 417-29.
4. Malik, T.F. and D.M. Aurelio, *Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Danilo Aurelio declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
5. Kim, E.R. and D.K. Chang, *Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(29): p. 9872-81.
6. Lönnfors, S., et al., *IBD and health-related quality of life -- discovering the true impact*. *J Crohns Colitis*, 2014. **8**(10): p. 1281-6.
7. Spekhorst, L.M., et al., *Cohort profile: design and first results of the Dutch IBD Biobank: a prospective, nationwide biobank of patients with inflammatory bowel disease*. *BMJ Open*, 2017. **7**(11): p. e016695.
8. Danese, S. and C. Fiocchi, *Ulcerative colitis*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(18): p. 1713-25.
9. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors*. *Autoimmun Rev*, 2004. **3**(5): p. 394-400.
10. Kucharzik, T., et al., *[Updated S3-Guideline Colitis ulcerosa. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) - AWMF Registry 021/009]*. *Z Gastroenterol*, 2018. **56**(9): p. 1087-1169.
11. Hanauer, S.B., *Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12 Suppl 1**: p. S3-9.
12. Loftus, E.V., Jr. and W.J. Sandborn, *Epidemiology of inflammatory bowel disease*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2002. **31**(1): p. 1-20.
13. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(1): p. 46-54.e42; quiz e30.
14. Peña-Sánchez, J.N., et al., *Increasing Prevalence and Stable Incidence Rates of Inflammatory Bowel Disease Among First Nations: Population-Based Evidence From a Western Canadian Province*. *Inflamm Bowel Dis*, 2022. **28**(4): p. 514-522.
15. *The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020. **5**(1): p. 17-30.
16. Ng, S.C., et al., *Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-pacific Crohn's and colitis epidemiology study*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(1): p. 158-165.e2.

17. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(5): p. 741-5.
18. Lewis, J.D. and M.T. Abreu, *Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(2): p. 398-414.e6.
19. Ananthakrishnan, A.N., *Epidemiology and risk factors for IBD*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015. **12**(4): p. 205-17.
20. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, *The fundamental basis of inflammatory bowel disease*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 514-21.
21. Ananthakrishnan, A.N., et al., *Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018. **15**(1): p. 39-49.
22. Silva, F.A., et al., *The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterol Res Pract*, 2016. **2016**: p. 2097274.
23. Shih, D.Q. and S.R. Targan, *Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(3): p. 390-400.
24. Saez, A., et al., *Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(2).
25. Hu, C., et al., *Intestinal Immune Imbalance is an Alarm in the Development of IBD*. *Mediators Inflamm*, 2023. **2023**: p. 1073984.
26. Zhang, Y.Z. and Y.Y. Li, *Inflammatory bowel disease: pathogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(1): p. 91-9.
27. Gomez-Bris, R., et al., *CD4 T-Cell Subsets and the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(3).
28. Kałużna, A., P. Olczyk, and K. Komosińska-Vassev, *The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in the Pathogenesis and Development of the Inflammatory Response in Ulcerative Colitis*. *J Clin Med*, 2022. **11**(2).
29. Imam, T., et al., *Effector T Helper Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1212.
30. de Souza, H.S. and C. Fiocchi, *Immunopathogenesis of IBD: current state of the art*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(1): p. 13-27.
31. Brockmann, L., et al., *Molecular and functional heterogeneity of IL-10-producing CD4(+) T cells*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 5457.
32. Uhlig, H.H., et al., *Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis*. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 5852-60.
33. Kotlarz, D., et al., *Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy*. *Gastroenterology*, 2012. **143**(2): p. 347-55.
34. Pelczar, P., et al., *A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease*. *Science*, 2016. **354**(6310): p. 358-362.
35. Russell, R.K. and J. Satsangi, *Does IBD run in families?* *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14 Suppl 2**: p. S20-1.
36. Satsangi, J., et al., *Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1996. **38**(5): p. 738-41.

