

**Untersuchung des Einflusses der Mikrobiota auf
morphogenetische Signalwege und der Auswirkung
auf Proliferation, Morphologie und Permeabilität im
Dünndarm adulter C57BL/6J-Mäuse**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Laura Bettina Kollar

geb. in Frankfurt am Main

Mainz, 2017

Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin Mainz

und

Institut für Chemie, Pharmazie und Biochemie -Therapeutische Lebenswissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.2017

...für meine Familie

Eidesstattliche Versicherung

für das Gesuch um Zulassung zur Promotion in dem Fachbereich 09 der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

Hiermit versichere ich gemäß § 10 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 24.07.2007

Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten
Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben. Ich habe oder hatte
die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder
andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht

Ort, Datum

Laura Bettina Kollar

Abstract

The mammalian gastrointestinal tract harbors a highly diverse microbial ecosystem with at least 1000 bacterial species that co-habit the intestinal tract. The gut microbiota plays a major role in postnatal adaptation of the small intestinal architecture, but the underlying microbiota-induced signaling cues are poorly understood. Colonization of germ-free mice (GF) with an enteric microbiota induces tissue remodeling and changes dramatically the small intestinal architecture. Here, we show that the morphogenetic Hedgehog and Bone Morphogenetic signaling is microbiota-dependent and used from microbiota to adapt proliferation, goblet cell differentiation, morphology and permeability of the distal intestine. Furthermore, we identified the pattern recognition receptor Toll-like receptor 2 (TLR2) as a regulator of the morphogenetic signaling. These results advance the understanding of the microbiota-dependent adaptation of the small intestinal architecture. Here, we present the first evidence of the interplay between morphogenetic and immunological signaling cues triggered by the microbiota that integrate and transmit *outside world*-signals along the villus-crypt axis, influencing the proliferation and the morphology in the small intestinal mucosa. During intestinal dysbiosis or a functional receptor mutation, the morphogenetic signaling pathways are changed, contributing to tumor development. Therefore, it is important to take these signaling interplays into account for developing tumor intervention strategies.

Zusammenfassung

Der Säugetierdarm beherbergt eine hohe Diversität an Mikroorganismen. Ungefähr 1000 verschiedene Bakterienspezies werden in diesem mikrobiellen Ökosystem gefunden, das in seiner Gesamtheit als intestinale Mikrobiota bezeichnet wird. Diese spielt eine entscheidende Rolle in der Adaption der Dünndarmmorphologie. Die dieser Adaption zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nicht aufgeklärt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die morphogenetischen Hedgehog (Hh)- und Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Signalwege Mikrobiota-abhängig reguliert sind und so einen direkten Einfluss auf die Proliferation, die Becherzell-Differenzierung, die Morphologie sowie die Barrierefunktion im distalen Dünndarm haben. Toll-Like Rezeptor 2 (TLR2) wurde als ein Mustererkennungsrezeptor identifiziert, der die Mikrobiota-abhängigen Hh- und BMP-Signale reguliert und so die Villusmorphologie und Proliferation steuert. Diese Befunde erweitern das Verständnis über die physiologische Rolle der kommensalen Mikrobiota bei der Adaption der Dünndarmhomeostase. Das hier erstmalig aufgezeigte Mikrobiota-abhängige Zusammenspiel morphogenetischer und immunologischer Signalwege in Epithelzellen macht deutlich, dass diese gemeinsam Signale der ‚Außenwelt‘ (Mikrobiota) entlang der Villus-Krypt-Achse integrieren und übertragen und so die Morphologie und Proliferation des Dünndarmgewebes steuern. Im Fall einer Dysbiose oder einer funktionellen Rezeptormutation könnten die dadurch bedingten Veränderungen der morphogenetischen Signalwege zur Krebsentstehung beitragen. Somit ist es wichtig bei der Entwicklung geeigneter Interventionsstrategien zur Bekämpfung von Darmkrebs die Interaktionen der Mikrobiota-abhängigen Signaltransduktionen zu berücksichtigen.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Relevanz.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	2
2.1 Aufbau des Dünndarms	2
2.2 Stammzellnische und die epitheliale Linie	4
2.2.1 Enterozyten	5
2.2.2 Becherzellen	7
2.3 Mikrobiota-Besiedlung des Intestinaltraktes	8
2.3.1 Mikrobiota und Antibiotika	10
2.3.2 Gnotobiotische Tierhaltung	11
2.4 Toll-like Rezeptoren.....	12
2.4.1 Der MyD88-abhängige Signalweg (TLR ₁ , TLR ₂ , TLR ₄ , TLR ₆)	14
2.4.2 Der MyD88-unabhängige Signalweg (TLR ₄).....	14
2.4.3 Endotoxin-Toleranz	15
2.4.4 Toll-like Rezeptoren als Krebstarget.....	16
2.5 Signaltransduktionsmechanismen der Epithelzellhomeostase im Dünndarm	16
2.5.1 Hedgehog-Signaltransduktionsweg	17
2.5.2 Bone Morphogenetic Protein-Signalweg	18
2.5.3 Kanonischer Wnt-Signalweg.....	20

2.5.4	Morphogenetische Signalwege und Krebs.....	22
3	Kenntnisstand	23
4	Zielsetzung.....	25
5	Mäuse, Material und Methoden	26
5.1	Mauslinien	26
5.2	Geräte.....	26
5.3	Software	29
5.4	Verbrauchsmaterial	29
5.5	Kits.....	30
5.6	Puffer.....	31
5.7	Chemikalien.....	32
5.8	Antikörper.....	35
5.9	Primer.....	35
5.9.1	Genotypisierungsprimer	35
5.9.2	qPCR-Primer.....	36
5.10	Methoden	37
5.10.1	Mäuse	37
5.10.2	Genotypisierung	38
5.10.3	Antibiotika-Behandlung von Mäusen.....	39
5.10.4	Vismodegib-Behandlung von Mäusen	39
5.10.5	Purmorphamin-Behandlung von Mäusen	39
5.10.6	FITC-Dextran-Gabe.....	40

5.10.7	Entnahme von Mausgeweben.....	40
5.10.8	RNA-Extraktion aus Darmgewebe	41
5.10.9	Reverse Transkription/cDNA-Synthese	41
5.10.10	Quantitative Echtzeit-PCR	42
5.10.11	Entnahme von Mausgeweben für Paraffinhistologien.....	43
5.10.12	Periodic Acid/Schiff Reaktion (PAS)-Färbung:.....	43
5.10.13	Histologie-Analyse des Mausdarms	43
5.10.14	Western Blot	44
6	Ergebnisse und Diskussion	46
6.1	Die Besiedlung mit einer intestinalen Mikrobiota beeinflusst die Villusmorphologie	46
6.2	Besiedlung mit Mikrobiota erhöht die Proliferationsrate und steuert die Differenzierung in Becherzellen	49
6.3	Mikrobiota beeinflusst die Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signaltransduktion.....	54
6.4	Inhibierung und Aktivierung des Hedgehog-Signalweges verändert die Villusmorphologie in adulten Mäusen	57
6.5	Toll-like Rezeptor 2 bestimmt die Adaption der Villusmorphologie.....	62
6.6	Toll-like Rezeptor 2 wirkt auf Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion.....	64
6.7	Die Mikrobiota prägt den Villusabstand und reguliert die Proliferation und die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge über Toll-like Rezeptor 2 im distalen Dünndarm	67
6.8	Der Mikrobiota-regulierte Hedgehog-Signalweg beeinflusst die Barrierefunktion des distalen Dünndarmepithels.....	71

7	Fazit	76
8	Ausblick.....	78
9	Annex.....	80
10	Lebenslauf.....	83
11	Literatur	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Aufbau des Dünndarms (a) und einer Villusstruktur (b) ³⁵	2
Abbildung 2.2 Differenzierung von Stammzellen in intestinale Zelltypen ⁴²	5
Abbildung 2.3 Darstellung der Tight und Adherens Junctions in polaren Enterozyten ⁴⁹	7
Abbildung 2.4 Zusammensetzung und Verteilung der intestinalen Mikrobiota ⁷²	9
Abbildung 2.5 Signalwege der Toll-like Rezeptoren ¹⁰¹	15
Abbildung 2.6 Hedgehog-Signalweg. a Inaktiver Zustand des Hedgehog-Signaltransduktionsweges und b aktiver Zustand des Hedgehog-Signaltransduktionsweges	18
Abbildung 2.7 Bone Morphogenetic Protein-Signalweg	19
Abbildung 2.8 Wnt-Signalweg. a Inaktiver und b aktiver Wnt-Signalweg	20
Abbildung 2.9 Zusammenhang des Hh-, BMP- und Wnt-Signaltransduktionsweges entlang einer Villusstruktur ¹¹²	21
Abbildung 5.1 Auswertungsschema Histologie	44
Abbildung 6.1 Mikrobielle Kolonisierung induziert Veränderungen in der Villusmorphologie.	47
Abbildung 6.2 Durch mikrobielle Kolonisierung induzierte Veränderungen in der Villusmorphologie, gesteigerte Zellproliferation und erhöhte Differenzierung in Becherzellen	51
Abbildung 6.3 Mikrobielle Besiedlung beeinflusst Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signaltransduktion	56
Abbildung 6.4 Hedgehog-Signalweg-Inhibierung induziert Veränderungen in der Villusmorphologie, steigert die Zellproliferation und erhöht die Differenzierung in Becherzellen	59

Abbildung 6.5 Hedgehog-Signalweg-Aktivierung induziert Veränderungen in der Villusmorphologie und verringert die Zellproliferation	61
Abbildung 6.6 Toll-like Rezeptor 2 ist maßgeblich an der Adaption der Villusmorphologie beteiligt und beeinflusst die Proliferation.	63
Abbildung 6.7 Toll-like Rezeptor 2 beeinflusst Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion.....	65
Abbildung 6.8 Mikrobiota prägt den Villusabstand und reguliert die Proliferation über Toll-like Rezeptor 2 im distalen Dünndarm	67
Abbildung 6.9 Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signaltransduktion bleiben im keimfreien Zustand durch Tlr2-Defizienz unverändert	69
Abbildung 6.10 Der Mikrobiota-abhängige Hedgehog-Signalweg beeinflusst die Permeabilität im distalen Dünndarm	72
Abbildung 9.1 Hedgehog mRNA-Array	80
Abbildung 9.2 Sequenzdaten von konventionell-aufgewachsenen Wildtyp und Tlr2 ^{-/-} C57BL/6J Mäusen.....	81
Abbildung 9.3 Muc2 mRNA Expression in keimfreien (GF) und konventionell-aufgewachsenen (CONV-R) C57BL/6J Mäusen.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Charakteristika von keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell- aufgewachsenen Mäusen ⁹⁰	12
Tabelle 2.2 Toll-like Rezeptoren, deren bakterielle Liganden und die Herkunft der Liganden ⁹¹	13
Tabelle 5.1 Mauslinien.....	26
Tabelle 5.2 Geräte.....	28
Tabelle 5.3 Software	29
Tabelle 5.4 Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 5.5 Kits.....	30
Tabelle 5.6 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen	32
Tabelle 5.7 Chemikalien	35
Tabelle 5.8 Antikörper.....	35
Tabelle 5.9 Genotypisierungsprimer	35
Tabelle 5.10 qPCR Primer.....	37
Tabelle 5.11 Pipettierschema Genotypisierung (B6.129-Tlr2<tm1Kir>/J)	38
Tabelle 5.12 Genotypisierungsprotokoll.....	39
Tabelle 5.13 Pipettierschema cDNA-Synthese	41
Tabelle 5.14 cDNA-Synthese Protokoll	41
Tabelle 5.15 Pipettierschema quantitative PCR.....	42
Tabelle 5.16 Programm quantitative PCR	42

Abkürzungsverzeichnis

bHLH	Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren
BMP ₄	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP ₇	Bone Morphogenetic Protein 7
BMPR ₁	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor 1
BMPR ₂	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor 2
CONV-D	<i>Conventionally-derived</i> , kolonisierte keimfreie Mäuse
CONV-R	<i>Conventionally-raised</i> , konventionell-aufgewachsene Mäuse
Dhh	Desert Hedgehog
DTT	Dithiothreitol, 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Natrium-Dextran-Sulfat
ENS	Enterisches Nervensystem
EtOH	Ethanol
Fcgbp	Fc- γ -binding-Proteine
FITC-Dex	Fluorescein isothiocyanat-dextran
for	<i>forward</i>
GDC	GDC-0449, Vismodegib, Hedgehog-Signalweg-Inhibitor
GF	<i>Germ-free</i> , keimfrei
Gli ₁	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 1

Gliz	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 2
Gli3	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 3
Hes	Hairy/Enhancer of Split Transkriptionsfaktoren
Hh	Hedgehog
HIP/PAP	Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated Protein, antimikrobielles Peptid
ID3	<i>Inhibitor of Differentiation 3</i> , BMP-Zielgen
IgA	Immunglobulin A
Ihh	Indian Hedgehog
IL-6	Interleukin-6
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
LTA	Lipoteichonsäure, TLR2/TLR4-Agonist
LPS	Lipopolysaccharid, TLR4-Agonist
MD2	Lymphocyte antigen 96, Tlr4-Korezeptor
MM	Mastermix
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> , Tlr-Adaptermolekül
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAS	Periodic Acid/Schiff-Reagenz
PKC	Protein Kinase C, Serin/Threonin Kinase

PLGF	Placental Growth Factor
PURM	Purmorphamin, Hedgehog-Signalweg-Aktivator
Ptch-1	Patched-1
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
RELM β	Resistin-ähnliche Moleküle β
rev	<i>reverse</i>
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i> , kurzkettige Fettsäuren
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts
Shh	Sonic Hedgehog
Si5	<i>Small intestine</i> -Segment 5, Dünndarmsegment 5
SMAD	<i>Similar to Mothers Against Decapentaplegic homolog</i> , Wachstumsfaktor
Smo	<i>Smoothened</i>
SuFu	<i>Supressor of Fused</i>
TFF ₃	<i>Trefoil Factor 3</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter- inducing interferon-β</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i> , TLR- Adaptormolekül
TLR ₁	Toll-like Rezeptor 1
TLR ₂	Toll-like Rezeptor 2

TLR ₄	Toll-like Rezeptor 4
TLR6	Toll-like Rezeptor 6
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
WT	Wildtype
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

1 Relevanz

Ein ausgeprägtes Interesse gilt in den letzten Jahren die Erforschung der Interaktionen zwischen intestinaler Mikrobiota und deren Wirt. Es häufen sich fundierte wissenschaftliche Beweise, dass die intestinale Mikrobiota mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Diabetes mellitus (Typ I und Typ II), Adipositas, Atherosklerose, Allergien, Depressionen, Autismus und chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie kolorektalen Tumoren in Verbindung steht.¹⁻¹⁵ Die Rolle der Mikrobiota spielt nicht nur in wissenschaftlichen Fachkreisen eine anhaltend größer werdende Rolle, sondern auch die Öffentlichkeit ist, aufgrund der immer weitreichenderen Volkskrankheiten Adipositas und Krebs, gesundheitspolitisch und volkswirtschaftlich an dieser Thematik interessiert.¹⁶⁻²²

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit. 8,8 Millionen Menschen starben 2012 an Krebs; dies entsprach knapp einem Sechstel aller weltweiten Todesfälle, und man zählte rund 14 Millionen Neuerkrankungen. Zu den häufigsten Krebsarten bei Frauen zählen Brustkrebs, Lungenkrebs sowie Darmkrebs. Bei Männern stellen Prostatakrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs die häufigsten Krebserkrankungen dar. Gerade Lunge und Darm sind Organe, die ständig in Interaktion mit Bakterien aus der Umgebung stehen.²³ In kolorektalen Tumorgeweben sind zudem morphologische Veränderungen sowie Änderungen der Permeabilität des betroffenen Gewebes zu beobachten²⁴⁻²⁶. In bereits vorliegenden Arbeiten wird die Mikrobiota mit Unterschieden in Dünndarmmorphogenese sowie einer veränderten Permeabilität in Zusammenhang gebracht²⁷⁻³¹.

Im gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht (Homöostase) zwischen der Proliferation und der Apoptose von Zellen. Bei einer Krebserkrankung ist dieses Gleichgewicht zugunsten der Zellproliferation verschoben. Unsere Gruppe konnte bereits 2014 zeigen, dass der Einfluss einer intestinalen Mikrobiota die Zellproliferation im distalen Darmgewebe beeinflusst³². Bisher ist jedoch ungeklärt, über welche Mechanismen die Mikrobiota auf die Proliferation wirkt und welche Auswirkungen eine veränderte Mikrobiota-abhängige Proliferation in Bezug auf die Dünndarmmorphologie darstellt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Aufbau des Dünndarms

Der beim Menschen zwischen drei und fünf Metern lange Dünndarm ist Teil des Gastrointestinaltraktes und gliedert sich in drei Abschnitte (Duodenum, Jejunum und Ileum). Im Dünndarm findet der größte Anteil des enzymatischen Nahrungsaufschlusses von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen sowie die Resorption von Nährstoffen und Wasser statt. Zudem stellt der Dünndarm einen Teil des körpereigenen Abwehrsystems dar. Die Epithelzellen des Dünndarms sind sehr teilungsaktiv, was zur Folge hat, dass sich die Epithelschicht alle 24-72 Stunden vollständig erneuert.³³

Der Aufbau des Dünndarms folgt in allen drei Abschnitten einem allgemeingültigen Prinzip. Das Lumen des Dünndarms wird durch eine Epithelschicht begrenzt, deren Oberfläche durch verschiedene strukturelle Merkmale stark vergrößert ist. Makroskopisch erkennt man quergestellte Schleimhautfalten, die sogenannten Kerckringfalten (**Abbildung 2.1 a**), die etwa $\frac{2}{3}$ des Umfangs der Duodenalwand ausmachen und zum Ileum hin flacher werden.^{33,34}

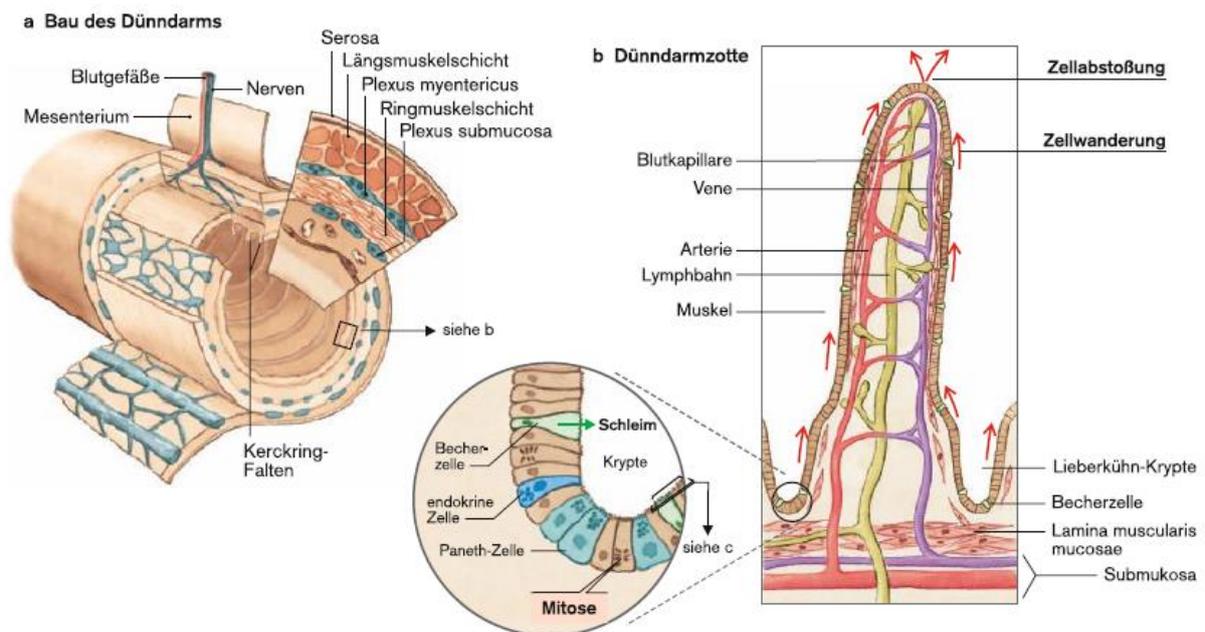


Abbildung 2.1 Aufbau des Dünndarms (a) und einer Villusstruktur (b)³⁵

Wie in **Abbildung 2.1 b** dargestellt, weisen auf mikroskopischer Ebene viele der Epithelzellen apikale Mikrovilli auf und das Epithel ist zu Krypten eingestülpt bzw. zu Zotten ausgestülpt (Villusstrukturen, *Villi intestinales*). Die Funktion der *Villi intestinales* gewährleistet die effektive Resorption von Nährstoffen aus dem Darmlumen. Das Gerüst einer solchen Villusstruktur besteht aus einer lockeren Bindegewebsschicht (*Lamina muscularis mucosae*), in der sich einzelne glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, ein oder mehrere Arteriolen, eine zentrale Venole sowie Lymphkapillaren befinden. Letztere dienen dem Fetttransport via Chylomikronen nach deren Resorption. An der Basis eines *Villus intestinales* münden kurze, schlauchförmige Drüsen, die Lieberkühn-Krypten, die die sogenannte Stammzellnische tragen, welche verantwortlich für die Regeneration des Darms ist. Die *Lamina epithelialis mucosae* wird von einem hochprismatischen Epithel gebildet, in dem verschiedene Zelltypen aus den Stammzellen gebildet werden – die epitheliale Linie. Bei der Zellteilung entstehen aus den Stammzellen unter anderem Enterozyten, die einen Anteil von 80-90% der Epithelzellen ausmachen. Sie tragen einen Mikrovillisaum. An diesem Saum befinden sich zahlreiche membranständige Enzyme, die für den Abbau von Kohlenhydraten und Peptiden zuständig sind. Weitere epitheliale Zelltypen stellen die enteroendokrinen Zellen dar. Es gibt 12 Unterarten von enteroendokrinen Zellen³⁶ und sie machen einen prozentualen Anteil <1% der Gesamtepithelzellen aus. Sie steuern durch Sekretion von Peptidhormonen die Sekretionsraten von Magen und Pankreas sowie die Kontraktion der Gallenblase. Zudem differenzieren Stammzellen in Becherzellen (Anteil 5-10%) und Panethzellen (Anteil ~5%). Die Becherzellen sezernieren Mucine, die zum einen als Gleitfilm für den Speisebrei wirken, zum anderen das Epithel vor der Wirkung der Verdauungsenzyme schützen. Zusätzlich sind Becherzellen eine Komponente des Immunsystems. Der sezernierte Mucus enthält verschiedene Moleküle, die mit Bakterien interagieren, beispielsweise Immunglobulin A (IgA). IgA bindet an Bakterien oder Viren, bildet mit diesen ein Aggregat und immobilisiert so die Pathogene^{37,38}. Ein neuer funktioneller immunologischer Aspekt der Becherzellen ist der intraluminale Antigentransport zu dendritischen Zellen (GAPs, *goblet cell-associated antigen passages*) in der Lamina propria³⁹. Die Panethzellen liegen im Fundus der Lieberkühn-Krypten und enthalten Lysozym sowie Enzyme für den Abbau von Fetten und Proteinen und sezernieren Defensine, antimikrobielle Peptide, die der Viren und Bakterienabwehr dienen^{40, 33,34,41}.