37. Pigneur, B., et al., *Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: a survey of the Genius Working Group*. *Inflamm Bowel Dis*, 2013. **19**(13): p. 2820-8.
38. Liu, J.Z., et al., *Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations*. *Nat Genet*, 2015. **47**(9): p. 979-986.
39. Ek, W.E., M. D'Amato, and J. Halfvarson, *The history of genetics in inflammatory bowel disease*. *Ann Gastroenterol*, 2014. **27**(4): p. 294-303.
40. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
41. Hong, J., et al., *Polymorphisms in NFKB1A and ICAM-1 genes in New Zealand Caucasian Crohn's disease patients*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007. **22**(10): p. 1666-1670.
42. Nambu, R., et al., *A Systematic Review of Monogenic Inflammatory Bowel Disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022. **20**(4): p. e653-e663.
43. Glocker, E.O., et al., *Infant colitis--it's in the genes*. *Lancet*, 2010. **376**(9748): p. 1272.
44. Xavier, R.J. and J.D. Rioux, *Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(8): p. 631-43.
45. Caruso, R., B.C. Lo, and G. Núñez, *Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease*. *Nat Rev Immunol*, 2020. **20**(7): p. 411-426.
46. Zollner-Schwetz, I., et al., *The Toxin-Producing Pathobiont *Klebsiella oxytoca* Is Not Associated with Flares of Inflammatory Bowel Diseases*. *Dig Dis Sci*, 2015. **60**(11): p. 3393-8.
47. Damman, C.J., et al., *The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation?* *Am J Gastroenterol*, 2012. **107**(10): p. 1452-9.
48. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species*. *Science*, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
49. Glassner, K.L., B.P. Abraham, and E.M.M. Quigley, *The microbiome and inflammatory bowel disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2020. **145**(1): p. 16-27.
50. Becker, C., M.F. Neurath, and S. Wirtz, *The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease*. *Ilar j*, 2015. **56**(2): p. 192-204.
51. Man, S.M., N.O. Kaakoush, and H.M. Mitchell, *The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(3): p. 152-68.
52. Elinav, E., et al., *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis*. *Cell*, 2011. **145**(5): p. 745-57.
53. Haneishi, Y., et al., *Inflammatory Bowel Diseases and Gut Microbiota*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(4).
54. Imdad, A., et al., *Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023. **4**(4): p. Cd012774.
55. Chapman-Kiddell, C.A., et al., *Role of diet in the development of inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(1): p. 137-51.

56. Ananthakrishnan, A.N., et al., *A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 970-7.
57. Abegunde, A.T., et al., *Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(27): p. 6296-317.
58. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1462-71.
59. Schneider, K.M., et al., *The enteric nervous system relays psychological stress to intestinal inflammation*. Cell, 2023. **186**(13): p. 2823-2838.e20.
60. Ulitsky, A., et al., *Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2011. **35**(3): p. 308-16.
61. Khan, K.J., et al., *Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 661-73.
62. Roda, G., et al., *Crohn's disease*. Nat Rev Dis Primers, 2020. **6**(1): p. 22.
63. Petagna, L., et al., *Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence*. Biol Direct, 2020. **15**(1): p. 23.
64. Meißner, T., *Biomarker machen die Therapie einfacher*. CME, 2017. **14**(7): p. 28-28.
65. Plachta-Danielzik, S., et al., *2. Epidemiologie der CED*, in *Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen*, K. Torsten, et al., Editors. 2018, De Gruyter: Berlin, Boston. p. 17-24.
66. Veauthier, B. and J.R. Hornecker, *Crohn's Disease: Diagnosis and Management*. Am Fam Physician, 2018. **98**(11): p. 661-669.
67. Morson, B.C., *Histopathology of Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 1971. **6**(7): p. 573-5.
68. Sturm, A., et al., *Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)*. Z Gastroenterol, 2022. **60**(3): p. 332-418.
69. Wilkins, T., K. Jarvis, and J. Patel, *Diagnosis and management of Crohn's disease*. Am Fam Physician, 2011. **84**(12): p. 1365-75.
70. Van Assche, G. and P. Rutgeerts, *Medical management of postoperative recurrence in Crohn's disease*. Gastroenterol Clin North Am, 2004. **33**(2): p. 347-60, x.
71. Rutgeerts, P., et al., *Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn's disease recurrence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 856-61.
72. Gajendran, M., et al., *A comprehensive review and update on ulcerative colitis()*. Dis Mon, 2019. **65**(12): p. 100851.
73. Dilauro, S. and N.F. Crum-Cianflone, *Ileitis: when it is not Crohn's disease*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(4): p. 249-58.
74. Pasvol, T.J., et al., *Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in UK primary care: a population-based cohort study*. BMJ Open, 2020. **10**(7): p. e036584.
75. Fries, W., et al., *Ulcerative Colitis in Adulthood and in Older Patients: Same Disease, Same Outcome, Same Risks?* Drugs Aging, 2022. **39**(6): p. 441-452.

76. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
77. DeRoche, T.C., S.Y. Xiao, and X. Liu, *Histological evaluation in ulcerative colitis*. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2014. **2**(3): p. 178-92.
78. Levine, J.S. and R. Burakoff, *Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease*. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2011. **7**(4): p. 235-41.
79. Solberg, I.C., et al., *Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study)*. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(4): p. 431-40.
80. Kühn, F. and E. Klar, *Surgical Principles in the Treatment of Ulcerative Colitis*. *Viszeralmedizin*, 2015. **31**(4): p. 246-50.
81. Fakhoury, M., et al., *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments*. *J Inflamm Res*, 2014. **7**: p. 113-20.
82. Magro, F., et al., *Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders*. *J Crohns Colitis*, 2017. **11**(6): p. 649-670.
83. Gomollón, F., et al., *3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management*. *J Crohns Colitis*, 2017. **11**(1): p. 3-25.
84. Reese, G.E., et al., *Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(10): p. 2410-22.
85. Vinding, K.K., et al., *Fecal Calprotectin Measured By Patients at Home Using Smartphones--A New Clinical Tool in Monitoring Patients with Inflammatory Bowel Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2016. **22**(2): p. 336-44.
86. Maaser, C., et al., *ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications*. *J Crohns Colitis*, 2019. **13**(2): p. 144-164.
87. Bousvaros, A., et al., *Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007. **44**(5): p. 653-74.
88. Surawicz, C.M., et al., *Mucosal biopsy diagnosis of colitis: acute self-limited colitis and idiopathic inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1994. **107**(3): p. 755-63.
89. Rutgeerts, P., et al., *Crohn's disease of the stomach and duodenum: A clinical study with emphasis on the value of endoscopy and endoscopic biopsies*. *Endoscopy*, 1980. **12**(6): p. 288-94.
90. Witte, A.M., et al., *Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract: the value of endoscopic examination*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1998. **225**: p. 100-5.
91. Turner, D., et al., *STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD*. *Gastroenterology*, 2021. **160**(5): p. 1570-1583.

92. Noor, N., et al., *OP01 PROFILE: a multi-centre, randomised, open-label, biomarker-stratified clinical trial of treatment strategies for patients with newly-diagnosed Crohn's disease*. Journal of Crohn's and Colitis, 2024. **18**(Supplement_1): p. i1-i2.
93. Pithadia, A.B. and S. Jain, *Treatment of inflammatory bowel disease (IBD)*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(3): p. 629-42.
94. Cai, Z., S. Wang, and J. Li, *Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 765474.
95. Arlt, G. and P. Kienle, [Not Available]. Zentralbl Chir, 2021. **146**(5): p. 433-437.
96. Curkovic, I., M. Egbring, and G.A. Kullak-Ublick, *Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates*. Dig Dis, 2013. **31**(3-4): p. 368-73.
97. Punchard, N.A., S.M. Greenfield, and R.P. Thompson, *Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid*. Mediators Inflamm, 1992. **1**(3): p. 151-65.
98. Shin, J.Y., et al., *Thiopurine Prodrugs Mediate Immunosuppressive Effects by Interfering with Rac1 Protein Function*. J Biol Chem, 2016. **291**(26): p. 13699-714.
99. Pearson, D.C., et al., *Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis*. Ann Intern Med, 1995. **123**(2): p. 132-42.
100. Vaghari-Tabari, M., et al., *Polyphenols and inflammatory bowel disease: Natural products with therapeutic effects?* Crit Rev Food Sci Nutr, 2022: p. 1-24.
101. Catalan-Serra, I. and Ø. Brenna, *Immunotherapy in inflammatory bowel disease: Novel and emerging treatments*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2018. **14**(11): p. 2597-2611.
102. Hazel, K. and A. O'Connor, *Emerging treatments for inflammatory bowel disease*. Ther Adv Chronic Dis, 2020. **11**: p. 2040622319899297.
103. Misselwitz, B., et al., *Emerging Treatment Options in Inflammatory Bowel Disease: Janus Kinases, Stem Cells, and More*. Digestion, 2020. **101 Suppl 1**: p. 69-82.
104. Parigi, T.L., M. Iacucci, and S. Ghosh, *Blockade of IL-23: What is in the Pipeline?* J Crohns Colitis, 2022. **16**(Supplement_2): p. ii64-ii72.
105. Sulz, M.C., et al., *Treatment Algorithms for Crohn's Disease*. Digestion, 2020. **101 Suppl 1**: p. 43-57.
106. Burri, E., et al., *Treatment Algorithm for Mild and Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis: An Update*. Digestion, 2020. **101 Suppl 1**: p. 2-15.
107. Naganuma, M., T. Fujii, and M. Watanabe, *The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2011. **46**(2): p. 129-37.
108. Tran, V., et al., *Evaluating tofacitinib citrate in the treatment of moderate-to-severe active ulcerative colitis: design, development and positioning of therapy*. Clin Exp Gastroenterol, 2019. **12**: p. 179-191.
109. Harris, C. and J.R.F. Cummings, *JAK1 inhibition and inflammatory bowel disease*. Rheumatology (Oxford), 2021. **60**(Supple 2): p. ii45-ii51.
110. Choden, T., N.A. Cohen, and D.T. Rubin, *Sphingosine-1 Phosphate Receptor Modulators: The Next Wave of Oral Therapies in Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2022. **18**(5): p. 265-271.