2 Theoretische Grundlagen

Die der *Lamina muscularis mucosae* folgende Schicht, eine weitere lockere Bindegewebsschicht (*Submucosa*), trägt größere Gefäße und kleinere Drüsen. Zwei angrenzende Muskelschichten (Ring- und Längsmuskelschicht) bilden die *Muscularis* und sind für die Motilität und Peristaltik des Dünndarms zuständig. Die Ringmuskelschicht ist umgeben von *Plexus myentericus* und *Plexus submucosa*, welche Teile des Enterischen Nervensystems (ENS) sind. Begrenzt wird das Organ durch eine Schicht Bindegewebe, der *Serosa* (**Abbildung 2.1 a**).^{33,34}

2.2 Stammzellnische und die epitheliale Linie

In der Basis eines *Villus intestinalis* enden kurze, schlauchförmige Drüsen, die Lieberkühn-Krypten, die die sogenannte Stammzellnische tragen. Aus den Krypten eines *Villus intestinalis* wird der kontinuierliche Selbsterneuerungsprozess des Darms gewährleistet: pro Krypte werden täglich bis zu 250 neue Epithelzellen gebildet⁴². Die Vorläuferzellen, aus denen Epithelzellen hervorgehen, bezeichnet man als pluripotente intestinale Stammzellen. Stammzellen produzieren eine Population an stark proliferierenden Zellen, die sogenannten Transient-amplifizierenden Zellen, die mehrere Zellteilungszyklen durchlaufen und am oberen Rand der Krypte in verschiedene Zelltypen zu differenzieren beginnen (**Abbildung 2.2**). Hierbei bilden sich zum einen spezialisierte epitheliale Zelltypen (absorbierende Enterozyten, sezierende Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Tuftzellen), die entlang der Krypt-Villus-Achse auswandern und zum anderen Panethzellen, die in der Kryptbasis verbleiben (**Abbildung 2.2**). Man unterscheidet zwischen der sekretorischen Linie (Becherzellen, Panethzellen, enteroendokrine Zellen und Tuftzellen) und der absorbierenden Linie (absorbierende Enterozyten).

Die Zusammensetzung und Verteilung der epithelialen Zellen wird von parakrinen Signalwegen des Epithels und Mesenchyms bestimmt⁴³. Zum einen steuern der Hedgehog- und der Bone Morphogenetic Protein-Signalweg (**Kapitel 2.5**) die Proliferation in der Stammzellnische, zum anderen unterliegen die pluripotenten intestinalen Stammzellen den Wnt- sowie Notch-Signalen, die über die Differenzierung in sekretorische oder absorbierende Zelllinien entscheiden.

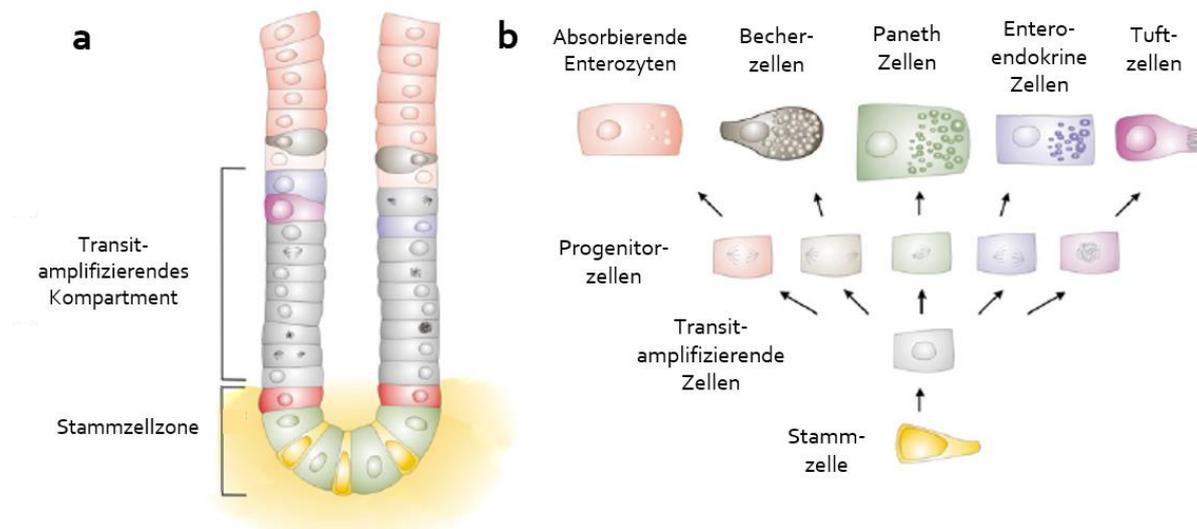


Abbildung 2.2 Differenzierung von Stammzellen in intestinale Zelltypen ⁴²

Dargestellt sind **a** die Kryptbasis bestehend aus Stammzellzone und dem Transient-amplifizierenden Kompartiment sowie **b** die Differenzierungsmöglichkeiten von Stammzellen in die absorbierende oder sekretorische Linie.

Die Steuerung der Differenzierung wird über ein komplexes Netzwerk an Spezifikationsfaktoren gesteuert ^{26,44,45}. Der Notch-Signalweg ist essentiell, um die Homeostase der Krypten aufrechtzuerhalten. Wird der Notch-Signalweg ausgeschaltet, resultiert dies in einer Umwandlung aller epithelialen Progenitorzellen in Becherzellen ⁴⁶.

2.2.1 Enterozyten

Enterozyten bilden selektive Barrieren zwischen Geweben und verschiedenen Kompartimenten. Sie sind polarisiert und besitzen eine apikale und eine basolaterale Domäne (**Abbildung 2.3**). Enterozyten erfüllen wichtige Funktionen während des Verdauungsprozesses. Sie übernehmen die Aufnahme von Ionen, Wasser, Nährstoffen, Vitaminen und absorbieren unkonjugierte Gallensäuren. Neben diesen Funktionen erfüllen Enterozyten weitaus vielfältigere Aufgaben im Darm. Sie spielen eine Rolle bei der Entwicklung der immunologischen Toleranz des Wirts gegenüber Nahrung und mikrobiellen Antigenen. Zudem regulieren Enterozyten über die auf ihrer Oberfläche exprimierten Toll-like Rezeptoren das immunologische Gleichgewicht im Darm. Sie entscheiden zwischen Toleranz gegenüber mikrobiellen Antigenen oder der Auslösung eines Entzündungsprozesses (**Kapitel 2.4**). ^{47,48}

2 Theoretische Grundlagen

Zudem tragen Enterozyten direkt zur Abwehr von Pathogenen bei. Neben den Panethzellen exprimieren Enterozyten antimikrobielle Peptide, wie β -Defensine und HIP/PAP (*hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein*). Die Expression dieser antimikrobiellen Peptide wird durch die Toll-like Rezeptoren reguliert, welche auf der Oberfläche der Enterozyten exprimiert werden (**Kapitel 2.4**).^{47,48}

Darüber hinaus regulieren die Enterozyten die Permeabilität der Darmbarriere über die *Tight Junction* Proteine.^{47,48}

2.2.1.1 *Junction* Proteine – Regulatoren der Darmpermeabilität

Epithelzellen werden durch Verbindungsstellen, den sogenannten *Junction* Proteinen, zusammengehalten. Diese interzellularen *Junction* Proteine stellen neben adhesiven Funktionen auch die Schlüsselkomponenten für die Permeabilitätsregulation des Darms dar. Die *Tight Junctions* umspannen die Epithelzellen extrazellulär an der apikalen Seite (**Abbildung 2.3**) und formen eine selektiv-permeable Diffusionsbarriere, die die Permeabilität des Gewebes reguliert. Im Darm ist diese für die luminale Nährstoffaufnahme, die Sekretion von Abfallprodukten und besonders für die Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Haushalts wichtig. Verdauungsprozesse, die durch Bakterien und Verdauungsenzymen übernommen werden, lysieren nicht alle Bestandteile der Nahrung vollständig in einzelne Aminosäuren. Kleine Proteinmengen werden durch die Enterozyten aufgenommen und anschließend im Lysosom der Zellen gespalten. Der *Tight Junction* Proteinkomplex bildet eine Barriere, die Moleküle, die größer als 500 Da sind, nicht passieren können, um das intestinale Lumen vor mikrobiellen Antigenen zu schützen. Moleküle, die kleiner als 500 Da sind, sind normalerweise nicht immunogen.⁴⁷⁻⁴⁹

Fettleibigkeit, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und die Entwicklung von kolorektalem Krebs scheinen mit einer verstärkten Permeabilität der Darmbarriere einher zu gehen⁵⁰⁻⁵⁶.

In Säugetieren beinhaltet der *Junction* Proteinkomplex von Epithelzellen *Gap Junctions*, *Desmosome*, *Adherens Junctions*, *Tight Junctions* oder *Zonula Occludens* (ZO). Die *Adherens Junctions*, *Tight Junctions* und ZO werden als epithelialer *junctional* Komplex bezeichnet. Wie in **Abbildung 2.3** dargestellt, verschnürt dieser die benachbarten Epithelzellen miteinander

(,kissing point“) und verhindert dadurch die freie Bewegung von Membrankomponenten und gewährleistet so neben der gebildeten Diffusionsbarriere die Aufrechterhaltung der Zellpolarität von Epithelzellen. ^{49,55,56}

Die Hauptklassen der *Tight Junction* Proteine stellen die Klasse der Claudine und Occludin dar. *Adherens Junctions* und *Desmosome* sind intrazellulär an Actin- und Intermediärfilamente gebunden und festigen die Zellen mechanisch. Die Hauptklasse der *Adherens Junctions* stellen die Cadherine dar. ⁴⁹

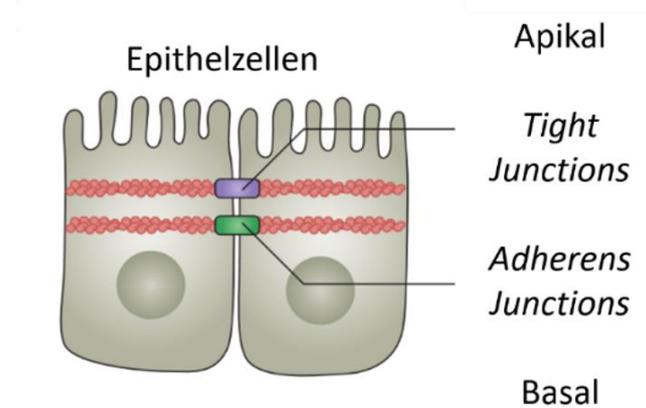


Abbildung 2.3 Darstellung der *Tight* und *Adherens Junctions* in polaren Enterozyten ⁴⁹

2.2.2 Becherzellen

Becherzellen gehören der sekretorischen Linie der Epithelzellen an und werden beim Menschen schon früh in der Embryonalentwicklung gebildet (9.-10. Schwangerschaftswoche). Der prozentuale Anteil an Becherzellen pro Villusstruktur steigt vom Duodenum zum distalen Kolon von 4% auf 16% an; vergleichbar mit der Bakteriendichte und -diversität im Darm (**Kapitel 2.3**). In keimfreien Mäusen wurden weniger und dünnere Becherzellen gefunden als in konventionell-aufgewachsenen Mäusen, was auf eine Mikrobiota-induzierte Regulation der Becherzellen schließen lässt. ⁵⁷⁻⁶⁰ Becherzellen tragen zum Schutz der Epithelzellschicht im Darm bei. Sie sezernieren sekretorische Mucine (z.B. MUC₂), bioaktive, membrangebundene Mucine (z.B. MUC₁, MUC₃, MUC₁₇), Trefoil Faktor-Peptid 3 (TFF₃), Resistin-ähnliche Moleküle β (RELM β) und Fc- γ -binding-Proteine (Fcgbp) ⁵⁷.

2 Theoretische Grundlagen

Durch die Verlinkung von TFF, Fcgbp und einem Trimer aus MUC2 wird die Viskosität der Mucusschicht im Dünndarm reguliert. Die kommensale Darmmikrobiota (**Kapitel 2.3**) kann nur in die weniger viskosen Mucusschichten vordringen und so wird die Epithelschicht vor Bakterien geschützt.⁵⁷

Trefoil Faktor 3 wird von intestinalen Becherzellen exprimiert. Podolsky et. al 2009 zeigten den protektiven Effekt von TFF3 auf das intestinale Epithelgewebe im DSS-induzierten Entzündungsmodell⁶¹. Vermutlich ist der protektive Effekt von TFF3 auf deren Fähigkeit zur Regulation der *Tight junction* Proteine Occludin und Zona-Occludens₁ und die damit verbundene Steuerung der Permeabilität des Darmepithels zurückzuführen (**Kapitel 2.6**)^{62,63}.

2.3 Mikrobiota-Besiedlung des Intestinaltraktes

Als intestinale Mikrobiota bezeichnet man die Summe aller Bakterien und Mikroorganismen, die im Darm angesiedelt sind. Der menschliche Darm beherbergt mehr Mikroorganismen und Bakterien als der menschliche Körper Zellen aufweist und wird auf eine Anzahl von 10^{14} beziffert. Dies entspricht einem Gewicht von 1,5-2 kg Biomasse⁶⁴. Es wurden etwa 1200 verschiedene Bakterienspezies in der menschlichen Darmmikrobiota identifiziert, wobei jedes Individuum mindestens 600 dieser Bakterienspezies im Darm trägt⁶⁵⁻⁶⁹. Die fünf Hauptstämme stellen *Clostridien*, *Firmicuten*, *Actinobakterien*, *Proteobakterien* und *Verrucomicrobia* dar. Das bakterielle Genom des Mikrobioms kodiert rund die 500-fache Anzahl an Genen im Vergleich zum menschlichen Genom; das intestinale Mikrobiom stellt somit ein hochkomplexes System, einen Superorganismus, mit einer Vielfalt verschiedener Funktionen für den Wirtsorganismus dar.^{1,70}

Die Zusammensetzung der Mikrobiota variiert stark entlang des Dünndarms^{71,72}. Während die Diversität und Quantität der Bakterien im Duodenum und Jejunum gering ist, steigen diese entlang des Dünndarms an und erreichen im Dickdarm die maximale Diversität und Quantität. Der Dickdarm von Säugetieren stellt das am dichtesten besiedelte mikrobielle Ökosystem dar⁷².

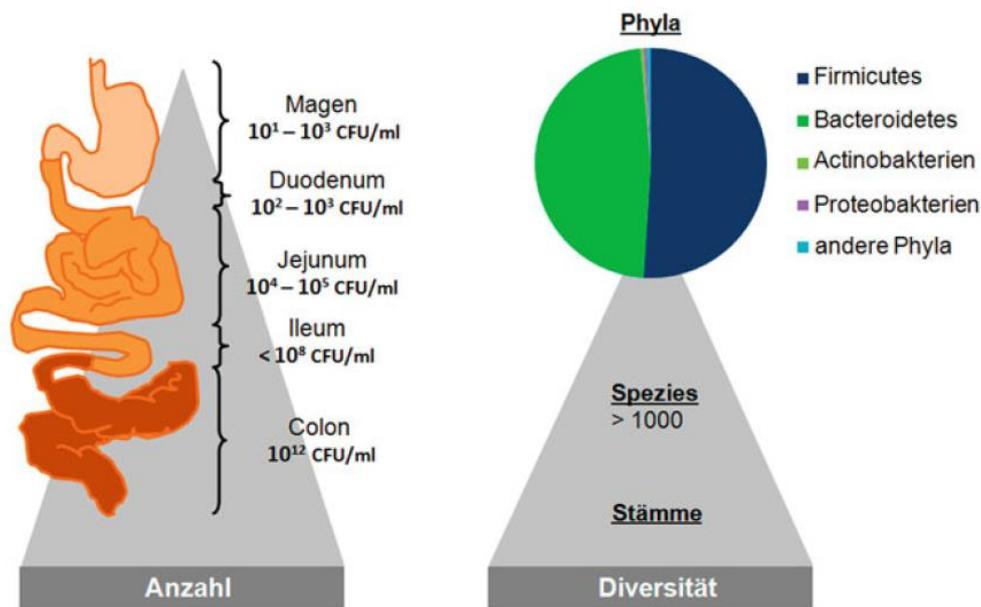


Abbildung 2.4 Zusammensetzung und Verteilung der intestinalen Mikrobiota ⁷²

Die individuelle Zusammensetzung der Mikrobiota lässt sich auf Umwelteinflüsse und genetische Faktoren zurückführen. Die Zusammensetzung und Funktionalität der intestinalen Mikrobiota wird wesentlich durch Faktoren wie Geburtsvorgang, Ernährung, Gesundheitszustand, Lebensumfeld und Medikamentation (vor allem Antibiotika) geprägt. Diese Faktoren üben einen entscheidenden Einfluss auf die Bakteriendiversität des Gastrointestinaltraktes aus. ^{1,70,72}

Die Funktionen der Mikrobiota wurden vor allem in Experimenten mit keimfreien Tieren verdeutlicht ³⁰. Hierbei stellte sich heraus, dass die intestinale Mikrobiota nicht nur eine wichtige Rolle bei der Prävention gastrointestinaler Infektionen spielt, sondern zudem die Entwicklung der Darmmorphologie, Darmbarriere und des Immunsystems entscheidend beeinflusst. Auch die Nährstoffversorgung und die Regulation metabolischer Funktionen werden durch die intestinale Mikrobiota moduliert. ⁷²⁻⁷⁸

In einem gesunden Organismus also führen unzählige Interaktionen zwischen der intestinalen Mikrobiota und dem Wirt nachweislich zu einer für beide Seiten vorteilhaften Koexistenz (Mutualismus). Die dauerhaft präsente intestinale Mikrobiota wird immunologisch toleriert, während Pathogene bei einer Infektion effektiv eliminiert werden können. ^{1,72} Die Aufrechterhaltung dieses Zustands erfordert ein Gleichgewicht zwischen den

2 Theoretische Grundlagen

einzelnen Bakteriengemeinschaften und dem intestinalen Epithel (Homeostase). Ist die Homeostase nachhaltig gestört, kommt es zu einer Dysbiose, einer veränderten Konstellation der intestinalen Mikrobiota im Darm. Eine Dysbiose steht nach den aktuellen Erkenntnissen mit Dysbiose-assoziierten Krankheiten wie Diabetes, Reizdarmsyndrom, Darmkrebs und Adipositas, aber auch Alzheimer, Autismus und Atherosklerose in Zusammenhang.^{1-11,70,79,80}

Die Resilienz einer gesunden Mikrobiota schützt den Wirt vor Dysbiose-assoziierten Krankheiten. Das komplexe Ökosystem der intestinalen Mikrobiota besitzt die Fähigkeit zur Regeneration nach externen Störungen dieses Ökosystems durch beispielsweise Infektionen durch Pathogene oder Antibiotika-Einnahme. Diese Fähigkeit wird als Resilienz-Phänomen bezeichnet.⁸¹

2.3.1 Mikrobiota und Antibiotika

Antibiotika werden zur prophylaktischen und kurativen Behandlung potentiell lebensbedrohlicher Bakterieninfektion eingesetzt. In den westlichen Gesellschaften scheint die weitverbreitete Anwendung von Antibiotika ein hauptsächlicher Faktor für die veränderte Zusammensetzung der Mikrobiota. Viele Studien belegen, dass die Einnahme von Antibiotika eine verminderte Diversität, Quantität und Verteilung der mikrobiellen Gemeinschaften im Darm zur Folge haben. Obwohl sich der Großteil der Mikroflora nach Antibiotika-Einnahme erholte, konnten sich einige Bakterienarten nicht regenerieren. Zudem konnten vermehrt Bakterienstämme durch Sequenzierung nachgewiesen werden, die vor Einnahme der Antibiotika in geringen oder nicht detektierbaren Maße vorkamen. Ein kurzer Eingriff in die Homeostase des Darms, bedingt eine Langzeitveränderung der Mikrobiota des Wirts. Diese Langzeitveränderungen der Mikrobiota müssen nicht zwangsweise eine Dysbiose zur Folge haben, können diese jedoch begünstigen. Liegt ein dysbiotischer Zustand vor, kann durch das erneute Eingreifen in das mikrobielle Ökosystem die Manifestation einer Dysbiose-assoziierten Krankheit auftreten.⁸¹⁻⁸³

Während einer Antibiotikaeinnahme treten Mikrobiota-regulierte Veränderungen der immunologischen Abwehrfunktionen des Epithels auf. So verringern Antibiotika die Mucusschicht und die Expression antimikrobieller Peptide. Dies könnte einen engeren

Kontakt der kommensalen Bakterien mit dem Epithel bewirken und so die Stimulation des Immunsystems durch bakterielle Liganden (**Kapitel 2.4**) heraufsetzen.⁸²

Da keimfreie Mäuse (**Kapitel 2.3.2**) für einen Großteil der Wissenschaftler jedoch nicht zugänglich sind, werden häufig Antibiotika-behandelte konventionell-aufgewachsene Mäuse als Modellsystem verwendet, um die Interaktionen zwischen intestinaler Mikrobiota und Wirt zu studieren. Auch wenn durch die Antibiotikagabe stets nur eine Dezimierung und eine verringerte Diversität der Mikrobiota und nicht der keimfreie Zustand erreicht werden kann, weisen Antibiotika-behandelte konventionell-aufgewachsene Tiere einen Phänotypen auf, der mit keimfreien Mäusen in vielerlei Hinsicht vergleichbar ist⁸⁴. Auf jeden Fall müssen in diesem Modellsystem immer potentielle Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit eines Experiments und die Antibiotika-abhängigen Veränderungen einiger Genexpressionsmuster miteinbezogen werden⁸⁵.

2.3.2 Gnotobiotische Tierhaltung

Eine Tierhaltung wird als gnotobiotisch bezeichnet, wenn die mikrobiologische und insbesondere die bakterielle Besiedlung der Versuchstiere genau bekannt ist. Somit werden keimfreie und assoziierte Gnotobioten unterschieden⁸⁶.

Als keimfreies Tier wird ein Tier bezeichnet, welches frei von Bakterien, Viren und Pilzen - also absolut steril - aufgezogen und gehalten wird. Diese Sterilität des Organismus macht das keimfreie Modell zu einem guten Instrument, um die Zusammenhänge zwischen Wirt und Mikrobiota zu erforschen. Bereits Louis Pasteur (1822-1895) regte die Aufzucht von keimfreien Organismen an. 1895 generierten Nuttall und Thierfelder in Berlin die ersten keimfreien Meerschweinchen. Die erste keimfreie Mauszucht wurde von Pleasants 1959 an der Privatuniversität Notre Dame in Indiana (USA) etabliert. Heute werden keimfreie Tiere durch aseptische Hysterektomie⁸⁷ oder mittels Embryotransfer⁸⁸ generiert. Seit den ersten Untersuchungen dieser Tiere lehrt uns die Gnotobiologie, dass es wesentliche Unterschiede zwischen keimfreien (GF, *germ-free*) und konventionell-aufgewachsenen (CONV-R, *conventionally-raised*) Tieren gibt.

Die ersten Untersuchungen zu den Mikrobiota-abhängigen Unterschieden zwischen GF und CONV-R Mäusen wurden 1963 vorgenommen²⁸. Reinhardt C. et al. konnten 2012 den

2 Theoretische Grundlagen

Einfluss der Mikrobiota auf die Vaskularisierung des Dünndarms zeigen ³¹. Die wichtigsten Unterschiede sind im Folgenden tabellarisch dargestellt ^{2,28,29,31,89}.

Morphologische Charakteristika	Physiologische/ Biochemische Charakteristika	Immunologische Charakteristika
Größe Blinddarm 	Darmbeweglichkeit 	Größe Lymphknoten 
Gewicht Darmwand 	Proliferation 	Größe Peyer's Patches 
Darmlumenoberfläche 	pH-Wert Darminhalt 	Anzahl T-Zellen 
Vaskularisierung 	Sauerstoffmenge 	Entzündungsparameter (z.B. Zytokine) 
Villuslänge 	Herzauswurfvolumen 	Mucusschicht 
Dicke Lamina propria 	Blutfluss in Darm und Leber 	
Größe Leber 	Vitamin B und K 	
Größe Herz 	Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) 	
Größe Nebennieren 	<u>KEINE</u> Umwandlung von Gallensäure im Darm	

Tabelle 2.1 Charakteristika von keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell-aufgewachsenen Mäusen ⁹⁰

Assoziierte Gnotobioten hingegen sind Tiere, die mit einem genau bekannten Bakterienspektrum besiedelt werden. Die Flora (*minimal defined microbial consortium*), die für die Assoziierung eingesetzt wird, umfasst häufig nur wenige Bakterienspezies. Je nach Anzahl dieser werden assoziierte Gnotobioten als mono-, di- oder triassozierte Tiere bezeichnet. ⁸⁶

2.4 Toll-like Rezeptoren

Tiere sind konstant einer Vielzahl von Mikroorganismen aus ihrer Umgebung ausgesetzt. Allein der Gastrointestinaltrakt beherbergt Milliarden von kommensalen Bakterien, die mit dem Wirtsorganismus interagieren ^{1,72}. Hierbei ist es für den Wirt wichtig zwischen Freund und Feind, also zwischen Pathogenen und Kommensalen (Apathogenen), zu unterscheiden. Diese Aufgabe erfüllt im Säugetier das angeborene Immunsystem.

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Triacyllipopeptide	Bakterien und Mycobakterien
TLR2	Lipoproteine Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Glykoinositolphospholipide Glykolipide Zymosan	Verschiedene Pathogene Gram-positive bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Tryanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> Pilze
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Fibrinogen Hitzeshock-Proteine 60 und 70	Gram-negative Bakterien Pflanzen Wirt Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyllipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	Mykoplasmen Bakterien Pilze
TLR7	Einsträngige RNA	Viren
TLR8	Einsträngige RNA	Viren
TLR9	CpG-enthaltene DNA	Bakterien und Viren
TLR10	noch zu ermitteln	noch zu ermitteln
TLR11	Profilin-ähnliche Proteine	<i>Toxoplasma gondii</i> Uropathogene
TLR12	Profilin	<i>Toxoplasma gondii</i>

Tabelle 2.2 Toll-like Rezeptoren, deren bakterielle Liganden und die Herkunft der Liganden ⁹¹

Das angeborene Immunsystem erkennt Mikroorganismen über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*), den Toll-like Rezeptoren (TLRs). Toll-like Rezeptoren erkennen konservierte mikrobielle Komponenten, die sogenannten '*Pathogen-Associated Molecular Patterns*' (PAMPs, Pathogen-assoziierte molekulare Muster), die essentiell für das Überleben des Mikroorganismus sind. Toll-like Rezeptoren werden von vielen Zelltypen exprimiert, beispielsweise von Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, B- und T-Zellen, aber auch von Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen. Gegenwärtig sind in *Mus musculus* 12 verschiedene Toll-like Rezeptoren bekannt. Jeder der PRR erkennt verschiedene PAMPs und aktiviert entsprechend andersgeartete Signaltransduktionswege,

2 Theoretische Grundlagen

die spezifische antipathogene Immunantworten auslösen. Für eine Übersicht der Toll-like Rezeptoren und deren Liganden soll die **Tabelle 2.2** dienen.

Die Rezeptoren liegen in den genannten Zelltypen intra- (TLRs 3, 7, 8, 9) oder extrazellulär (TLRs 1, 2, 4, 5, 6) vor. Die Expression von TLRs ist nicht statisch, sondern ein schneller, dynamischer Prozess als Antwort auf Pathogene, Zytokine oder oxidativen Stress.⁹¹⁻⁹⁵

Da in dieser Arbeit ein Hauptaugenmerk auf die Interaktion zwischen intestinaler Mikrobiota und dem Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) liegt, werden im Folgenden die Signalkaskaden der extrazellulär-exprimierten Toll-like-Rezeptoren beleuchtet (TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6). TLR1 und 6 sind Korezeptoren des TLR2. Im Gegensatz zu TLR2 nutzt TLR4 neben dem MyD88-abhängigen auch den MyD88-unabhängigen Signalweg.

2.4.1 Der MyD88-abhängige Signalweg (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6)

Wie in **Abbildung 2.5** dargestellt, tritt das Adapterprotein MyD88 nach der Interaktion von TLRs und PAMPs mittels seiner TIR-Domäne mit der TIR-Domäne des TLRs in Wechselwirkung. Über seine N-terminale ‚Todesdomäne‘ (diese wurde zuerst bei Proteinen gefunden, die in Apoptoseprozesse involviert sind) bindet und aktiviert MyD88 die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase 4 (IRAK 4), was eine Phosphorylierung von IRAK 1 zur Folge hat. Anschließend bilden IRAK 1 und IRAK 4 einen Komplex mit TRAF 6 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 6). Über nachfolgende komplexbildende Prozesse wird letztlich der in den Zellen ruhende Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear Faktor ,kappa-light chain enhancer‘ of activated B-Cells*) aktiviert und kann im aktivierten Zustand in den Zellkern translokieren und die Transkription von Genen inflammatorischer Zytokine (*Tumor-Nekrose-Faktor- α* (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6)) induzieren. TNF- α und IL-6 sind für die Regulation von Immunantwort, Entzündungsreaktion, Zellproliferation und Apoptose von großer Bedeutung.⁹¹⁻⁹⁹

2.4.2 Der MyD88-unabhängige Signalweg (TLR4)

Tlr4 bindet spezifisch mit dem Korezeptor MD2 an Lipopolysaccharid (LPS). Für das Downstream-Signal werden zwei Signalwege aktiviert. Zum einen erfolgt die NF- κ B-Aktivierung und die damit verbundene Aktivierung inflammatorischer Zytokine über den beschriebenen MyD88-abhängigen Signalweg. Andererseits wird über den MyD88-

unabhängigen Signalweg, mittels der vorhandenen TRIF-Domäne (*TIR-domain-containing adapter inducing interferon- β* (TRIF)) des TLR4-Rezeptors die späte NF- κ B-Aktivierung eingeleitet. Dies erfolgt über die endosomale TRIF- und TRAM-Rekrutierung und Signalweiterleitung, die über IRF3 in der Type I Interferon-Induktion (IFN) mündet. IFN ist ein wichtiger Regulator des Immunsystems (**Abbildung 2.5**).⁹¹⁻¹⁰⁰

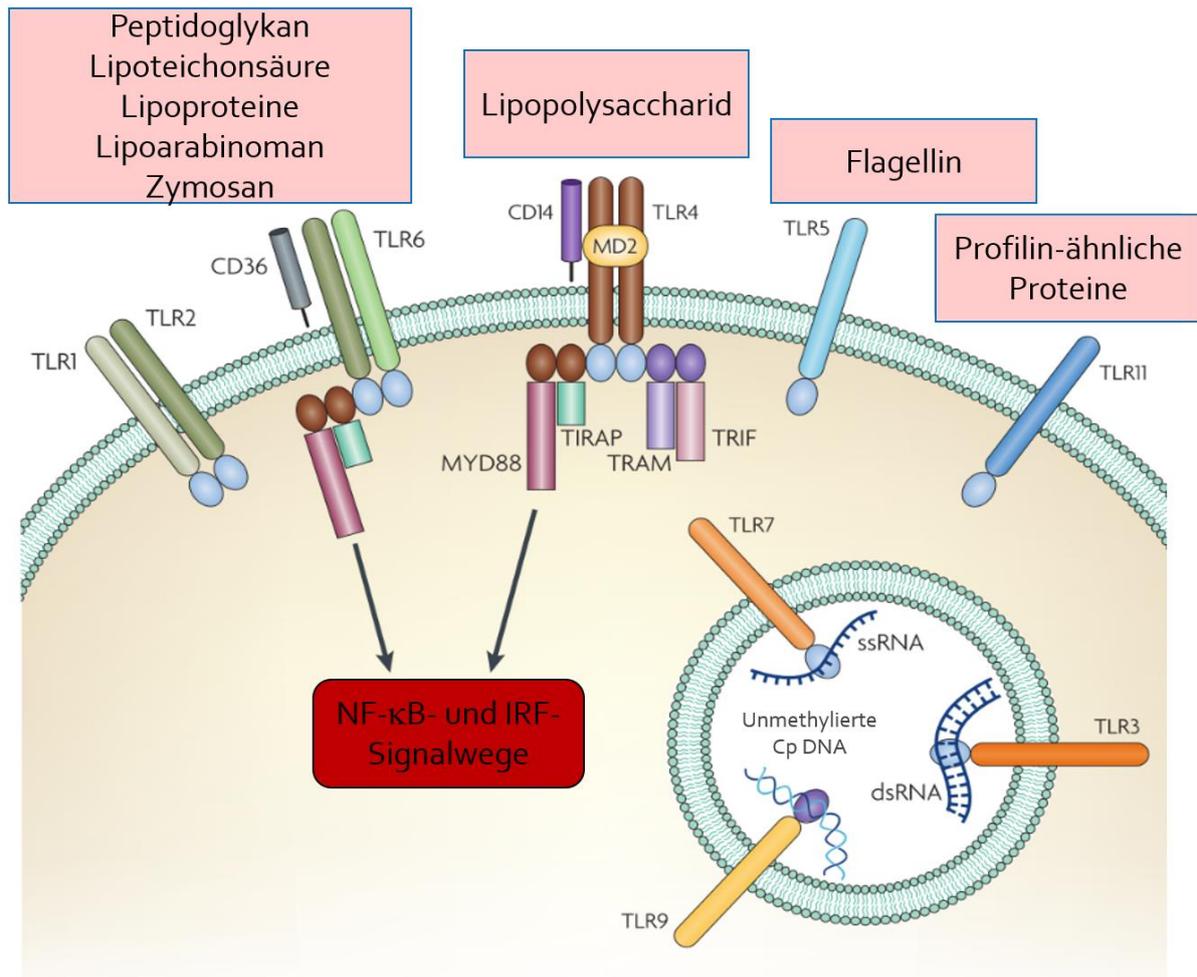


Abbildung 2.5 Signalwege der Toll-like Rezeptoren¹⁰¹

2.4.3 Endotoxin-Toleranz

Durch die Mustererkennung bakterieller Liganden initiieren die Toll-like Rezeptoren die angeborene Immunität. Nur Minuten nach dem Eindringen, werden Pathogene durch Makrophagen, Granulozyten oder natürlichen Killerzellen, die Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind, erkannt und angegriffen. Diese Entzündungsreaktion muss engmaschig kontrolliert werden, damit unkontrollierte Entzündungsreaktionen nicht zu klinischen

2 Theoretische Grundlagen

Komplikationen wie Sepsis oder Autoimmunkrankheiten führen. Einen wichtigen Mechanismus zum Schutz vor unkontrollierten Entzündungsreaktionen stellt die Endotoxin-Toleranz dar. Eine gewisse Toleranz gegenüber mikrobiellen Bestandteilen ist für die Aufrechterhaltung der Homeostase im Darm unbedingt notwendig, da das Epithel in ständigen Kontakt mit den TLR-Liganden der Mikrobiota steht.

In den 70er Jahren wurde erstmals beobachtet, dass Mäuse, die zunächst einer geringen Dosis Endotoxin und anschließend einer Lethalen ausgesetzt waren, eine deutlich geringere Mortalität aufwiesen. Die Vorbehandlung mit nicht letalen LPS-Dosierungen scheinen den Organismus vor einer potentiell tödlichen Hyperinflammation, die durch einen nachgeschalteten LPS-Stimulus ausgelöst werden könnte, zu schützen. Dieses Phänomen wird als Endotoxin-Toleranz bezeichnet.^{102,103} Lotz et. al. zeigten 2006 das erste Mal die postnatale Entwicklung einer LPS-Toleranz als Epithelzell-spezifischen Prozess¹⁰⁴.

2.4.4 Toll-like Rezeptoren als Krebstarget

In den letzten Jahren wurden in Toll-like Rezeptoren Polymorphismen identifiziert, die die zelluläre Immunantwort und Zytokinproduktion *in vitro* verändern. Zusätzlich geben genetische Studien Hinweise darauf, dass bestimmte TLR-Polymorphismen mit der Sukzeptibilität für diverse Immunerkrankungen assoziiert sind. Werden chronisch inflammatorische Antworten durch TLR-Agonisten ausgelöst, könnte dies die weitere Entwicklung eines entstandenen Tumors begünstigen. So sind mögliche Strategien einer Manipulation der TLR-Expression durchaus vorstellbar.^{101,105-109} Aus Tierversuchen ist inzwischen klar, dass Toll-like Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese, der Proliferation und der Metastasenbildung spielen. Gleichzeitig benötigt es weitere Untersuchungen, um zu verstehen, über welche Schalter der TLR-Polymorphismus mit dem verbundenen Risiko einer Krebsentstehung oder der Protektion vor malignen Tumoren assoziiert ist.¹¹⁰

2.5 Signaltransduktionsmechanismen der Epithelzellhomeostase im Dünndarm

Das Dünndarmepithel besteht aus einer einzigen Schicht Epithelzellen, die zum einen Wasser und Nährstoffe aufnimmt, zum anderen die Hauptschutzbarriere darstellt, um das

Eindringen der großen Vielfalt an Mikroorganismen, die im Dünndarmlumen angesiedelt sind, zu verhindern. Unter gleichbleibenden Bedingungen im Dünndarm ist die Erneuerungsrate ausdifferenzierter Epithelzellen bemerkenswert stabil. Die Balance zwischen ausdifferenzierten Zellen und proliferierenden Zellen ist ein dynamisches Gleichgewicht (Homeostase) und wird über die Proliferation und Differenzierung von adulten Stammzellen eingestellt. Während einer Entzündung oder einer Verletzung des Epithels, expandiert das Stammzellkompartiment, um den Zellverlust auszugleichen. Dies hat eine Erhöhung der Proliferationsrate zur Folge^{111,112}. Der Ersatz von abgestorbenen Zellen scheint jedoch nicht die Hauptursache erhöhter Proliferation zu sein. Die Erneuerung des Dünndarmepithels beugt durch die erhöhte Proliferation von Zellen einer Besiedlung mit Parasiten und dem Eindringen von Mikroorganismen vor. Um die Homeostase im Dünndarm aufrecht zu erhalten und somit die Proliferation zu regulieren, existieren eine Reihe von Signaltransduktionsmechanismen, die die Erneuerung der epithelialen Linie aus den Stammzellen in den Krypten steuern.