111. Korzenik, J.R. and D.K. Podolsky, *Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 197-209.
112. Nyboe Andersen, N., et al., *Association between tumor necrosis factor- α antagonists and risk of cancer in patients with inflammatory bowel disease*. Jama, 2014. **311**(23): p. 2406-13.
113. Wang, L., et al., *Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions*. Microbiome, 2022. **10**(1): p. 233.
114. Cotelle, N., *Role of flavonoids in oxidative stress*. Curr Top Med Chem, 2001. **1**(6): p. 569-90.
115. Gebicka, L., *Redox reactions of heme proteins with flavonoids*. J Inorg Biochem, 2020. **208**: p. 111095.
116. Sarkar, C., et al., *Redox Activity of Flavonoids: Impact on Human Health, Therapeutics, and Chemical Safety*. Chem Res Toxicol, 2022. **35**(2): p. 140-162.
117. Miller, A.L. *Antioxidant Flavonoids : Structure , Function and Clinical Usage*. 2002.
118. Hanske, L., et al., *The Bioavailability of Apigenin-7-Glucoside Is Influenced by Human Intestinal Microbiota in Rats*. The Journal of Nutrition, 2009. **139**(6): p. 1095-1102.
119. Malla, A.M., et al., *Flavonoids: A Reservoir of Drugs from Nature*. Mini Rev Med Chem, 2023. **23**(7): p. 772-786.
120. Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*. J Nat Prod, 2000. **63**(7): p. 1035-42.
121. Babu, P.V., D. Liu, and E.R. Gilbert, *Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(11): p. 1777-89.
122. Xu, B., et al., *Dietary Quercetin Supplementation Attenuates Diarrhea and Intestinal Damage by Regulating Gut Microbiota in Weanling Piglets*. Oxid Med Cell Longev, 2021. **2021**: p. 6221012.
123. Mukhopadhyaya, I., et al., *IBD-what role do Proteobacteria play?* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(4): p. 219-30.
124. Dodda, D., et al., *Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: role of quercetin*. Indian J Pharmacol, 2014. **46**(3): p. 286-91.
125. Hong, Z. and M. Piao, *Effect of Quercetin Monoglycosides on Oxidative Stress and Gut Microbiota Diversity in Mice with Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 8343052.
126. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 230s-242s.
127. Del Rio, D., et al., *Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **18**(14): p. 1818-1892.
128. Amin, I., et al., *Chapter 8 - Naringenin (4,5,7-trihydroxyflavanone) as a potent neuroprotective agent: From chemistry to medicine*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Atta ur, Editor. 2020, Elsevier. p. 271-300.
129. Yang, Y., et al., *Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms*. J Nutr Biochem, 2022. **104**: p. 108967.

130. Chao, C.-L., et al., *Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia*. Nutrition Research, 2010. **30**(12): p. 858-864.
131. Lyu, S.Y. and W.B. Park, *Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids*. Arch Pharm Res, 2005. **28**(5): p. 573-81.
132. *Naringenin*. PubChem Compound Summary for CID 439246, Naringenin 2024; Retrieved January 31, 2024]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin>.
133. Clementi, N., et al., *Naringenin is a powerful inhibitor of SARS-CoV-2 infection in vitro*. Pharmacol Res, 2021. **163**: p. 105255.
134. Jennings, A., et al., *Microbial Diversity and Abundance of Parabacteroides Mediate the Associations Between Higher Intake of Flavonoid-Rich Foods and Lower Blood Pressure*. Hypertension, 2021. **78**(4): p. 1016-1026.
135. Salehi, B., et al., *The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials*. Pharmaceuticals, 2019. **12**(1): p. 11.
136. Alberca, R.W., et al., *Perspective: The Potential Effects of Naringenin in COVID-19*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**(2477).
137. Li, B., et al., *Enhancement of naringenin solution concentration by solid dispersion in cellulose derivative matrices*. Cellulose, 2013. **20**(4): p. 2137-2149.
138. Mir, I.A. and A.B. Tiku, *Chemopreventive and Therapeutic Potential of "Naringenin," a Flavanone Present in Citrus Fruits*. Nutrition and Cancer, 2015. **67**(1): p. 27-42.
139. Patel, K., G.K. Singh, and D.K. Patel, *A Review on Pharmacological and Analytical Aspects of Naringenin*. Chin J Integr Med, 2018. **24**(7): p. 551-560.
140. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(5): p. 727-47.
141. Fuhr, U. and A.L. Kummert, *The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions?* Clin Pharmacol Ther, 1995. **58**(4): p. 365-73.
142. Liu, F., et al., *Apple Polyphenols Extract (APE) Alleviated Dextran Sulfate Sodium Induced Acute Ulcerative Colitis and Accompanying Neuroinflammation via Inhibition of Apoptosis and Pyroptosis*. Foods, 2021. **10**(11).
143. Azuma, T., et al., *Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice*. J Nutr, 2013. **143**(6): p. 827-34.
144. Al-Rejaie, S.S., et al., *Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats*. World journal of gastroenterology, 2013. **19**(34): p. 5633-5644.
145. Cao, R., et al., *Naringin Exhibited Therapeutic Effects against DSS-Induced Mice Ulcerative Colitis in Intestinal Barrier-Dependent Manner*. Molecules, 2021. **26**(21).
146. Firrman, J., et al., *Analysis of Temporal Changes in Growth and Gene Expression for Commensal Gut Microbes in Response to the Polyphenol Naringenin*. Microbiol Insights, 2018. **11**: p. 1178636118775100.
147. Chaen, Y., Y. Yamamoto, and T. Suzuki, *Naringenin promotes recovery from colonic damage through suppression of epithelial tumor necrosis factor- α*