2.5.1 Hedgehog-Signaltransduktionsweg

In Säugetieren findet man drei Hedgehog-Gene (Hh): Indian hedgehog (Ihh), Sonic hedgehog (Shh) und Desert hedgehog (Dhh). Diese werden als 45 kDa-große Vorläufer-Proteine von Zellen synthetisiert, anschließend proteolytisch gespalten und posttranslational Lipid-modifiziert, um die aktiven 19 kDa-großen Signalmoleküle zu generieren. Wie in **Abbildung 2.6 a** dargestellt, inhibiert der 12-spännige Transmembranrezeptor Patched (Ptch), den 7-spännigen Transmembranrezeptor Smoothed (Smo) im Ruhezustand. Dieser wiederum verhindert die Ubiquitinierung des Proteins Suppressor of Fused (SuFu), das die Glioblastoma Transkriptionsfaktoren (Gli) Gli1, Gli2 und Gli3 bindet und diese so vom Translokieren in den Zellkern abhält. Werden die aktiven Hedgehog-Signalmoleküle sekretiert (**Abbildung 2.6 b**), binden sie an den Rezeptor Ptch, der durch die Bindung eine Konformationsänderung erfährt und demgemäß seine inhibitorische Wirkung auf den Rezeptor Smo verliert. Smo erfährt dadurch ebenfalls eine Konformationsänderung und verliert seine inhibitorische Wirkung auf SuFu, das nun ubiquitiniert und abgebaut wird. Die Glioblastoma Transkriptionsfaktoren können nun ungehindert in den Zellkern translokieren und die Hedgehog-Zielgene transkribieren.^{113,114}

2 Theoretische Grundlagen

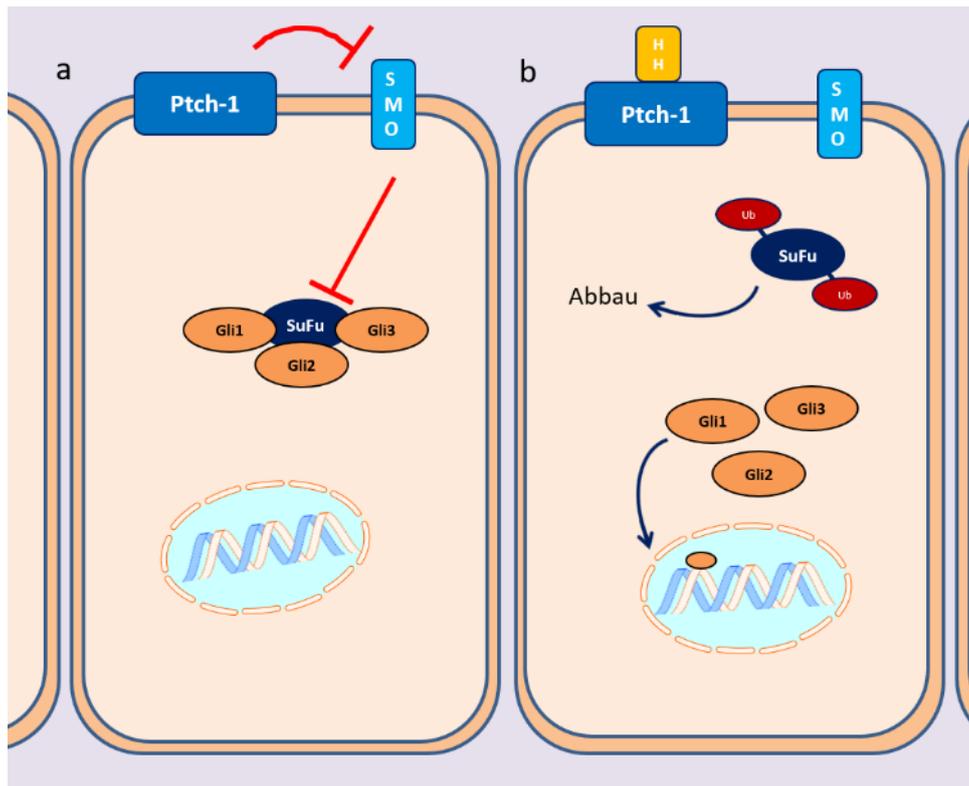


Abbildung 2.6 Hedgehog-Signalweg. a Inaktiver Zustand des Hedgehog-Signaltransduktionsweges und b aktiver Zustand des Hedgehog-Signaltransduktionsweges

Ihh gilt im adulten Organismus als Hauptkomponente des Hedgehog-Signalweges. Es wird im Epithel des Dünndarms und im Dickdarm produziert. Shh hingegen ist schwer detektierbar und das Vorkommen ist auf die Krypten in Dün- und Dickdarm begrenzt. Daher wird vermutet, dass Shh nur einen geringen Einfluss auf die Homeostase adulter Gewebe hat.^{115,116} Die drei Glioblastoma Transkriptionsfaktoren können bei der Signaltransduktion als Aktivator oder Repressor wirken. Gli1 und Gli2 wirken aktivierend¹¹⁷⁻¹¹⁹, während Gli3 repressiv wirkt¹²⁰. Ein Expressionsausfall von Ihh führt zu einem Verlust der Homeostase im Darm und einer erhöhten Villusneubildung¹²¹.

2.5.2 Bone Morphogenetic Protein-Signalweg

Bone Morphogenetic Proteine (BMPs) sind parakrine Signalmoleküle und gehören zur *Transforming Growth Factor- β* (TFG- β)–Superfamilie. Bisher sind 20 verschiedene BMPs bekannt. Sie werden in ihrer aktiven Form sekretiert und binden als Dimere an ihren Rezeptor-Komplex. Der Rezeptor ist ein transmembraner Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor, der durch die Bindung im Zellinneren ein rezeptorassoziiertes SMAD (SMAD 1, SMAD 5 oder

SMAD 8) phosphoryliert¹²². Dieses phosphorylierte SMAD bildet mit SMAD 4 einen Komplex, der in den Zellkern transloziert und die Zielgene des BMP-Signalweges aktiviert (beispielsweise *Inhibitor of Differentiation*; ID₃).¹²³ Der Signalweg wird in **Abbildung 2.7** schematisch dargestellt.

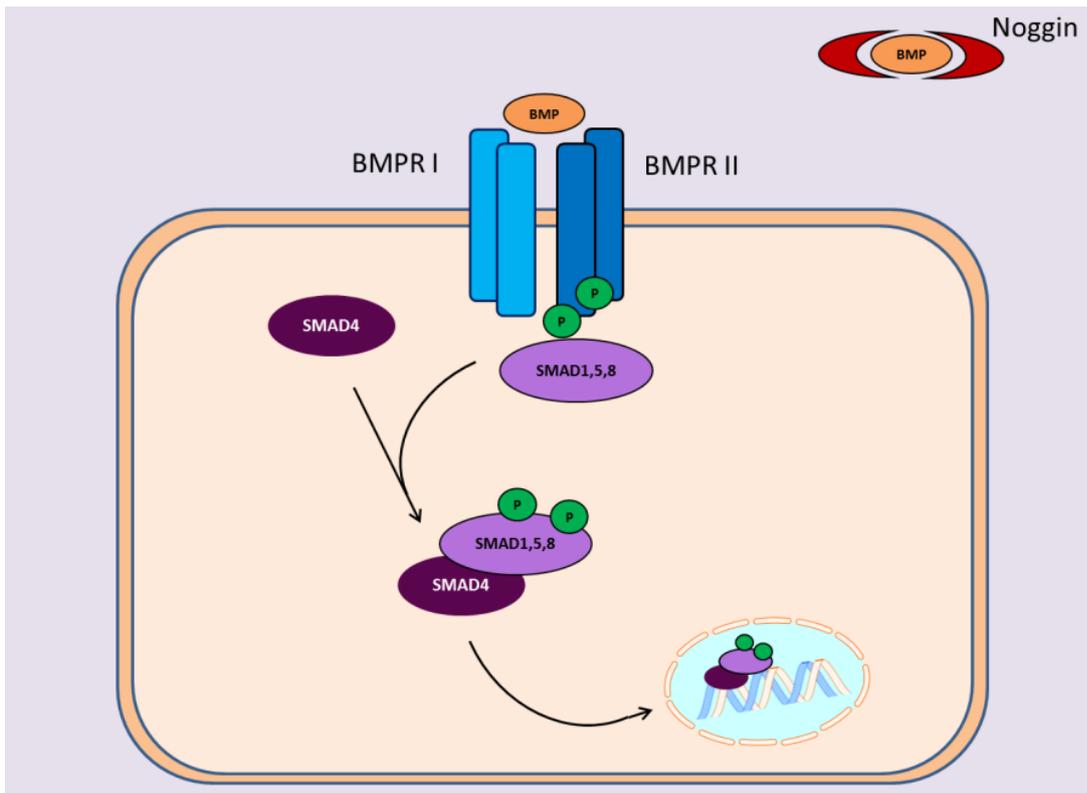


Abbildung 2.7 Bone Morphogenetic Protein-Signalweg

2 Theoretische Grundlagen

Die BMPs und ihre Rezeptoren werden in Epithelzellen (BMP2) sowie Mesenchymzellen (BMP4, BMP7) exprimiert, während BMP-Antagonisten (z.B. Noggin, Gremlin) vorrangig im Mesenchym zu finden sind.^{122,124} Die BMPs spielen bei der embryonalen Darmentwicklung eine herausragende Rolle¹²⁵, ein Knockout im adulten Organismus hat einen Verlust der Homeostase im Darm und eine Villusfehlbildung zur Folge¹²⁶.

2.5.3 Kanonischer Wnt-Signalweg

Dieser Signalweg ist nach seinem Liganden Wnt benannt, ein Signalprotein, das als lokaler Mediator eine wichtige Funktion bei der Entwicklung verschiedener tierischer Zellen einnimmt. Wnt setzt sich zusammen aus *Wingless* (Wg) und Int-1. Die Bezeichnung *Wingless-type* stammt aus Beobachtungen mit der Taufliege *Drosophila melanogaster*, in der Mutationen des *wingless*-Gens zu einer flügellosen Variante der Fliegen führen. Das Int-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression durch die Integration des Maus-Mammatumovirus (MMTV), einem Retrovirus, in der Nähe des *int1*-Gens aktiviert wird.

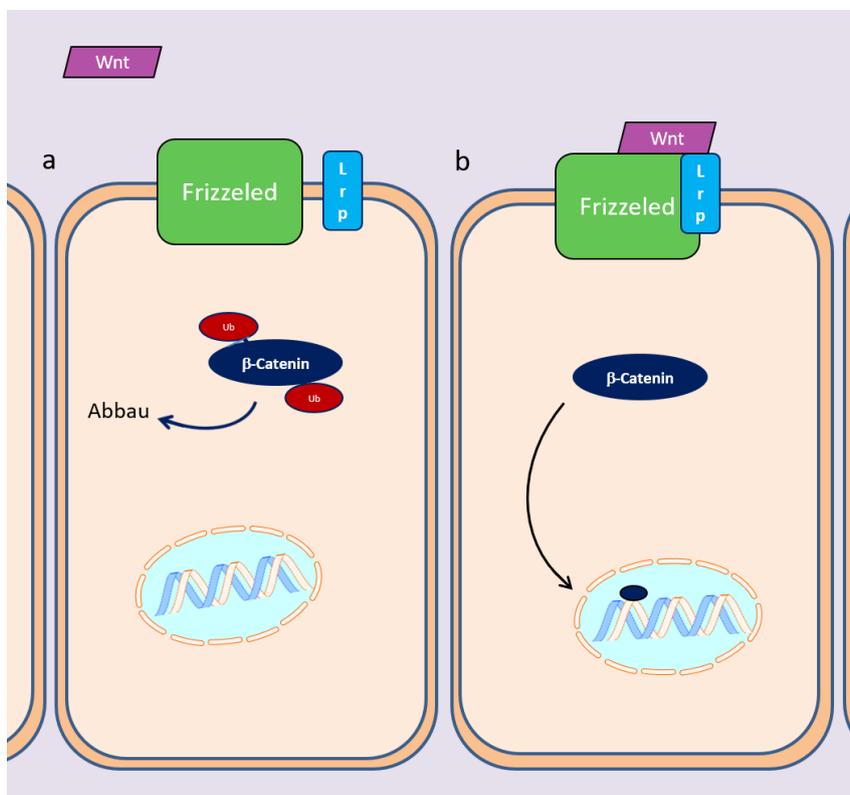


Abbildung 2.8 Wnt-Signalweg. a Inaktiver und b aktiver Wnt-Signalweg

Wnts sind hochkonservierte sekretorische Proteine mit einer Größe von 40 kDa, die über den Transmembranrezeptor Frizzled und dessen Korezeptor, einem *Lipoprotein receptor-related protein* (Lrp), binden und so die Signalkaskade in das Zellinnere übertragen. Bindet Wnt an den Rezeptorkomplex, hat dies zur Folge, dass β -Catenin vor der Ubiquitinierung und dem anschließenden proteasomalen Abbau geschützt ist, somit in den Zellkern translokieren kann und die Zielgene transkribiert (**Abbildung 2.8**). Diese wiederum aktivieren die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen im adulten Darm. ¹²⁷

Der Hedgehog- und der Bone Morphogenetic Protein-Signalweg werden als negative Feedbackmechanismen der Expansion der epithelialen Linie im Darm beschrieben. Sie wirken vom Epithel über das Mesenchym inhibierend auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg (**Abbildung 2.9**) in der Kryptbasis. ¹¹²

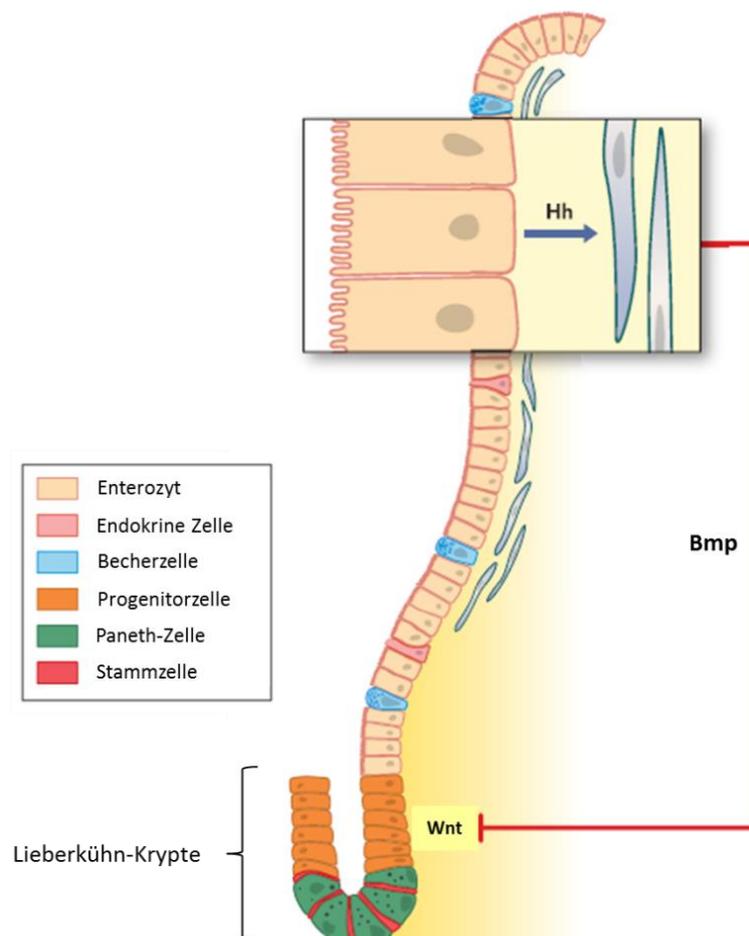


Abbildung 2.9 Zusammenhang des Hh-, BMP- und Wnt-Signaltransduktionsweges entlang einer Villusstruktur ¹¹²

2.5.4 Morphogenetische Signalwege und Krebs

Neuste Arbeiten weisen darauf hin, dass die beschriebenen Entwicklungssignalwege eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von kolorektalen Tumoren spielen. ¹²⁸⁻¹³⁰

Nach dem Tumorprogressions-Modell (*multistep carcinogenesis model*) ¹³¹ kommt es durch eine Vielzahl von Veränderungen zur Aktivierung von Oncogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in Epithelzellen des Darms. Schrittweise entstehen so aus gesunden Zellen des Darmepithels durch Akkumulation von Mutationen und konstanten epigenetischen Veränderungen maligne transformierte Tumorzellen. Hierbei scheinen vor allem eine veränderte intestinale Mikrobiota und entzündliche Darmerkrankungen einen konstanten schädlichen Einfluss auf das Epithel auszuüben und so bei der Krebsentstehung mitzuwirken ^{80,132-137}. Eine Vielzahl an Hinweisen unterstützt inzwischen die Theorie von Krebsstammzellen, die 1997 zuerst aufgestellt wurde ^{138,139}. Krebsstammzellen besitzen typischen Stammeigenschaften wie Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierungspotential aus Progenitorzellen und scheinen für das Tumorstadium maßgebend zu sein ^{140,141}. Zudem wird vermutet, dass Krebsstammzellen gegen einige Krebstherapien resistent sind. Sie werden deshalb für Rückfälle und Metastasenbildung verantwortlich gemacht. In kolorektalen Tumoren sind viele Vertreter des Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signalweges im Vergleich zum homeostatischen gesunden Zustand des Darmgewebes dysreguliert ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Dies führt zu der Annahme, dass die vorgestellten Signalwege ein Steuerelement für Proliferation, Differenzierung und Metastasierung von Krebsstammzellen sein könnten ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ und so in Zukunft ein therapeutisches Ziel bei kolorektalen Tumoren darstellen könnten ¹⁴⁸

3 Kenntnisstand

Beim Geburtsvorgang geraten Säugetiere das erste Mal mit einer Vielzahl von Mikroorganismen in Kontakt und die Körperoberflächen werden von Keimen aus der Umgebung kolonisiert. Dieser natürliche Vorgang beeinflusst die Entwicklung des Immunsystems² sowie die Darmentwicklung¹⁴⁹ der Säugetiere. Die Signaltransduktionswege, die für die Differenzierung, Entwicklung und Erneuerung des Darms essentiell sind, sind bereits sehr gut aufgeklärt^{150,151}. Der Hedgehog-Signalweg, ein antagonistischer Signalweg des Wnt-Signalweges, reguliert das Wachstum des Darmmesenchyms während der Entwicklung des Säugetieres. Auch im adulten Mesenchym spielt der Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle. Zum einen fungiert der Signaltransmitter Indian Hedgehog (Ihh) als negatives Feedback-Signal bei der Proliferation von Kryptzellen, zum anderen führt das Fehlen von Ihh innerhalb von 4 Wochen zu einem kompletten Verlust des Villusfundaments im Darm von Mäusen¹¹². Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch der Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktionsweg die Differenzierung, Entwicklung und Erneuerung des Darms steuert¹¹⁶. Ferner konnte eine Verbindung zwischen den beiden genannten Signalwegen nachgewiesen werden: Die Expression der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) verläuft Hedgehog-Signal-abhängig^{112,152,153}. Der Einfluss der Mikrobiota auf die beschriebenen morphogenetischen Signalwege hingegen ist weitgehend unerforscht. Vorhergehende Arbeiten zeigen, dass die Mikrobiota einen enormen Einfluss auf die distale Dünndarmmorphologie und die Proliferation von Darmzellen hat^{28,32}. Keimfreie Mäuse (*germ-free*, GF), die in Isolatoren, geschützt von Bakterien, Viren und Pilzen, aufwachsen, zeigen im Vergleich zu konventionell-aufgewachsenen Tieren (*conventionally-raised*, CONV-R) eine geringere Schichtdicke der Darmmukosa, verlängerte Villusstrukturen, eine geringere Vaskularisierung und Proliferation der Progenitorzellen^{28,31}. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sogenannte Toll-like Rezeptoren, und die dazugehörigen Adaptermoleküle auf die Proliferation im Darm wirken³². Dies lässt vermuten, dass die Interaktion des angeborenen Immunsystems und der Mikrobiota einen Einfluss auf die morphologische Entwicklung des Darms haben könnte. Erste Hinweise auf den Mikrobiota-regulierten Einfluss der Dicke der Villusstrukturen und deren Vaskularisierung im Darm konnten 2012 von Reinhardt et al. aufgezeigt werden³¹.

3 Kenntnisstand

Die Mikrobiota, TLR2 sowie die morphogenetischen Signalwege sind im Zusammenhang mit kolorektalen Tumoren, deren Proliferation, Differenzierung und Metastasierung beschrieben (**Kapitel 2**) und liegen in diesen im Vergleich zum gesunden Zustand unterschiedlich exprimiert vor^{128,135,143,154-161}. Ebenso ist in der Literatur beschrieben, dass eine erhöhte Darmpermeabilität mit entzündlichen Darmerkrankungen und kolorektalen Tumoren assoziiert^{50,51,53,56}. Ein Zusammenhang zwischen Mikrobiota, veränderter Permeabilität und der Krebsentstehung konnte bereits gezeigt werden^{50,162}. Ist die Darmbarriere unter gewählten Versuchsbedingungen permeabler gestaltet, ist zudem eine Veränderung der BMPs zu beobachten¹⁶³.

4 Zielsetzung

Um zu verstehen, wie die kommensale Mikrobiota die Erneuerung des Dünndarmepithels reguliert, muss deren Einfluss auf die morphogenetischen Signalwege und deren Interaktionen mit Mustererkennungsrezeptoren aufgeklärt werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Einflusses der Mikrobiota auf den Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt- Signalweg und der Auswirkung auf Proliferation, Morphologie und Permeabilität adulter C57BL/6J-Mäuse im Dünndarm im homeostatischen Gleichgewicht.

Zielsetzung dieser Arbeit ist daher zunächst die genaue Analyse des Einflusses der Mikrobiota auf die Dünndarmmorphogenese und Proliferation im adulten Tier. Hierzu werden keimfreie (GF), mit einer Zäkum-Mikrobiota kolonisierte ehemals keimfreie (3, 6, 9 und 14 Tage) (CONV-D), Antibiotika-behandelte konventionell-aufgewachsene (CONV-R + Abx) und konventionell-aufgewachsene (CONV-R) C57BL/6J Mäuse untersucht. Weiterführend sollen die morphogenetischen Signaltransduktionswege unter homeostatischen Bedingungen im distalen Dünndarm auf ihre Mikrobiota-abhängige Regulation und die dadurch bedingten Auswirkungen auf die Dünndarmmorphologie und Proliferation aufgeklärt werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung der möglichen Beteiligung des Toll-like Rezeptor 2 in der Mikrobiota-abhängigen Regulation morphogenetischer Signaltransduktionswege und der Dünndarmmorphogenese. Abschließend wird die Mitwirkung der Mikrobiota und der identifizierten Mikrobiota-regulierten morphogenetischen Signalwege an der Permeabilitätsregulation des distalen Dünndarms untersucht.

Zusammenfassend sollen die hier beschriebenen gnotobiotischen Versuchsansätze zu einem genauen Verständnis der Mikrobiota-regulierten molekularen Mechanismen beitragen, welche die im keimfreien Mausmodell beschriebenen Veränderungen der Dünndarmhomeostase kennzeichnen.

5 Mäuse, Material und Methoden

5.1 Mauslinien

Stamm	Typ	Herkunft	Zucht
C57BL/6J	Inzuchtstamm, spontane Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
B6.129- Tlr2<tm1Kir>/J	Kongener Stamm, gezielte Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung

Tabelle 5.1 Mauslinien

5.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blottingkammer	Mini Trans-Blot® Cell	BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
Elektrophoresekammern	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Feinwaage	R180	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzphotospektrometer	Fluoroskan Ascent™ FL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentationssystem	GelDoc EZ Imager	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA

Heizblock	Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Isolatoren	diverse Modelle	CBC Class Biologically Clean Ltd., Madison, USA
Kühlschrank 4°C	Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -20°C	Premium No Frost And Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -80°C	Hera Freeze BASIC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	Stirrer MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axio Lab.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, Radnor, USA
PCR-Cycler	Mastercycler® pro	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	827 pH lab	Metrohm AG, Herisau, Schweiz
Photometer	NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Pipet Lite XPS LTS (1000, 200, 20, 10, 2 mL)	RAININ über Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA

5 Mäuse, Material und Methoden

Netzteil	PowerPac™ Universal Power Supply	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Real-Time PCR-Cycler	CFX96™ Real-Time PCR Detection System	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Schwingkugelmühle	TissueLyser II	Quiagen, Hilden, Deutschland
Sterilbank	Herasafe KS15 Herasafe KS18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage	VWR-1502	VWR International, Radnor, USA
Western-Blot Detektionsgerät	ChemoChem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 Megafuge 16R Micro 1814	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA VWR International, Radnor, USA

Tabelle 5.2 Geräte

5.3 Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San Jose, USA
AxioVision Mikroskop Software	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
GraphPad Prism	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmont, USA

Tabelle 5.3 Software

5.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blotting Papier	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Falcons (15 mL, 30 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kanülen (diverse Größen)	BD GmbH Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Latexhandschuhe Semper-care	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.h., Wien, Österreich
Light-Duty Tissue Wipers	VWR International, Radnor, USA
Nitrocellulosemembran (0.45 µm)	GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.
PCR-Reaktionsgefäße	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (0,1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA

5 Mäuse, Material und Methoden

Pipettenspitzen mit Filter (0,1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
qPCR-Platten	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA Sarstedt AG &Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt AG &Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Skalpelle	Feather Safety Razor, Ltd., Osaka, Japan
Spritzen (1 mL, 2 mL, 10 mL)	B.Braun, Melsungen, Deutschland BD GmbH Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Metallkugeln (7 mm)	Quiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 5.4 Verbrauchsmaterialien

5.5 Kits

Kits	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Maxima Hot Start Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 5.5 Kits

5.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Lämmli-Puffer (6-fach)	6 mL Tris-Base 3 mL Glycerol 1 g SDS 0,9 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau
Laufpuffer	96 g Tris-Base 232 g Glycin 160 mL 10%iges SDS mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1,6 L auffüllen
Lysepuffer	pH 12, vor Gebrauch autoklaviert 25 nM NaOH 0,2 mM EDTA
Neutralisationspuffer	pH 5, vor Gebrauch autoklaviert 40 mM Tris-HCl
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA-Dinatriumsalzdihydrat

5 Mäuse, Material und Methoden

TBS-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i>), 10-fach, 1 L	pH 7,6 24 g Tris-Base 88 g NaCl mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen
TBS-T-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i> , Tween 20), 1 L	100 mL TBS-Puffer (10-fach) 1 mL Tween 20 mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen
Transferpuffer 10-fach, 1 L	30,275 g Tris-Base 144 g Glycerol mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen
Transferpuffer, 1-fach, 1 L	100 mL 10-facher Transferpuffer 200 mL Methanol mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen

Tabelle 5.6 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

5.7 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Complete Mini	Roche über Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Clidox S Activator & Base	PRL Pharmacal Research Labs, Inc., Naugatuck, USA
DMSO, wasserfrei	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DNase-freies Wasser	B.Braun, Melsungen, Deutschland
DNA-Marker, 100 bp	New England Biolabs, Ipswich, USA
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EDTA-Dinatriumsalz-dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fluorescein isothiocyanat-Dextran (Mn=70.000; 1:250)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
GDC-0449 (Vismodegib)	Selleckchem, Houston, USA
Glycerin, 86%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LumiGLO	Cell Signaling Technologies, Cambridge, U.K.

5 Mäuse, Material und Methoden

Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methylcellulose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Neomycinsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PBS 10-fach Pulver	AppliChem, Chicago, USA
Pierce Protease und Phosphatase Inhibitor Mini Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteingrößenmarker, PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Purmorphamin	Tocris Bioscience, Bristol, UK
PonceauS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Roti-GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histofix pH 7, 4 % Formaldehydlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris- Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
--------------------------	--

Tabelle 5.7 Chemikalien

5.8 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Gli1 (2534S)	Cell signalling, Danvers, USA
ID3 (D16D10)	Cell signalling, Danvers, USA
Ihh (ARP45230_T100)	Aviva Systems Biology, San Diego, USA
Shh (2287S)	Cell signalling, Danvers, USA

Tabelle 5.8 Antikörper

5.9 Primer

Die aufgelisteten Genotypisierungsprimer wurden entsprechend den Genotypisierungsprotokollen von Jackson ausgewählt und über Thermo Fisher bezogen. Die aufgelisteten qPCR-Primer wurden in der Harvard Primer Bank ausgewählt und über Thermo Fisher bezogen.

5.9.1 Genotypisierungsprimer

Stamm	Sequenz 5'-3'
oIMR7332_TLR2_Mutant_for	CTTCCTGAATTTGTCCAGTAC A
oIMR7333_TLR2_WT_for2	GGGCCAGCTCATTCTCCAC
oIMR7334TLR2_Common	ACGAGCAAGATCAACAGGAGA

Tabelle 5.9 Genotypisierungsprimer

5.9.2 qPCR-Primer

Primer	Gene	Sequenz 5'-3'
Bmp4_for	Bone Morphogenetic Protein 4	TTCCTGGTAACCGAATGCTGA
Bmp4_rev		CCTGAATCTCGGCGACTTTTT
Bmp7_for	Bone Morphogenetic Protein 7	ACGGACAGGGCTTCTCCTAC
Bmp7_rev		ATGGTGGTATCGAGGGTGGAA
BMPR1_for	Bone Morphogenetic Protein Receptor 1	AACAGCGATGAATGTCTTCGAG
BMPR1_rev		GTCTGGAGGCTGGATTATGGG
BMPR2_for	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	TTGGGATAGGTGAGAGTCGAAT
BMPR2_rev		TGTTTCACAAGATTGATGTCCCC
Gli 1_for	GLI family zinc finger 1	TACCATGAGCCCTTCTTTAGGA
Gli 1_rev		GCATCATTGAACCCCGAGTAG
Gli 2_for	GLI family zinc finger 2	GCCCTGGAGAGTCACCCTT
Gli 2_rev		TGCACAGACCGGAGGTAGT
Gli 3_for	GLI family zinc finger 3	CACAGCTCTACGGCGACTG
Gli 3_rev		CGGCCTTCTCGCTGACATC
ID 3_for	Inhibitor of DNA-Binding 3	CTGTCCGAACGTAGCCTGG
ID 3_rev		GTGGTTCATGTCGTCCAAGAG
Ihh_for	Indian Hedgehog	GACGAGGAGAACACGGGTG
Ihh_rev		GCGGCCCTCATAGTGTAAGA
L32_for	6oS ribosomales Protein L32	CCTCTGGTGAAGCCCAAGATC

L32_rev		TCTGGGTTTCCGCCAGTTT
Occludin_for	Occludin	TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA
Occludin_rev		CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG
Shh_for	Sonic Hedgehog	AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA
Shh_rev		TGAGTTCCTTAAATCGTTCGGAG
TFF3_for	Trefoil Factor 3	TTGCTGGGTCCTCTGGGATAG
TFF3_rev		TACACTGCTCCGATGTGACAG
Wnt5A_for	Wnt5A	CAACTGGCAGGACTTTCTCAA
Wnt5A_rev		CCTTCTCCAATGTACTGCATGTG
Wnt11_for	Wnt11	GCTGGCACTGTCCAAGACTC
Wnt11_rev		CTCCCGTGTACCTCTCTCCA
ZO-1_for	Zona occludens 1	GCCGCTAAGAGCACAGCAA
ZO-1_rev		TCCCCACTCTGAAAATGAGGA

Tabelle 5.10 qPCR Primer

5.10 Methoden

5.10.1 Mäuse

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden in der TARC (Translational Animal Research Center) der Universitätsmedizin Mainz unter SPF- (*specific-pathogen-free*) bzw. GF- (*germ-free*) Bedingungen gehalten. Die Haltung erfolgte bei konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit in einem 12h-Hell-Dunkel-Zyklus in EU Type II IVC-Käfigen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und (autoklaviertem) Futter. Die Mäuse waren zu

5 Mäuse, Material und Methoden

Versuchsbeginn zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Versuche wurden mit geschlechts- und altersabgestimmten Versuchsgruppen durchgeführt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden durch das Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC, Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz) genehmigt (G12-1-035, G16-1-013).

5.10.2 Genotypisierung

Zur Abklärung des Genotyps der transgenen Mauslinie, wurden Schwanzbiopsien der Tiere entnommen. Um DNA aus den Schwanzbiopsien zu gewinnen, wurden diese jeweils mit 40 µL Lysepuffer versetzt und für 20 min bei 97 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurden die Biopsien mit 40 µL Neutralisationspuffer neutralisiert, gevortext, kurz abzentrifugiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Nun wurden die Reaktionsansätze entsprechend **Tabelle 5.11** für die Polymerasekettenreaktion pipettiert.

12,5 µL	Hot Start Green MM
0,5 µL	oIMR7332_TLR2_Mutant_for (10µM)
0,5 µL	oIMR7333_TLR2_WT_for2 (10µM)
1,0 µL	oIMR7334_TLR2_Common (10µM)
9,5 µL	Wasser (DNase-free)
1,0 µL	DNA
25 µL total	

Tabelle 5.11 Pipettierschema Genotypisierung (B6.129-Tlr2<tm1Kir>/J)

Anschließend wurden die Proben entsprechend dem Genotypisierungsprotokoll (**Tabelle 5.12**) im Thermocycler vervielfältigt.

Anschließend wurden 5 µL der Proben und der DNA-Marker auf ein 1,5 %iges Agarosegel, welches mit 1-fachem TBE-Puffer gegossen und mit Roti-Stain vorgefärbt wurde, aufgetragen und bei 100 V in der Gelelektrophoreseapparatur laufen gelassen. Das

Genotypisierungsgel wurde im GelDoc entwickelt und im Anschluss der Genotyp der Maus analysiert.

Zeit	Temperatur	Zyklen
180 s	93°	35x
30 s	93°	
60 s	59°	
60 s	72°	
600 s	72°	

Tabelle 5.12 Genotypisierungsprotokoll

5.10.3 Antibiotika-Behandlung von Mäusen

Zur Dezimierung der Bakterienzahl im Darm erhielten die Mäuse zwei Wochen Antibiotika (1 g/L Ampicillin und 0.5 g/L Neomycin) über das Trinkwasser. Das Antibiotika-angereicherte Trinkwasser wurde alle 2 Tage frisch hergestellt und gewechselt. Nach einer Woche wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und Gewebe entnommen.

5.10.4 Vismodegib-Behandlung von Mäusen

Der Hedgehog-Inhibitor Vismodegib wurde den Mäusen per Schlundsonde verabreicht. Hierfür wurde der Inhibitor in Methylcellulose gelöst. Jedem Tier wurden 30 mg/kg Vismodegib täglich in einem finalen Volumen von 150 µL über einen Zeitraum von 7 Tagen geschlündelt. Am 7. Tag wurden die Tiere 4h nach letzter Vismodegib-Gabe durch zervikale Dislokation getötet und das Gewebe entnommen.

5.10.5 Purmorphamin-Behandlung von Mäusen

Der Hedgehog-Aktivator Purmorphamin wurde den Mäusen durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Hierfür wurde der Inhibitor in DMSO gelöst. Jedem Tier wurden 25 mg/kg Purmorphamin täglich in einem finalen Volumen von 100 µL über einen Zeitraum von 7 Tagen injiziert. Am 7. Tag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und Gewebe entnommen.

5.10.6 FITC-Dextran-Gabe

Für dieses Experiment wurde den Mäusen zunächst das Trinkwasser entzogen und ihr Körpergewicht bestimmt. Anschließend wurde das FITC-Dextran 4000 in sterilem PBS gelöst und in einer Dosis von 50 mg/100g Körpergewicht nach 4h Wasserentzug den Mäusen per Schlundsonde verabreicht. Hierbei wurden zwischen den einzelnen Behandlungen jeder Maus jeweils 5 min gewartet, um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse später reproduzierbar sind. Nach weiteren 4h Wartezeit wurden die Mäuse anästhesiert und es erfolgte eine retro-orbitale Blutentnahme (mindestens 500 µL!) mit anschließender Tötung durch zervikale Dislokation. Das entnommene Blut wurde stets lichtgeschützt aufbewahrt. Nach der letzten Blutentnahme standen die Proben für 30 min bei Raumtemperatur bis sich ein Blutgerinnsel gebildet hatte. Das Blut wurde bei 4 °C für 10 min bei 1500 g abzentrifugiert und das Serum abpipettiert. Dieses wurde mit einem äquivalenten Volumen sterilem PBS versetzt. 100 µL des verdünnten Serums wurden in Dublikaten, neben einer FITC-Dextran Standardreihe in eine 96 well Platte pipettiert und mittels Fluoreszenzspektroskopie vermessen (Anregung: 485 nm, Emission: 528 nm). Die im Serum vorhandenen FITC-Dextran Mengen wurden anhand der Standardkurve quantifiziert und unter den Gruppen miteinander verglichen.

5.10.7 Entnahme von Mausgeweben

Für die Darmentnahme der Tiere, wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Dann wurde der Bauchraum der Tiere mit Hilfe von Sezierbesteck auf einem Präparationsbrett geöffnet. Mit einer Pinzette wurde der Magen lokalisiert, der Anfang des Dünndarms mittels der Pinzette ergriffen und vom Magen getrennt. Durch vorsichtiges Ziehen wurde der Dünndarm aus dem Bauchraum der Maus herausgezogen und am Blinddarm abgetrennt. Nun wurde der Dünndarm U-förmig auf dem Sezierbrett angeordnet und in 8 äquivalente Stücke geteilt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Dünndarmsegment s15 verwendet, welches dem proximalen Ileum der Maus zuzuordnen ist.

5.10.8 RNA-Extraktion aus Darmgewebe

Es wurden 30 mg Darmgewebe in ein 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, in welchem RLT-Puffer, der mit β -Mercaptoethanol versetzt war, und 2 Metallkugeln vorgelegt wurden. Anschließend wurde das Gewebe 5 Minuten bei 30 Hz im TissueLyser lysiert. Die Extraktion wurde analog dem, dem Kit beiliegendem, Quiagen-Protokoll von Geweben durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte am Nanodrop. Die Konzentration der RNA wurde einheitlich für alle Proben auf 200 ng/ μ L eingestellt und in dieser für die cDNA-Synthese eingesetzt.

5.10.9 Reverse Transkription/cDNA-Synthese

Zur Generierung von cDNA wurden 10 μ L der 200 ng/ μ L gewonnenen RNA mit 10 μ L des in der **Tabelle 5.13** zusammengesetzten Mastermixes eingesetzt.

Reagenz	Konzentration	Konzentration	eingesetzte Volumina
	Stammlösung	Reaktion	
RT-Puffer	10 x	1 x	2 μ L
dNTP-Mix,	25 x (100 mM)	1 x	0,8 μ L
RT Random Primers	10 x	1 x	2 μ L
Reverse Transkriptase	50 U/ μ L	50 U	1 μ L
H ₂ O			4,2 μ L

Tabelle 5.13 Pipettierschema cDNA-Synthese

Anschließend wurde die RNA analog des folgenden PCR-Programms (**Tabelle 5.14**) im Thermocycler umgeschrieben.

180 s	93°	35x
30 s	93°	
60 s	59°	
60 s	72°	
600 s	72°	

Tabelle 5.14 cDNA-Synthese Protokoll

5 Mäuse, Material und Methoden

Nach erfolgter Umschreibung der RNA in cDNA wurde diese auf eine Konzentration von 5 ng/ μ L verdünnt und für die quantitative Echtzeit PCR eingesetzt.

5.10.10 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der mRNA wurde in dieser Arbeit die semiquantitative PCR-Methode verwendet. Für diese Methode benötigt es ein Referenzgen, hier wurde das 60S ribosomale Protein L32 (L32) verwendet. Die Expression dieses Genes ist für die meisten Gewebetypen bekannt und unter den untersuchten Bedingungen ist dieses nicht reguliert. Analysiert wurden Triplikate von Referenz- und Zielgen in Reaktionsansätzen von 20 μ L Endvolumen. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist der folgenden **Tabelle 5.15** zu entnehmen. Das Standardprogramm ist in **Tabelle 5.16** aufgelistet.

Reagenz	Konzentration Stammlösung	eingesetzte Volumina
iQ Sybr Green MM	2 x	10 μ L
Primer_for	10 mM	0,5 μ L
Primer_rev	10 mM	0,5 μ L
cDNA	5 ng/ μ L	4 μ L
DNAse-freies H ₂ O		5 μ L

Tabelle 5.15 Pipettierschema quantitative PCR

Die Platte wurde mit folgendem Programm entwickelt.