- production and induction of M2-type macrophages in colitic mice.* Nutrition Research, 2019. **64**: p. 82-92.
148. Dou, W., et al., *Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling.* Br J Nutr, 2013. **110**(4): p. 599-608.
149. Wang, J., et al., *Naringenin Modifies the Development of Lineage-Specific Effector CD4(+) T Cells.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2267.
150. Nishimura Fde, C., et al., *Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity.* Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 795916.
151. Yasukawa, K., et al., *The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis.* Free Radic Res, 2012. **46**(12): p. 1427-36.
152. Vaghari-Tabari, M., et al., *Zinc and Selenium in Inflammatory Bowel Disease: Trace Elements with Key Roles?* Biol Trace Elem Res, 2021. **199**(9): p. 3190-3204.
153. Liu, P., et al., *Oxidative Stress and Antioxidant Nanotherapeutic Approaches for Inflammatory Bowel Disease.* Biomedicines, 2021. **10**(1).
154. Bodet, C., et al., *Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models.* J Periodontal Res, 2008. **43**(4): p. 400-7.
155. Yilma, A.N., et al., *Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for Chlamydia trachomatis inflammation.* Mediators of inflammation, 2013. **2013**: p. 102457-102457.
156. Chanet, A., et al., *Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection?* J Agric Food Chem, 2012. **60**(36): p. 8809-22.
157. Chanet, A., et al., *Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF- α -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes.* Br J Nutr, 2013. **110**(4): p. 587-98.
158. Li, Y.R., et al., *Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis.* J Nutr Biochem, 2015. **26**(12): p. 1467-78.
159. Niu, X., H. Sang, and J. Wang, *Naringenin attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by protecting the intact of blood-brain barrier and controlling inflammatory cell migration.* J Nutr Biochem, 2021. **89**: p. 108560.
160. del Cornò, M., et al., *Regulation of Dendritic Cell Function by Dietary Polyphenols.* Crit Rev Food Sci Nutr, 2016. **56**(5): p. 737-47.
161. Wang, H.K., et al., *Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl hydrocarbon receptor mediated pathway.* J Agric Food Chem, 2012. **60**(9): p. 2171-8.
162. Guo, A., et al., *Promotion of regulatory T cell induction by immunomodulatory herbal medicine licorice and its two constituents.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 14046.
163. Wang, J., et al., *Dietary naringenin supplementation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating autoimmune inflammatory responses in mice.* J Nutr Biochem, 2018. **54**: p. 130-139.

164. Amakura, Y., et al., *Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay*. *Phytochemistry*, 2008. **69**(18): p. 3117-30.
165. Vafeiadou, K., et al., *The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury*. *Arch Biochem Biophys*, 2009. **484**(1): p. 100-9.
166. Nouri, Z., et al., *On the Neuroprotective Effects of Naringenin: Pharmacological Targets, Signaling Pathways, Molecular Mechanisms, and Clinical Perspective*. *Biomolecules*, 2019. **9**(11).
167. Hua, F.Z., et al., *Naringenin pre-treatment inhibits neuroapoptosis and ameliorates cognitive impairment in rats exposed to isoflurane anesthesia by regulating the PI3/Akt/PTEN signalling pathway and suppressing NF- κ B-mediated inflammation*. *Int J Mol Med*, 2016. **38**(4): p. 1271-80.
168. Pinho-Ribeiro, F.A., et al., *The citrus flavanone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation*. *J Nutr Biochem*, 2016. **33**: p. 8-14.
169. Noori, S., et al., *Naringenin Enhances the Anti-Cancer Effect of Cyclophosphamide against MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Via Targeting the STAT3 Signaling Pathway*. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 2020. **19**(3): p. 122-133.
170. Jin, L., et al., *Naringenin Ameliorates Acute Inflammation by Regulating Intracellular Cytokine Degradation*. *J Immunol*, 2017. **199**(10): p. 3466-3477.
171. Zeng, W., et al., *Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics*. *Pharmacol Res*, 2018. **135**: p. 122-126.
172. Stevens, Y., et al., *The Intestinal Fate of Citrus Flavanones and Their Effects on Gastrointestinal Health*. *Nutrients*, 2019. **11**(7).
173. Wang, F., et al., *Four Citrus Flavanones Exert Atherosclerosis Alleviation Effects in ApoE(-/-) Mice via Different Metabolic and Signaling Pathways*. *J Agric Food Chem*, 2021. **69**(17): p. 5226-5237.
174. Wang, F., et al., *Naringin Alleviates Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice by Regulating Cholesterol Metabolism Involved in Gut Microbiota Remodeling*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020. **68**(45): p. 12651-12660.
175. Bae, E.A., M.J. Han, and D.H. Kim, *In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites*. *Planta Med*, 1999. **65**(5): p. 442-3.
176. Parkar, S.G., D.E. Stevenson, and M.A. Skinner, *The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health*. *Int J Food Microbiol*, 2008. **124**(3): p. 295-8.
177. Duda-Chodak, A., *The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota*. *J Physiol Pharmacol*, 2012. **63**(5): p. 497-503.
178. Gwiazdowska, D., et al., *The impact of polyphenols on Bifidobacterium growth*. *Acta Biochim Pol*, 2015. **62**(4): p. 895-901.
179. Basile, A., et al., *Antibacterial and allelopathic activity of extract from Castanea sativa leaves*. *Fitoterapia*, 2000. **71 Suppl 1**: p. S110-6.
180. Rabausch, U., et al., *Functional screening of metagenome and genome libraries for detection of novel flavonoid-modifying enzymes*. *Appl Environ Microbiol*, 2013. **79**(15): p. 4551-63.