Zeit	Temperatur	Zyklen/Intervalle
180 s	93 °C	50
2 s	98 °C	
5 s	60 °C	
10 s	75-95 °C	0,2 °C

Tabelle 5.16 Programm quantitative PCR

Anschließend wurde die relative mRNA Expression des Zielgens auf die des Referenzgens normalisiert und mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

5.10.11 Entnahme von Mausgeweben für Paraffinhistologien

Für die Histologie von Darmgewebe wurde der Maudarm zunächst mit PBS gespült, um den Darminhalt zu entfernen. Anschließend wurde der Darm mit Histofix gespült und in ein mit Histofix-befülltes Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Das Einbetten, Schneiden der Paraffinschnitte und die HE- sowie Ki67-Färbungen dieser erfolgte durch die Core Facility Histologie der Universitätsmedizin Mainz.

5.10.12 *Periodic Acid/Schiff* Reaktion (PAS)-Färbung:

Als Vorbereitung für die PAS-Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und hydriert. Hierzu wurden die Schnitte 2x 5-7 min in Xylol getaucht, anschließend 2x für 5 min in 100%iges Ethanol (EtOH). Nun wurden die Paraffinschnitte für je 3 min in einer absteigenden Alkoholkonzentrationsreihe vollständig hydratisiert: 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30%EtOH, destilliertes Wasser. Die hydrierten Schnitte wurden für 5 min in Periodsäure oxidiert, 4-5x unter fließendem destilliertem Wasser gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur in Schiff'schen Reagenz inkubiert, um die Farbreaktion zu erzeugen. Die gefärbten Schnitte wurden 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in Hämalaun gegengefärbt. Nach der Gegenfärbung wurden die Schnitte so lange unter fließendem Leitungswasser gehalten, bis die Gegenfärbung blau ist. Nun wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe (je 3 min in 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 90% EtOH; jeweils 5 min 2x 100% EtOH, 3x Xylol) dehydriert und der Schnitt mit Entellan eingedeckt.

5.10.13 Histologie-Analyse des Maudarms

Für die Analyse der Villusmorphologie wurden per Maudarmquerschnitt jeweils 5 Villusstrukturen ausgewählt. Bei diesen wurde die Anzahl der Epithelzellen entlang der Villuslänge bestimmt, die Villuslänge (A) und der Villusabstand (B). Der Villusabstand wurde über 5 Villi vermessen und im Anschluss der Mittelwert zur Bestimmung des Villusabstandes zweier Villi bestimmt. Weiterhin wurden die Krypttiefe (C) und an 10 Stellen des Darmquerschnitts die Dicke der glatten Muskulatur (D) bestimmt. Zur Veranschaulichung soll die nachfolgende **Abbildung 5.1** dienen.



Abbildung 5.1 Auswertungsschema Histologie

Zur Berechnung der Proliferationsrate wurden die proliferierenden Zellen pro Villus ins Verhältnis zur Gesamtepithelzellzahl eines Villus gesetzt und auf die Kontrollgruppe normiert. Zur Darstellung der prozentualen Anzahl der Becherzellen, wurden die Becherzellen ausgezählt und ins prozentuale Verhältnis der Gesamtepithelzellzahl gesetzt.

5.10.14 Western Blot

Zur Herstellung der Proteinlysate wurde zunächst der RIPA-Puffer vorbereitet und auf 10 mL des Puffers eine Protease-Inhibitor-Tablette gegeben. Pro Probe wurden jeweils in ein 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß 50 mg Darmgewebe, 600 µL des modifizierten RIPA-Puffers und 2 Metallkugeln gegeben. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 30 Hz mittels TissueLyser lysiert. Nun wurden die Proben 2 x 900 s mit 14000 rpm bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde von der Zelldebris abgenommen, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Proteinmenge wurde mittels Bradford bestimmt und 60 mg Probe mit Lämmli-puffer versetzt, sodass der Lämmli-puffer einfach verdünnt in der Proteinprobe vorlag. Die Proben wurden nun bei 95 °C unter Schütteln für 600 s denaturiert. Zur anschließenden Auftrennung der Proteinlysate wurden je nach Größe des zu

detektierenden Proteins 6-, 8- oder 10%ige SDS-Gele verwendet. Die Geltaschen wurden mit je 60 mg der Proben pro Tasche geladen und zusätzlich der Marker aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt, damit die Proben in das Sammelgel einwandern konnten, nun wurde die Spannung auf 100 V erhöht, um die Proteine entsprechend ihrer Größe im Trenngel aufzutrennen. Weitergehend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Transferpuffer gekühlt ist und die Apparatur auf Eis steht, um eine Überhitzung zu vermeiden. Für den Transfervorgang wurde eine Spannung von 40 Volt angelegt und diese für 2 Stunden gehalten. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran mit PonceauS gefärbt, um zu überprüfen, ob der Proteinübertragung auf die Membran funktionierte. Das PonceauS wurde im Anschluss mit TBS-T von der Membran gewaschen und diese entsprechend des Herstellerprotokolls des Erstantikörpers für 1 Stunde geblockt. Der Erstantikörper (Verdünnung laut Herstellerprotokoll) wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlraum unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 x mit TBS-T (für jeweils 10 Minuten) gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper für 1-2 Stunden inkubiert. Nun wurde die Membran erneut 3 x für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit LumiGLO überschichtet und die Chemilumineszenz am Western-Blot Detektionsgerät detektiert.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Die Besiedlung mit einer intestinalen Mikrobiota beeinflusst die Villusmorphologie

In der Literatur sind gravierende Unterschiede zwischen keimfreien (GF) und konventionell-aufgewachsenen (CONV-R) Tieren beschrieben^{1,29,31,89}. Um zu überprüfen, ob eine Besiedlung mit einer intestinalen Mikrobiota diese Unterschiede in der Villusmorphologie hervorruft, wurden keimfreie Mäuse mit dem Zäkum-Inhalt einer konventionell-aufgewachsenen Maus kolonisiert und nach den Kolonisierungszeiträumen von 3 (CONV-D 3d), 6 (CONV-D 6d), 9 (CONV-D 9d) und 14 (CONV-D) Tagen auf deren Villusmorphologieparameter Zellkerne pro Villuslänge, Villuslänge, Villusabstand, Proliferationsrate, Krypttiefe und Schichtdicke der glatten Muskulatur untersucht.

Die Anzahl der Zellkerne wurden durch die Besiedlung von keimfreien Mäusen stetig reduziert, erreichten nach 14 Tagen Besiedlungszeit ein Minimum und pendelten sich dann bei rund 47 Zellkernen bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen ein (**Abbildung 6.1 a**). Diese Reduktion an Zellkernen verlief über die gewählten Kolonisierungszeitpunkte konstant, wobei nach den ersten 3 Tagen die prozentual größte Reduktion an Zellkernen pro Villusstruktur auftrat. Die Villuslänge hingegen flachte mit den betrachteten Besiedlungen kontinuierlich ab (**Abbildung 6.1 b**). Bei einer Besiedlungszeit von 14 Tagen erreichte die Villuslänge ein Minimum. Die durchschnittliche Villuslänge lag nach 14 Tagen Kolonisierung bei 375,61 μm ; die durchschnittliche Villuslänge von konventionell-aufgewachsenen Mäusen lag hingegen bei 417,24 μm . Bei der Evaluierung des Villusabstandes zu den unterschiedlichen Kolonisierungsdauern zeigte sich kein klarer Trend (**Abbildung 6.1 c**). Bei den Kolonisierungszeitpunkten von 3 und 9 Tagen vergrößerte sich der Abstand zwischen den Villusstrukturen, während die anderen gewählten Zeitpunkte eine Abnahme des Villusabstandes des keimfreien Dünndarmstatus in den konventionellen Zustand aufwiesen.

Die Proliferationsrate von konventionell-aufgewachsenen Mäusen ist um das 2,5-fache gegenüber keimfreien Mäusen erhöht (**Abbildung 6.1 d**). Nach 3 Tagen Kolonisierung verdoppelt sich die Proliferationsrate im Vergleich zu keimfreien Mäusen, flacht anschließend wieder ab (CONV-D 6d, CONV-D 9d) und steigt nach 14 Tagen Kolonisierung

durch eine kommensale Mikrobiota wieder an (**Abbildung 6.1 d**). Die Tiefe der Krypten erhöhte sich die ersten Tage nach Kolonisierung kontinuierlich (3, 6 Tage; **Abbildung 6.1 e**), zu späteren Zeitpunkten verkürzten sich die Krypten jedoch wieder (9, 14 Tage, **Abbildung 6.1 e**) und erreichten im homeostatischen Zustand (CONV-R) eine Tiefe, die dem 9 Tage Kolonisierungszeitpunkt entsprach. Die Schichtdicke der glatten Muskulatur im distalen Darm wurde durch die Besiedlung mit Mikrobiota nicht verändert (**Abbildung 6.1 f**).

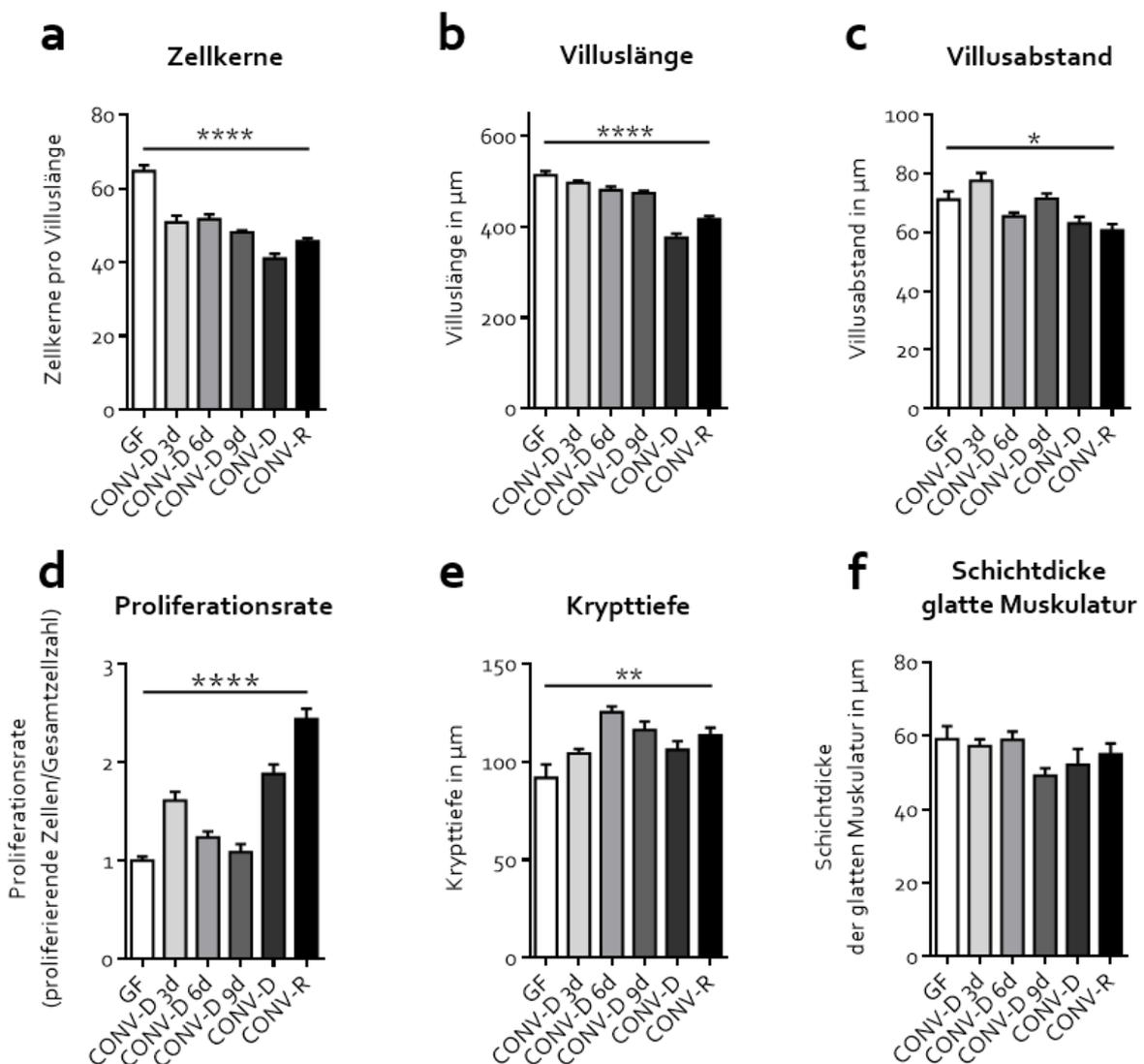


Abbildung 6.1 Mikrobielle Kolonisierung induziert Veränderungen in der Villusmorphologie.

Abgebildet sind **a** Zellkerne pro Villuslänge, **b** Villuslänge, **c** Villusabstand, **d** Proliferationsrate, **e** Krypttiefe und **f** Schichtdicke der glatten Muskulatur von keimfreien (GF), kolonisierten ehemals keimfreien (CONV-D) und konventionell-aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen ($n=5-7$, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; **** = $P < 0,001$

6 Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der Villusmorphologie zu verschiedenen Kolonisierungszeitpunkten, dass die Villusmorphologie bei C57BL/6J Mäusen wesentlich durch die Mikrobiota beeinflusst wird. Die Kolonisierung von keimfreien Mäusen zeigte eine Reduktion an Zellkernen pro Villuslänge, eine Abnahme der Villuslänge, einen geringeren Abstand der Villusstrukturen und eine expandierte Krypttiefe (**Abbildungen 6.1 a-c, e**). Bei CONV-D und CONV-R Mäusen war eine erhöhte Proliferationsrate zu beobachten (**Abbildung 6.1 d**). Die Schichtdicke der glatten Muskulatur war durch die kommensale Mikrobiota nicht beeinflusst (**Abbildung 6.1 f**). Die Ergebnisse, die Villuslänge, den Villusabstand und die Proliferationsrate betreffend, stimmen mit den bisher beschriebenen Unterschieden in keimfreien und konventionell-aufgewachsenen Mäusen überein^{28,31,32,89,164}. Die gefundene erhöhte Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge in keimfreien Mäusen zeigt, dass die Villuslänge aufgrund einer erhöhten Zellzahl verlängert ist und nicht beispielsweise durch größere Abstände der Zellen zueinander. In konventionell-aufgewachsenen Mäusen ist die Caspase-3 mRNA Expression von Epithelzellen aufgrund der vorhandenen Mikrobiota, im Vergleich zu keimfreien Mäusen deutlich erhöht, was auf eine erhöhte Apoptose schließen lässt³². Um die absterbenden Zellen im homeostatischen Equilibrium zu ersetzen, benötigt es eine höhere Proliferation; diese könnte mit einer erhöhten Anzahl an Transient-amplifizierenden Zellen zusammenhängen, die wiederum die in **Abbildung 6.1 e** dargestellten verlängerten Krypten in CONV-R Mäusen erklären könnten.

Auch während einer Entzündung oder einer Verletzung des Epithels expandiert das Stammzellkompartiment, um den Zellverlust auszugleichen. Dies hat eine Erhöhung der Proliferationsrate zur Folge. Die Erneuerung des Dünndarmepithels beugt durch die erhöhte Proliferation von Zellen einer Besiedlung durch Pathogene vor.^{111,112}

Während bei den Zellkernen pro Villuslänge und der Villuslänge ein klarer absteigender Trend über den Kolonisierungszeitraum erkennbar ist (**Abbildung 6.1 a, b**), verhalten sich Villusabstand, Proliferationsrate und Krypttiefe über den gewählten Kolonisierungszeitraum inkonstant (**Abbildung 6.1 c-e**). Dennoch ist ein klarer Unterschied des keimfreien Zustands gegenüber dem konventionell-aufgewachsenen Zustands erkennbar. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Bakterienverteilung während des Besiedlungsprozesses. Die Besiedlung keimfreier Mäuse durch eine kommensale Mikrobiota ist ein dynamischer Prozess^{165,166}. Erst

im 4. Lebensjahr ist beim Menschen eine ‚stabile‘ Mikrobiota aufgebaut¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Die Besiedlung verläuft für einzelne Bakterienarten wellenförmig, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Wirt, Bakterien und Immunsystem im Darm einspielt. Die Villusparameter sind bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen, die zwischen 8 und 12 Wochen alt sind gleich (vergleiche geringe Standardabweichungen in **Abbildungen 6.1 a-f**). So lässt sich mutmaßen, dass je nach Bakterienart möglicherweise ein anderer Villusparameter über einen anderen Immunrezeptor adaptiert wird und so möglicherweise für Villusabstand, Proliferationsrate und Krypttiefe andere Bakterien oder Immunrezeptoren eine Rolle spielen als für die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge und der Villuslänge. Hierfür müsste zunächst geklärt werden, welche Immunrezeptoren für die Darmmorphogenese eine tragende Rolle spielen und anschließend könnte mittels Verabreichung von TLR-Liganden diese Annahme im keimfreien Mausmodell untersucht werden.

6.2 Besiedlung mit Mikrobiota erhöht die Proliferationsrate und steuert die Differenzierung in Becherzellen

Als Kontrollexperiment zu den Kolonisierungsexperimenten wurden konventionell-aufgewachsene Mäuse über 14 Tage mit den Antibiotika Neomycin und Ampicillin behandelt, um die Besiedlungsdichte der intestinalen Mikrobiota und deren Diversität zu verringern^{82,84,162,170}. Auch hier wurden die Villusmorphologieparameter Zellkerne pro Villuslänge, Villuslänge, Villusabstand, Krypttiefe und Schichtdicke der glatten Muskulatur bestimmt. Um einen Eindruck des Einflusses der Mikrobiota auf die Proliferation und Differenzierung von intestinalen Stammzellen zu gewinnen, wurden zusätzlich die Anzahl der proliferierenden Zellen, die Proliferationsrate, der prozentuale Anteil an Becherzellen sowie die Anzahl der Panethzellen pro Krypte bestimmt.

Die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge waren bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen im Vergleich zu keimfreien Mäusen deutlich vermindert (**Abbildung 6.2 a**). Wurden CONV-R Mäuse über 14 Tage mit Antibiotika behandelt, hatte dies eine Erhöhung der Anzahl an Zellkernen pro Villuslänge zur Folge (**Abbildung 6.2 a**). Dieser beobachtete Trend einer vermehrten Anzahl an Zellkernen war vergleichbar mit dem keimfreien Zustand. Ein äquivalenter Trend war bei der Villuslänge zu beobachten (**Abbildung 6.2 b**). Der

6 Ergebnisse und Diskussion

Villusabstand war bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen signifikant geringer als beim keimfreien Pendant (**Abbildung 6.2 c**). Eine Behandlung von konventionell-aufgewachsenen Mäusen über 14 Tage mit Ampicillin und Neomycin reichte jedoch nicht aus, um eine Vergrößerung des Villusabstandes ähnlich wie beim keimfreien Zustand zu bewirken (**Abbildung 6.2 c**).

Bei Betrachtung der Anzahl proliferierender Zellen pro Villus (**Abbildung 6.2 d**) und der sich aus der Anzahl der proliferierenden Zellen pro Gesamtzellzahl resultierenden Proliferationsrate (**Abbildung 6.2 e**), war eine sehr hohe Proliferation in den konventionell-aufgewachsenen Mäusen im Vergleich zu den Antibiotika-behandelten und keimfreien Mäusen erkennbar. Die Proliferationsrate war bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen fast doppelt so hoch (**Abbildung 6.2 e**).

Der prozentuale Anteil an Becherzellen, die aus den Stammzellen differenzieren, war ebenfalls in konventionell-aufgewachsenen Mäusen signifikant erhöht, verglich man diesen Wert mit den prozentualen Anteilen an Becherzellen in keimfreien und Antibiotika-behandelten Mäusen (**Abbildung 6.2 f, h**). Die Anzahl der Panethzellen in den Krypten blieb hingegen in allen drei betrachteten Gruppen unverändert (**Abbildung 6.2 g**). Die Krypttiefe zeigte sich bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen im Gegensatz zu den in keimfreien Mäusen bestimmten Krypttiefen verlängert (**Abbildung 6.2 i**). Die Einwirkung von Antibiotika auf die intestinale Flora konnte diesen Effekt jedoch nicht umkehren. Die Krypttiefe von Antibiotika-behandelten Mäusen entsprach nahezu der von konventionell-aufgewachsenen Tieren (**Abbildung 6.2 i**). Die Schichtdicke der glatten Muskulatur blieb auch in diesem Experiment Mikrobiota-unbeeinflusst (**Abbildung 6.2 j**).