181. Eichler, J., *Protein glycosylation*. *Curr Biol*, 2019. **29**(7): p. R229-r231.
182. Coutinho, P.M., et al., *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*. *J Mol Biol*, 2003. **328**(2): p. 307-17.
183. Lairson, L.L., et al., *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 521-55.
184. Ruprecht, C., et al., *High level production of flavonoid rhamnosides by metagenome-derived Glycosyltransferase C in Escherichia coli utilizing dextrans of starch as a single carbon source*. *Metab Eng*, 2019. **55**: p. 212-219.
185. *Naringenin 5-rhamnoside (N5R)*. PubChem Compound Summary for CID 131752208, Naringenin 5-rhamnoside 2022; Retrieved December 25, 2022]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin-5-rhamnoside>.
186. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 694-702.
187. Egger, B., et al., *Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency*. *Digestion*, 2000. **62**(4): p. 240-8.
188. Laroui, H., et al., *Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32084.
189. Poritz, L.S., et al., *Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis*. *J Surg Res*, 2007. **140**(1): p. 12-9.
190. Johansson, M.E., et al., *Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12238.
191. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. *Lab Invest*, 1993. **69**(2): p. 238-49.
192. Perše, M. and A. Cerar, *Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 718617.
193. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Curr Protoc Immunol*, 2014. **104**: p. 15.25.1-15.25.14.
194. Hall, L.J., et al., *Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis*. *Dig Dis Sci*, 2011. **56**(1): p. 79-89.
195. Axelsson, L.G., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice*. *Inflamm Res*, 1996. **45**(4): p. 181-91.
196. Ostanin, D.V., et al., *T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(2): p. G135-46.
197. Steinbach, E.C., G.R. Gipson, and S.Z. Sheikh, *Induction of Murine Intestinal Inflammation by Adoptive Transfer of Effector CD4+ CD45RB high T Cells into Immunodeficient Mice*. *J Vis Exp*, 2015(98).
198. Scheerens, H., et al., *Characterization of chemokines and chemokine receptors in two murine models of inflammatory bowel disease: IL-10-/- mice and Rag-2-/- mice reconstituted with CD4+CD45RBhigh T cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(5): p. 1465-74.

199. Powrie, F., et al., *Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells*. *Immunity*, 1994. **1**(7): p. 553-62.
200. Huber, S., et al., *Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 554-65.
201. Tajima, M., et al., *IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 2008. **205**(5): p. 1019-27.
202. Lahl, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease*. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 57-63.
203. Mathies, F., et al., *Colitis Promotes a Pathological Condition of the Liver in the Absence of Foxp3(+) Regulatory T Cells*. *J Immunol*, 2018. **201**(12): p. 3558-3568.
204. Berod, L., et al., *Rapid rebound of the Treg compartment in DEREK mice limits the impact of Treg depletion on mycobacterial burden, but prevents autoimmunity*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e102804.
205. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(14): p. 5126-31.
206. Esplugues, E., et al., *Control of TH17 cells occurs in the small intestine*. *Nature*, 2011. **475**(7357): p. 514-8.
207. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 869-77.
208. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. *Cytometry*, 1990. **11**(2): p. 231-8.
209. Kim, T.W., et al., *Involvement of lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(2): p. 302-5.
210. Eri, R., M.A. McGuckin, and R. Wadley, *T cell transfer model of colitis: a great tool to assess the contribution of T cells in chronic intestinal inflammation*. *Methods Mol Biol*, 2012. **844**: p. 261-75.
211. Turner, P.V., et al., *Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2011. **50**(5): p. 614-27.
212. Rodriguez-Palacios, A., M.V. Khoretonenko, and S. Ilic, *Institutional protocols for the oral administration (gavage) of chemicals and microscopic microbial communities to mice: Analytical consensus*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019. **244**(6): p. 459-470.
213. Schonkeren, S.L., et al., *An optimization and refinement of the whole-gut transit assay in mice*. *Neurogastroenterol Motil*, 2023. **35**(8): p. e14586.
214. Fonken, L.K., et al., *Light at night increases body mass by shifting the time of food intake*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(43): p. 18664-9.
215. Becker, C., M.C. Fantini, and M.F. Neurath, *High resolution colonoscopy in live mice*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): p. 2900-4.
216. Becker, C., et al., *In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy*. *Gut*, 2005. **54**(7): p. 950-4.

217. Unkeless, J.C., *Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors*. J Exp Med, 1979. **150**(3): p. 580-96.
218. Maul, J., et al., *Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1868-78.
219. Olsen, T., et al., *TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation*. Cytokine, 2011. **56**(3): p. 633-40.
220. Pedros, C., et al., *Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 974-95.
221. Xiao, H.T., et al., *Indigo Naturalis Suppresses Colonic Oxidative Stress and Th1/Th17 Responses of DSS-Induced Colitis in Mice*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 9480945.
222. Comalada, M., et al., *In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway*. Eur J Immunol, 2005. **35**(2): p. 584-92.
223. Ebino, K.Y., et al., *A simple method for prevention of coprophagy in the mouse*. Lab Anim, 1988. **22**(1): p. 1-4.
224. Grant, C.V., et al., *Manipulations of the gut microbiome alter chemotherapy-induced inflammation and behavioral side effects in female mice*. Brain Behav Immun, 2021. **95**: p. 401-412.
225. Bogatyrev, S.R., J.C. Rolando, and R.F. Ismagilov, *Self-reinoculation with fecal flora changes microbiota density and composition leading to an altered bile-acid profile in the mouse small intestine*. Microbiome, 2020. **8**(1): p. 19.
226. Radulovic, K., et al., *A dietary flavone confers communicable protection against colitis through NLRP6 signaling independently of inflammasome activation*. Mucosal Immunol, 2018. **11**(3): p. 811-819.
227. Zeng, X., et al., *Metabolite Profiling of Naringin in Rat Urine and Feces Using Stable Isotope-Labeling-Based Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. J Agric Food Chem, 2020. **68**(1): p. 409-417.
228. Jenner, A.M., J. Rafter, and B. Halliwell, *Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(6): p. 763-72.
229. Le Bras, A., *Reducing cage effects in mouse microbiome studies*. Lab Animal, 2022. **51**(7): p. 185-185.
230. Russell, A., et al., *Reduced housing density improves statistical power of murine gut microbiota studies*. Cell Reports, 2022. **39**(6): p. 110783.
231. Paigen, B., et al., *Physiological effects of housing density on C57BL/6J mice over a 9-month period*. J Anim Sci, 2012. **90**(13): p. 5182-92.
232. Lahl, K. and T. Sparwasser, *In vivo depletion of FoxP3⁺ Tregs using the DEREK mouse model*. Methods Mol Biol, 2011. **707**: p. 157-72.
233. Wang, J., et al., *Repeated Long-Term DT Application in the DEREK Mouse Induces a Neutralizing Anti-DT Antibody Response*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 1450398.
234. Camuesco, D., et al., *The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(7): p. 908-18.

235. Cruz, T., et al., *Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats*. Life Sci, 1998. **62**(7): p. 687-95.
236. Vezza, T., et al., *Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review*. Nutrients, 2016. **8**(4): p. 211.
237. Muraille, E., O. Leo, and M. Moser, *TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?* Frontiers in immunology, 2014. **5**: p. 603-603.
238. Gallo, P.M. and S. Gallucci, *The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 138.
239. Wang, L., et al., *Naringenin Enhances the Antitumor Effect of Therapeutic Vaccines by Promoting Antigen Cross-Presentation*. J Immunol, 2020. **204**(3): p. 622-631.
240. Thursby, E. and N. Juge, *Introduction to the human gut microbiota*. Biochem J, 2017. **474**(11): p. 1823-1836.

10 Danksagung

Mit tiefstem Dank möchte ich zunächst Prof. Samuel Huber würdigen, der mit seinen konstruktiven Ideen dieses Projekt in die richtige Richtung gelenkt und vorangetrieben hat. Sein Engagement und umfassender Wissensschatz haben mich dabei tief beeindruckt. Ebenso geht mein aufrichtiger Dank an Dr. Tanja Bedke, die mir nicht nur das wissenschaftliche Denken und Arbeiten näherbrachte, sondern mich bei der Durchführung der Experimente und zahlreicher Endoskopien unterstützte.

Des Weiteren gebührt mein Dank Prof. Nicola Gagliani, der durch seine kritischen Fragestellungen mein Verständnis für die relevanten Aspekte im Projekt geschärft hat. Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Johannes Herkel und Prof. Jörg Heeren für ihre wertvollen Rückmeldungen als Mitglieder meiner Betreuungskommission. Prof. Wolfgang Streit gebührt mein Dank für sein hilfreiches Feedback und seine Betrachtung der Projektergebnisse aus chemisch-biologischer Perspektive. Ich verdanke meine Aufnahme in das Graduiertenkolleg des SFB 841 mit seinem umfassenden wissenschaftlichen Angebot Prof. Giesa Tiegs.