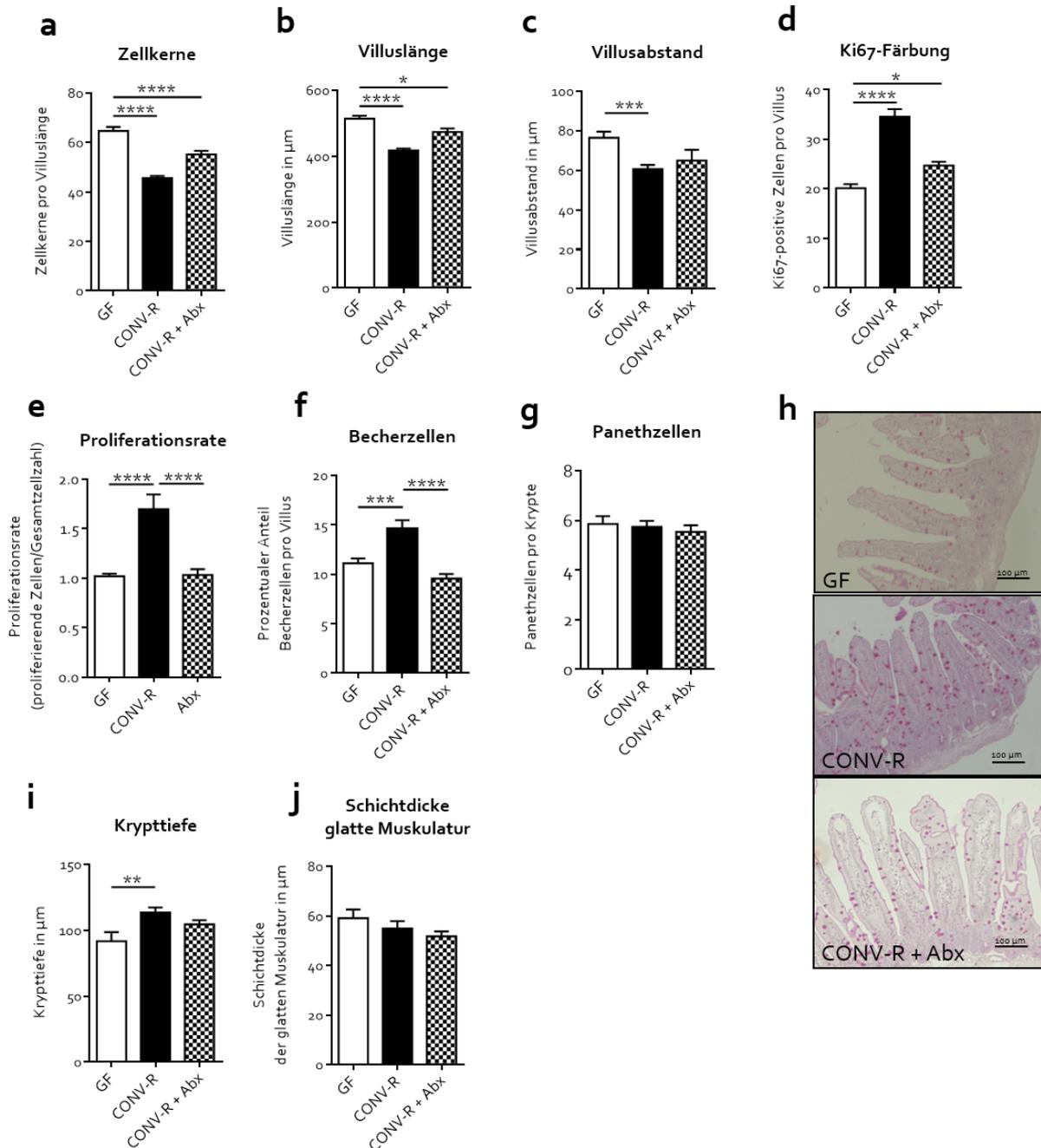


Abbildung 6.2 Durch mikrobielle Kolonisierung induzierte Veränderungen in der Villusmorphologie, gesteigerte Zellproliferation und erhöhte Differenzierung in Becherzellen

Abgebildet sind **a** Zellkerne pro Villuslänge, **b** Villuslänge, **c** Villusabstand, **d** Ki-67-positive Zellen pro Villus, **e** Proliferationsrate intestinaler Zellen, **f** Prozentualer Anteil an Becherzellen pro Villus, **g** Anzahl Panethzellen pro Krypte, **h** PAS-Färbungen der Becherzellen im distalen Dünndarm, **i** Krypttiefe und **j** Schichtdicke der glatten Muskulatur von GF, CONV-R und Antibiotika-behandelten Mäusen ($n=5-7$, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,005$; **** = $P < 0,001$.

6 Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Villusmorphologieparameter Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge, Villuslänge, Villusabstand und Krypttiefe Mikrobiota-abhängig reguliert werden (**Abbildung 6.2 a-c, i**). Die verlängerten Villusstrukturen sind bereits in der Literatur beschrieben und decken sich mit den gezeigten Ergebnissen (**Abbildung 6.2 b**)^{29,30}. Eine Antibiotika-Behandlung über 14 Tage mit Ampicillin und Neomycin genügt nicht, um die Mikroflora des Darms so zu verändern, dass sich alle Villusmorphologieparameter vollständig dem keimfreien Zustand angleichen (**Abbildung 6.2 a-c, i**). Die Anzahl der Zellkerne und die Villuslänge verändern sich in Richtung des keimfreien Zustands, während der Villusabstand und die Krypttiefe nahezu unverändert bleiben (**Abbildungen 6.2 a-c, i**). Da Antibiotika bekanntermaßen auch die Diversität der Bakterien beeinflussen, ist anzunehmen, dass ein längerer Behandlungszeitraum und ein Antibiotika-Cocktail mit mehreren Bestandteilen diese Villusmorphologieparameter ebenfalls in Richtung des keimfreien Zustands verändern könnte.

Die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen in Becherzellen wird deutlich durch die Mikrobiota reguliert (**Abbildung 6.2 d-f, h**). Bei Betrachtung dieser Parameter fällt direkt auf, dass eine Zeitdauer von 14 Tagen und der Antibiotika-Mix aus Ampicillin und Neomycin ausreichen, um den keimfreien Zustand zu imitieren (**Abbildung 6.2 d-f, h**). Unterschiede in der Proliferation der epithelialen Zelllinie zwischen keimfreien und konventionell-aufgewachsenen Mäusen konnten bereits 1963 gezeigt werden²⁸; diese Ergebnisse gehen mit den in **Abbildung 6.2 e** gezeigten Ergebnissen konform. Ein direkter Einfluss der Mikrobiota auf die Proliferation konnte durch die Antibiotika-Gabe bestätigt werden (**Abbildung 6.2 d, e**).

Eine erhöhte Anzahl an Becherzellen in konventionell-aufgewachsenen im Vergleich zu keimfreien BALB/c Mäusen ist in der Literatur beschrieben¹⁷¹. Auch konnten Analysen in keimfreien und konventionell-aufgewachsenen Zebrafischen erhöhte Becherzellzahlen in der Darmmukosa von CONV-R Zebrafischen zeigen¹⁷². Diese Gruppen untersuchten jeweils die Anzahl der Becherzellen in der Dünndarmmukosa. Hitoshi et. al. verwendeten für die Untersuchung der Anzahl an Becherzellen Abschnitte des Zäkumgewebes von keimfreien und konventionell-aufgewachsenen BALB/c Mäusen und zählten die Becherzellen in einem definierten Areal¹⁷¹. Bates et. al. bestimmten die Anzahl an Becherzellen im posterioren Darmsegment des Zebrafischs, das dem distalen Dünndarm im Säugetier entspricht¹⁷². In

der vorliegenden Arbeit wurde der prozentuale Anteil an Becherzellen im Verhältnis zur Gesamtepithelzellzahl in einer Villusstruktur untersucht. Auch hier wurde im Vergleich zwischen konventionell-aufgewachsenen Mäusen und keimfreien Geschwistertieren eine signifikante Erhöhung an Becherzellen festgestellt (**Abbildung 6.2 f**).

Generell bestätigen die Arbeiten von Hitoshi et. al. und Bates et. al. die in **Abbildung 6.2 f** dargestellten Ergebnisse, jedoch muss der unterschiedlich gewählte Referenzrahmen der Untersuchungen berücksichtigt werden.

Die Zusammensetzung der Mikrobiota variiert stark entlang des Gastrointestinaltrakts^{71,72}. Da ein direkter Einfluss der Mikrobiota auf die Differenzierung von Becherzellen gezeigt werden konnte (**Abbildung 6.2 f**), ist es durchaus möglich, dass sich im Zäkum bereits bei Auszählung der Becherzellen pro definiertem Areal ein Unterschied zwischen keimfreien und konventionell-aufgewachsenen Mäusen zeigt, während die Differenz in der Anzahl der Becherzellen im distalen Dünndarm nicht ausgeprägt vorliegt. Auch im Zebrafischmodell unterscheidet sich die Mikrobiota-Zusammensetzung wesentlich von der im Mausmodell¹⁷³, was eine Erklärung für die klaren Unterschiede der Anzahl an Becherzellen im posterioren Darm des Zebrafisches darstellen könnte. Zwar konnte von Rawls et. al. gezeigt werden, dass Zebrafische auf hoch konservierte Signale der Mikrobiota, welche die Proliferation, den Nährstoff-Metabolismus oder die Antworten der angeborenen Immunität regulieren, reagieren, allerdings unterscheidet sich die Zusammensetzung der Mikrobiota in Zebrafischen von der in Säugetieren¹⁷³.

Zudem werden Becherzellen vermehrt im Kolon gefunden und die von ihnen synthetisierte Mucusschicht ist dort im Vergleich zum Dünndarm dicker und besteht aus zwei funktionalen Schichten^{59,174}. In keimfreien Mäusen ist die Mucusschicht dünner als in konventionell-aufgewachsenen Mäusen. Durch die Besiedlung keimfreier Mäuse mit einer kommensalen Mikrobiota adaptiert sich die Mucusschicht¹⁷⁴. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Mikrobiota die Differenzierung von Becherzellen und somit die Ausbildung der Mucusschicht beeinflusst. In keimfreien Mäusen ist die Mucusschicht entlang des Gastrointestinaltraktes nahezu gleichbleibend, während in konventionell-aufgewachsenen Mäusen vermehrt Becherzellen und eine dickere Mucusschicht im Appendix und Kolon gefunden werden. Hitoshi et. al. und Bates et. al. betrachten dennoch nur die absolute Zahl

an Becherzellen in dem jeweils gewählten Referenzrahmen ihrer Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurde die prozentuale Betrachtung der Anzahl an Becherzellen pro Villus im Verhältnis zur Gesamtepithelzellzahl eines Villus als Referenzbereich der Analyse gesetzt. Nur so ist ein konkreter Rückschluss auf eine Mikrobiota-regulierte Differenzierung aus Stammzellen möglich.

Zusammenfassend sind die hier gezeigten Unterschiede der Becherzellendifferenzierung in keimfreien und konventionell-aufgewachsenen C57BL/6J Mäusen mit der Literatur vereinbar. Zudem kann in dieser Arbeit durch die gewählte Betrachtungsweise ein Rückschluss auf die Ausdifferenzierung von Becherzellen gezogen werden. Darüber hinaus kann durch die Antibiotika-Gabe der bisher in der Literatur nur diskutierte Einfluss der Mikrobiota auf die Becherzellendifferenzierung erstmals nachgewiesen werden (**Abbildung 6.2 f**).

6.3 Mikrobiota beeinflusst die Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signaltransduktion

Es konnte gezeigt werden, dass die Mikrobiota einen enormen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Becherzellen sowie die Villusmorphologie im distalen Dünndarm hat. Als nächstes sollten daher die Signaltransduktionskaskaden, die für Proliferation und Differenzierung im Darm verantwortlich sind, auf deren mögliche Mikrobiota-Abhängigkeit untersucht werden. Für die Aufrechterhaltung der Homeostase der epithelialen Linie im Darm sind drei Signaltransduktionswege essentiell: der Hedgehog-, der Bone Morphogenetic Protein- und der Wnt-Signaltransduktionsweg^{112,125,175,176}. Diese Signalwege und deren Interaktion¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ sind bereits sehr gut untersucht. Jedoch ist der Einfluss der mikrobiellen Besiedlung des Darms auf diese Signalwege bisher nicht aufgeklärt.

Für die Untersuchung wurden einzelne Liganden, Rezeptoren und Zielgene dieser Signalwege anhand eines in unserem Labor durchgeführten Hedgehog mRNA-Arrays (**Abbildung 9.1**) ausgewählt. Für den Hedgehog-Signalweg sind dies im Folgenden die Liganden Indian Hedgehog (Ihh), Sonic Hedgehog (Shh) sowie die Glioblastomtranskriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3¹¹². Für die Regulation des

Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktionsweg wurden die Gene der Rezeptoren Bone Morphogenetic Protein Rezeptor 1 (BMPR1) und Bone Morphogenetic Protein Rezeptor 2 (BMPR2), die Signalmoleküle Bone Morphogenetic Protein 4 sowie 7 (BMP₄, BMP₇), die vor allem im distalen Dünndarm exprimiert werden und eine wichtige Rolle in der Darmentwicklung während der Embryogenese spielen^{125,180,181}, und das dazugehörige Zielgen *Inhibitor of Differentiation 3* (ID₃;¹⁸²) untersucht. Für den Wnt-Signalweg, zeigte der Array eine Mikrobiota-abhängige Regulation von Wnt5A und Wnt11. Diese Wnt-Liganden werden während der Entstehung des Mesoderms koexprimiert¹⁸³. Wnt11 spielt eine Rolle bei der Proliferation, Transformation und Migration von intestinalen Epithelzellen¹⁸⁴ sowie der Bakterienabwehr¹⁸⁵ und wird mit Darmkrebsentstehung in Verbindung gebracht¹⁸⁶. Wnt5A begünstigt die Kryptregeneration nach Entzündungen¹⁸⁷, ist ein wichtiger Faktor bei der Morphogenese in Säugetieren¹⁸⁸ und spielt eine Rolle bei der Erneuerung von Krebsstammzellen, der Proliferation von Krebszellen, deren Migration und Invasion^{189,190}.

Die mRNA Expression der Liganden *Ihh* und *Shh*, sowie deren Zielgen *Gli1* waren unter CONV-R-Bedingungen im Vergleich zum keimfreien Zustand runterreguliert (**Abbildung 6.3 a-c**), während die *Gli2* mRNA Expression unverändert zwischen den Gruppen war (**Abbildung 6.3 d**). Ein klarer Trend der mRNA Expression der Hedgehog-Signalweg Komponenten in Richtung des keimfreien Zustands war bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen zu beobachten, die über 14 Tage mit Antibiotika behandelt wurden (**Abbildung 6.3 a-e**). *Gli3*, das in der Literatur als Hh-Signalweg-Repressor beschrieben wird¹¹², zeigte sich im CONV-R-Zustand im Vergleich zum keimfreien Zustand sowie nach Antibiotika-Gabe hochreguliert (**Abbildung 6.3 e**).

Ein übereinstimmender Trend mit den Hedgehog-Liganden und *Gli1* war bei den untersuchten Bone Morphogenetic Protein-Signalkaskadenkomponenten zu beobachten. Die mRNA Spiegel der BMP-Rezeptoren BMPR1 und BMPR2 waren im Vergleich zum GF Zustand im CONV-R-Zustand signifikant runterreguliert. Durch Antibiotika-Gabe wurde die mRNA Expression des keimfreien Zustands erreicht (**Abbildung 6.3 f, g**).

6 Ergebnisse und Diskussion

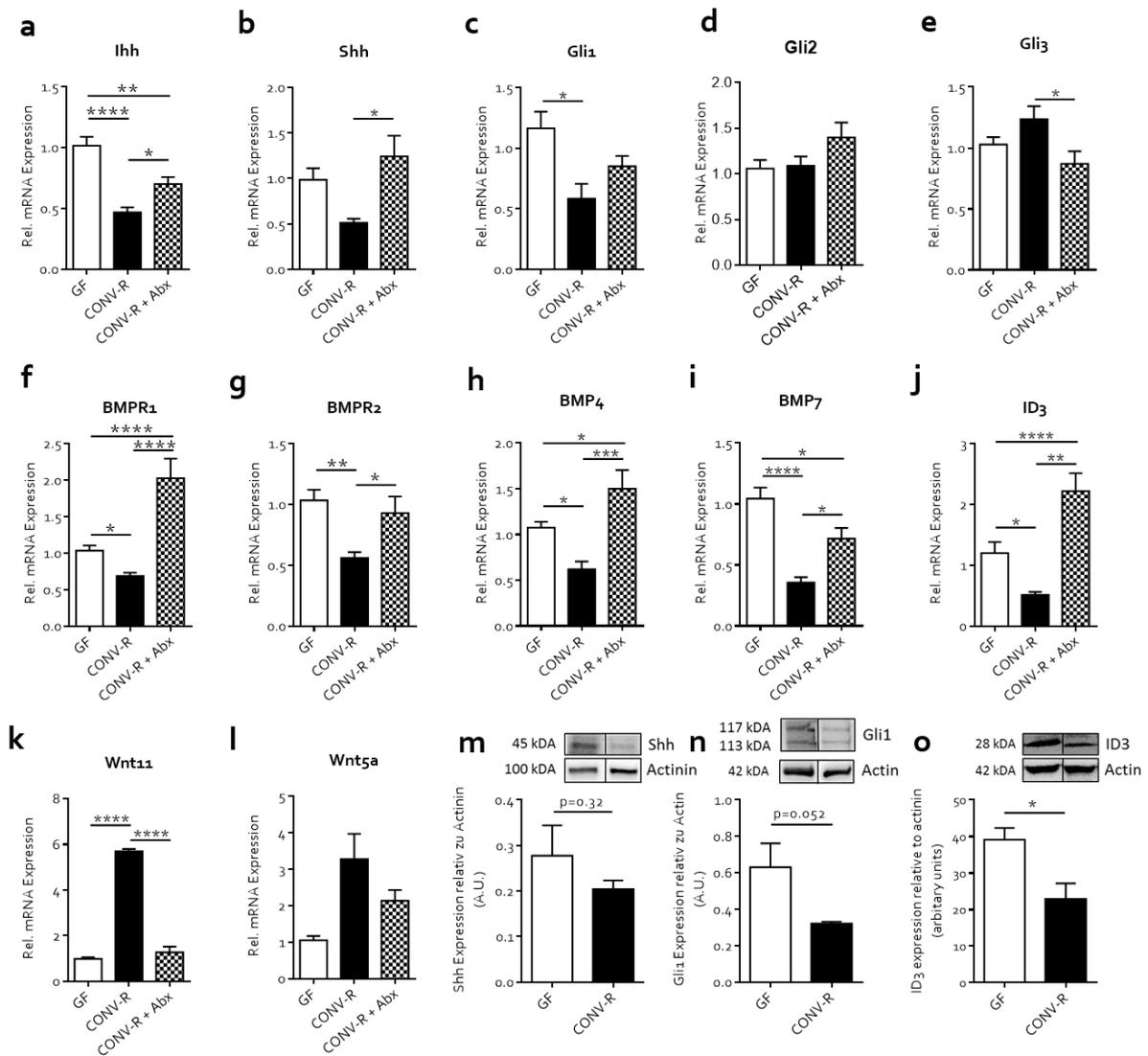


Abbildung 6.3 Mikrobielle Besiedlung beeinflusst Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signaltransduktion

Abgebildet sind die relativen mRNA Expressionen von **a** *Ihh*, **b** *Shh*, **c** *Gli1*, **d** *Gli2*, **e** *Gli3*, **f** *BMPR1*, **g** *BMPR2*, **h** *BMP4*, **i** *BMP7*, **j** *ID3*, **k** *Wnt11* und **l** *Wnt5a*, ausgewertet im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32, von GF, CONV-R und Antibiotika-behandelten Mäusen (n=5-10, C57BL/6J Mäuse) und die Proteinexpressionen von **m** *Shh*, **n** *Gli1* und **o** *ID3* im Vergleich zu Actin oder Actinin von GF und CONV-R Mäusen (n=5, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,005$; **** = $P < 0,001$

Die mRNA-Expressionsmuster der BMP-Liganden *BMP4* und *BMP7*, sowie des Zielgens *ID3* verhielten sich analog entsprach dem Besiedlungszustand im distalen Dünndarm (**Abbildung 6.3 h-j**).