Ich danke Dr. Mikołaj Nawrocki für die Einführung in den Laboralltag und dass er mir stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand. Seine klugen Anregungen und Hilfestellungen haben das Projekt wesentlich vorangebracht. Ebenso möchte ich mich für die Unterstützung von Dr. Friederike Stumme bedanken, die mir eine wertvolle Ansprechpartnerin war und von der ich viel gelernt habe. Sandra Wende, die mit ihrem Charme den Laboralltag bereicherte und der ich jede Frage stellen konnte, danke ich von ganzem Herzen. Ebenfalls bedanke ich mich bei Amanda, Tom, Cathy und Saskia für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente sowie bei Dr. Marius Böttcher für das histologische Scoring.

Dr. Friedericke Bönisch, Initiatorin dieses Projekts, danke ich vielmals sowie Tim Peuker für seine Hilfestellungen, insbesondere bei der Durchführung und Optimierung der zahlreichen HPLC-Messungen. Ebenfalls bedanke ich mich bei Lennart, der während unserer gemeinsamen Laborzeit zu einem Freund geworden ist. Mein Dank gebührt allen Mitgliedern der AG Huber für die großartige Arbeitsatmosphäre und die anregenden Diskussionen: Dr. Penelope Pelczar, Dr. Shiwa Soukou-Wargalla, Dr. Andres Machicote, Dr. Babett Steglich, Dr. Anastasios Giannou, Dr. Lis Velasquez, Dr. Antonella Fazio, Dr. Jöran Lücke, Dr. Mustafa Shiri, Dr. Can Ergen-Behr, Dr. Beibei Liu, Morsal Sabihi, Franziska Bertram, Rongrong Jia, Tao Zhang, Martina Corazza, Philipa Loose, Anissa Franke, Justus Neuendorff, Miriam Tomczak, Emilia Goeke, Philine Letz, Jan Kempfski, Jaana Helmuth und Francis Huber. Tiefster Dank gebührt ebenfalls der AG Gagliani, AG Adlung und AG Mittrücker.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, meinen Freunden und Bo für die tatkräftige Unterstützung und Motivation bedanken, ohne die ich nicht hier stehen würde.

11 Erklärung des Eigenanteils

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe für Intestinale Immunregulation an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin) unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. med. Samuel M. Huber angefertigt. Eine weitere wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch Dr. rer. nat. Tanja Bedke. Die Konzeption und Planung dieser Arbeit erfolgten in Zusammenarbeit und im regelmäßigen Austausch mit den genannten Betreuenden.

Alle Experimente und Daten, die nicht von mir allein durchgeführt und erhoben wurden, sind hier aufgeführt: Die Entwicklung von N5R erfolgte durch Constantin Ruprecht, Dr. rer. nat. Friedericke Bönisch, Dr. Nele Ilmberger, Tanja V. Heyer, Dr. Erhard T.K. Haupt, Prof. Dr. Wolfgang Streit und Dr. Ulrich Rabausch am Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie sowie am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg. Für die HPLC-Analysen war Tim Peuker am Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie der Universität Hamburg verantwortlich. Die Kleintierendoskopie wurde von Dr. rer. nat. Tanja Bedke bzw. Dr. Penelope Pelczar mit meiner Assistenz durchgeführt. Die Organentnahme und Zellisolation führte ich teilweise mit Unterstützung von Dr. rer. nat. Tanja Bedke, Dr. Mikołaj Nawrocki, Sandra Wende, Cathleen Haueis, Amanda Pidgornij, Tom Blankenburg oder Saskia Großhauser durch. Die histologische Aufarbeitung des Kolongewebes erfolgte durch mich oder durch das Institut für Pathologie am UKE. Das endoskopische Kolitis-Scoring wurde durch Dr. Marius Böttcher angefertigt. Das Zell-Sorting erfolgte durch die Cytometry und Cell Sorting Core Facility am UKE.

Sämtliche übrigen experimentellen Arbeiten, Datenerhebungen und -auswertungen sowie die Abbildungsanfertigungen habe ich selbstständig durchgeführt. Ebenso habe ich alle statistischen Auswertungen eigenständig durchgeführt. Die Dissertation habe ich selbstständig verfasst. Darüberhinausgehende Hilfsmittel oder Quellen wurden nicht benutzt.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, 23.07.2025

Unterschrift:

The image shows a handwritten signature in black ink. The signature is written in a cursive, flowing style. The first name 'Loreen' is written in a larger, more prominent script, and the last name 'Fleus' follows in a similar but slightly smaller script. The overall appearance is that of a personal, handwritten signature.