Untersuchte man die Wnt-Gene, welche negativ durch die Hh- und BMP-Signalwege reguliert werden, war der entgegengesetzte Verlauf deutlich erkennbar. Die *Wnt5A*- und *WNT11*-mRNA Spiegel wurden unter CONV-R-Bedingungen im Vergleich zum keimfreien

Zustand oder der dezimierten Bakterienbesiedlung durch Antibiotika-Gabe verstärkt exprimiert (**Abbildung 6.3 k, l**).

Die verminderte Proteinexpression des Hh-Liganden Shh deutete auf eine Regulation durch die Mikrobiota hin (**Abbildung 6.3 m**). Entsprechend zeigten die Proteinexpressionen der Zielgene Gli1 und ID3 eine signifikante Abnahme im CONV-R-Status (**Abbildung 6.3 n, o**).

Durch die Untersuchung der mRNA-Expressionen konnte erstmals gezeigt werden, dass die Hedgehog-Liganden, deren Zielgen Gli1, die Bone Morphogenetic Protein-Rezeptoren, die Bone Morphogenetic Proteine BMP4 und BMP7 und deren Zielgen ID3 Mikrobiota-abhängig reduziert werden. Gleichzeitig wird die mRNA Expression der Wnt-Liganden Wnt5A und Wnt11 Mikrobiota-abhängig erhöht. Einen weiteren Beleg für die Mikrobiota-abhängige Repression der Hh- und BMP-Signalwegkomponenten liefern die Proteinexpressionsanalysen für Shh, Gli1 und ID3.

Die Dünndarmhomeostase und Erneuerung der Epithelzelllinie ist somit direkt Mikrobiota-abhängig über die morphogenetischen Signalwege reguliert. Ändert sich die Zusammensetzung der Mikrobiota oder gerät der Darm in einen dybiotischen Zustand steht diese Veränderung im direkten Kontakt mit der Homeostase der epithelialen Linie des distalen Dünndarms.

6.4 Inhibierung und Aktivierung des Hedgehog-Signalweges verändert die Villusmorphologie in adulten Mäusen

Da die Hh- und BMP-Signalwegkomponenten bekanntermaßen eine entscheidende Rolle in der embryonalen Darmentwicklung spielen^{112,125,175} und im adulten Organismus ein restriktiver Einfluss auf die Proliferation der epithelialen Linie bekannt ist¹¹², sollte durch die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges mit Vismodegib (GDC-0449,¹⁹¹) sowie der Aktivierung des Hedgehog-Signalweges mit Purmorphamin¹⁹² überprüft werden, ob der Hedgehog-Signalweg auch eine wichtige Rolle in der Adaption der Villusmorphologie im adulten distalen Dünndarm spielt. Hierfür wurden konventionell-aufgewachsene Mäuse 7 Tage mit Vismodegib beziehungsweise Purmorphamin behandelt und die Villusmorphologieparameter Zellkerne pro Villuslänge, Villuslänge, Villusabstand,

6 Ergebnisse und Diskussion

proliferierende Zellen pro Villus, Proliferationsrate, der prozentuale Anteil an Becherzellen und die Anzahl an Panethzellen pro Krypte untersucht. Zur Überprüfung der Funktionalität des Inhibitors wurden die mRNA Expression von *Ihh*, *Gli1* und *ID3* sowie die Proteinexpression von *Ihh* analysiert. Die Vismodegib-Kontrollgruppe erhielt über 7 Tage das Vehikel Methylcellulose (CONV-R CTR), der Purmorphamin-Kontrollgruppe wurde über 7 Tage DMSO verabreicht (CONV-R CTR).

Die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges über 7 Tage zeigte eine deutliche Reduktion der Anzahl der Zellkerne entlang einer Villusstruktur (**Abbildung 6.4 a**), der Villuslänge (**Abbildung 6.4 b**) und des Villusabstandes (**Abbildung 6.4 c**). Die Proliferationsrate stieg durch die Hedgehog-Signalweg-Inhibierung an (**Abbildung 6.4 d**), ebenso der prozentuale Anteil an Becherzellen (**Abbildung 6.4 e**). Die Anzahl der Panethzellen pro Krypte blieb auch in diesem Kontrollexperiment unverändert (**Abbildung 6.4 f**). Verminderte Expressionen von *Ihh* (mRNA-Expression, **Abbildung 6.4 h**, Proteinexpression, **Abbildung 6.4 k**), *Gli1* (mRNA Expression, **Abbildung 6.4 i**) und *ID3* (mRNA Expression, **Abbildung 6.4 j**) zeigten deutlich, dass die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges durch Vismodegib im Versuch erreicht werden konnte.

Durch dieses Experiment konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion der Expression von Hedgehog-Signalmolekülen zum einen direkt in eine verminderte BMP-Signalkaskade mündet (**Abbildung 6.4 j**) und zum anderen die Villusmorphologieparameter analog der in **Abbildung 6.2** dargestellten Ergebnisse beeinflusst. Vergleich man die Villusmorphologieparameter von konventionell-aufgewachsenen Mäusen mit Keimfreien, zeigte sich, dass Villuslänge und Villusabstand vermindert sind und eine geringere Anzahl an Zellkernen pro Villuslänge vorzufinden war. Die Expression der Hedgehog-Signalweg-Moleküle war bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen stark reduziert. Minimierte man die Expression der Hedgehog-Signalmoleküle im CONV-R Zustand durch Vismodegib-Gabe weiter, resultierte dies in weiter verkürzten Villuslängen und einem größeren Villusabstand, sowie weniger Zellkernen pro Villuslänge. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate durch die Inhibitorgabe erhöht wird und ein höherer prozentualer Anteil an Becherzellen in den *Villi intestinales* vorzufinden war.

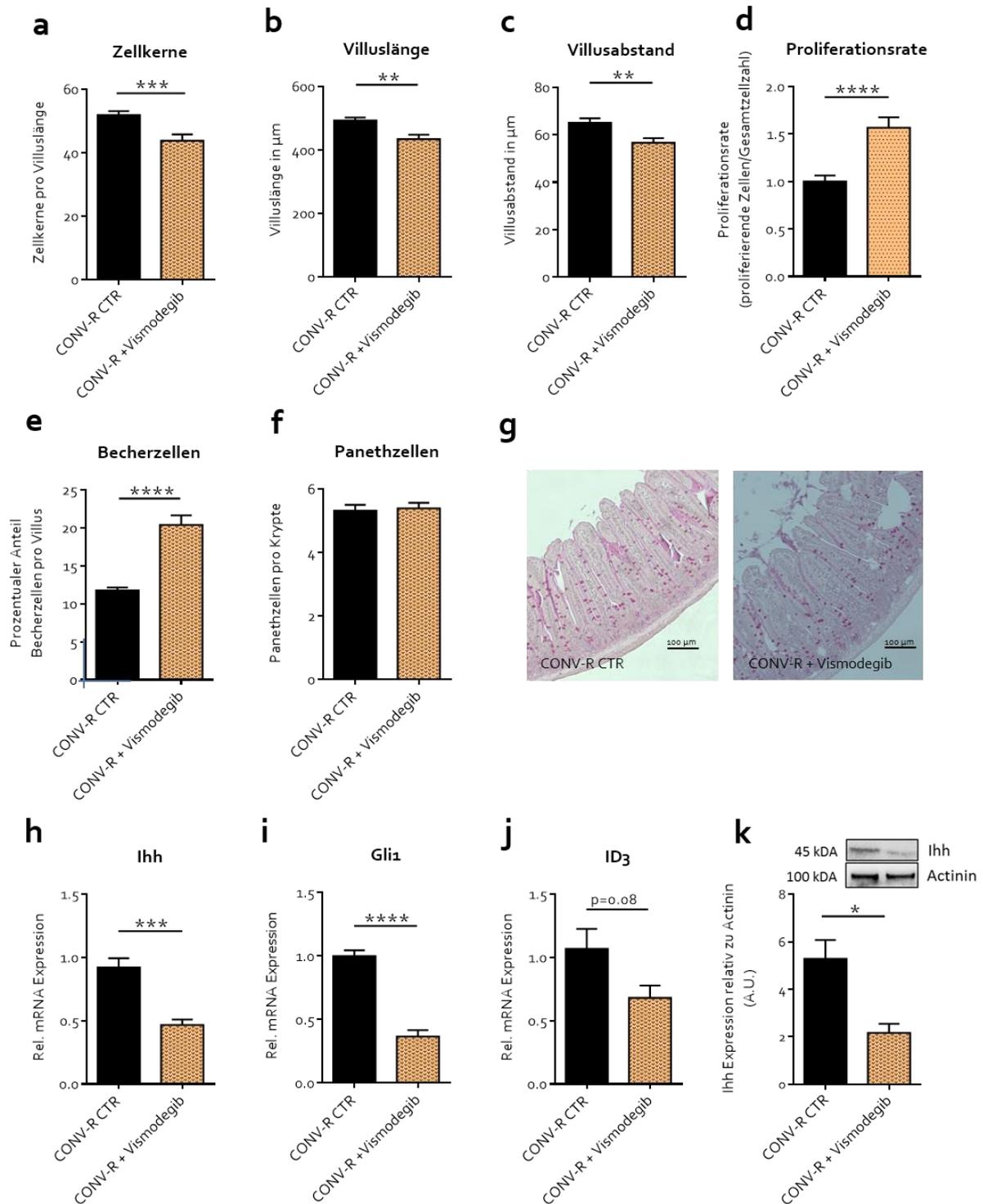


Abbildung 6.4 Hedgehog-Signalweg-Inhibierung induziert Veränderungen in der Villusmorphologie, steigert die Zellproliferation und erhöht die Differenzierung in Becherzellen

Abgebildet sind **a** Zellkerne pro Villuslänge, **b** Villuslänge, **c** Villusabstand, **d** Proliferationsrate (proliferierende Zellen pro Gesamtzellen eines Villus), **e** Prozentualer Anteil an Becherzellen pro Villus, **f** Panethzellen pro Krypte, **g** PAS-Färbungen von Becherzellen im distalen Dünndarm, **h** Ihh mRNA Expression, **i** Gli1 mRNA Expression, **j** ID3 mRNA Expression und **k** Ihh Proteinexpression von CONV-R und CONV-R Vismodegib-behandelten Mäusen ($n=3,4$, C57BL/6J Mäuse). Die RNA Expressionen wurden im Vergleich zum ribosomalen Protein L32 ausgewertet. Die Ihh Proteinexpression wurde im

6 Ergebnisse und Diskussion

Vergleich zu Actinin bestimmt. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,005$; **** = $P < 0,001$.

Betrachtete man die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges über 7 Tage, zeigte sich eine deutliche Zunahme der Villuslänge (**Abbildung 6.5 b**) und des Villusabstandes (**Abbildung 6.5 c**). Die Proliferationsrate sank stark durch die Hedgehog-Signalweg-Aktivierung (**Abbildung 6.5 d**). Die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge blieb unverändert (**Abbildung 6.5 a**), ebenso der prozentuale Anteil der Becherzellen (**Abbildung 6.5 e**) und die Anzahl der Panethzellen (**Abbildung 6.5 f**). Die erhöhte Ihh-Proteinexpression unterstützte den Befund einer funktionalen Aktivierung des Hedgehog-Signalweges (**Abbildung 6.5 g**).

Wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt, sind die Villusmorphologieparameter Villuslänge und Villusabstand von konventionell-aufgewachsenen im Vergleich zu keimfreien Mäusen verkürzt und eine geringere Anzahl an Zellkernen pro Villuslänge ist vorzufinden. Die Expression der Hedgehog-Signalweg-Moleküle ist bei konventionell-aufgewachsenen Mäusen stark reduziert. Eine Aktivierung des Hedgehog-Signalweges mittels Purmorphamin führte zu einer Verlängerung der *Villi intestinales* und einer Zunahme des Villusabstandes. Die Purmorphamin-Gabe führte bei den genannten Villusmorphologieparameter also zu einer Veränderung in Richtung des keimfreien Zustands (**Abbildung 6.2 b, c**). Die erwartete Veränderung war auch bei der Proliferationsrate zu beobachten (**Abbildung 6.5 d**). Die Proliferationsrate wurde durch Aktivierung des Hedgehog-Signalweges im konventionellen Zustand stark reduziert. Die Anzahl der Zellkerne blieb nach einer siebentägigen Behandlung unverändert. Bei diesem Villusparameter scheinen entweder noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen oder der Behandlungszeitraum war nicht ausreichend, um die Anzahl der Zellkerne zu erhöhen. Möglicherweise spielt eine veränderte Apoptoserate zwischen den betrachteten Gruppen eine Rolle. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen war ebenfalls kein Einfluss des Hedgehog-Aktivators auf den prozentualen Anteil an Becherzellen zu beobachten.

Vismodegib wird als potenter Wirkstoff bei Basalzellkarzinomen eingesetzt (Erivedge[®], Roche). In der Literatur finden sich keinerlei Hinweise auf Auswirkungen von Vismodegib auf die Mikrobiota-Zusammensetzung. Auch sind keine Wechselwirkungen mit Immunrezeptoren beschrieben. Daher bleibt anzunehmen, dass die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges durch Vismodegib die in **Abbildung 6.4** dargestellten Änderungen der Villusmorphologieparameter auslöst. Um andere mögliche Interaktionspartner

auszuschließen, müssten die vorliegenden Versuche auch im keimfreien Mausmodell durchgeführt werden. Ist hier auch eine Verschiebung der Villusmorphologieparameter in Richtung des konventionellen Zustands zu beobachten, ließe sich der direkte Einfluss des Hedgehog-Signalweges auf die Villusmorphologie konkret und abschließend zeigen.

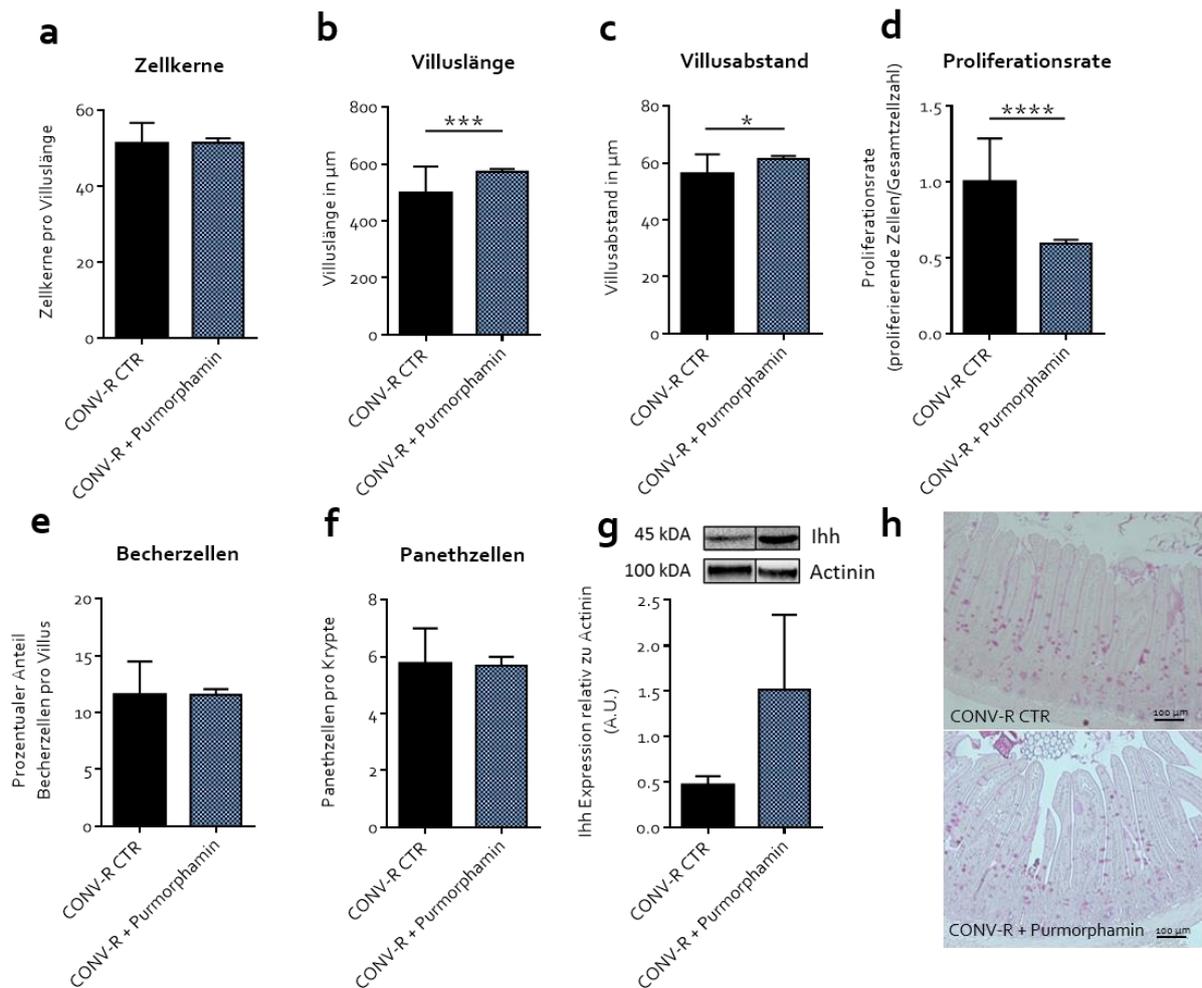


Abbildung 6.5 Hedgehog-Signalweg-Aktivierung induziert Veränderungen in der Villusmorphologie und verringert die Zellproliferation

Abgebildet sind **a** Zellkerne per Villuslänge, **b** Villuslänge, **c** Villusabstand, **d** Proliferationsrate (proliferierende Zellen pro Gesamtzellen eines Villus), **e** Prozentualer Anteil an Becherzellen pro Villus, **f** Panethzellen pro Krypte, **g** Ihh Proteinexpression im Vergleich zu Actinin und **h** PAS-Färbungen von Becherzellen im distalen Dünndarm von CONV-R und CONV-R Purmorphamin-behandelten Mäusen ($n=4,5$ C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,005$; **** = $P < 0,001$.

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Hedgehog-abhängige Villusmorphologie-Adaption liefert das durchgeführte Purmorphamin-Experiment. Hier zeigten sich die erwarteten Trends bei der Villuslänge, dem Villusabstand und der Proliferationsrate.

Zusammenfassend kann auch durch diese Kontrollexperimente, in dem der Hedgehog-Signalweg gezielt inhibiert sowie aktiviert wurde, der unmittelbare Einfluss des Hedgehog-Signalweges auf die Villuslänge, den Villusabstand und die Proliferation im adulten distalen Dünndarm beschrieben werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Villusmorphologie auch im adulten Organismus direkt Hedgehog-Signal-abhängig reguliert ist.

6.5 Toll-like Rezeptor 2 bestimmt die Adaption der Villusmorphologie

Wie einleitend erwähnt, erkennt das angeborene Immunsystem Mikroorganismen über Mustererkennungsrezeptoren. Eine Unterkategorie stellen die Toll-like Rezeptoren dar. Diese identifizieren spezielle mikrobielle Komponenten, die Pathogen-assoziierten molekularen Muster, die essentiell für das Überleben von Mikroorganismen und somit hoch konserviert in diesen vorzufinden sind. Der Toll-like Rezeptor 2 wird auf intestinalen Epithelzellen exprimiert und ist an der Immunhomeostase beteiligt⁹². Da bei den vorhergehenden Analysen gezeigt werden konnte, dass die Villusmorphologie Mikrobiota-abhängig reguliert wird, sollte nun untersucht werden, ob der Immunrezeptor TLR2 an diesen Adaptierungsprozessen beteiligt ist. Hierfür wurden konventionell-aufgewachsene *Tlr2*^{-/-}-Mäuse zur Analyse herangezogen sowie Wildtyp-Mäuse als Kontrolle.

Unsere Gruppe konnte 2014 zeigen, dass in keimfreien Mäusen TLR2 vermindert exprimiert wird und diese verminderte Expression die Proliferation beeinflusst³². Durch diesen Befund kann die veränderte Villusmorphologie in *Tlr2*-defizienten Mäusen erklärt werden: in keimfreien Mäusen war die TLR2-Expression vermindert und die Anzahl der Zellkerne war gegenüber konventionell-aufgewachsenen Mäusen erhöht (**Abbildung 6.2 a**). Die gleichen Veränderungen zeigten sich in CONV-R Mäusen bei einer *Tlr2*-Defizienz (**Abbildung 6.6 a**). Zieht man denselben Vergleich für die Villuslänge und den Villusabstand (**Abbildung 6.2 b, c**), konnte die Beteiligung des Toll-like Rezeptors 2 zudem für die Erhöhung der Villuslänge (**Abbildung 6.6 b**) und des Villusabstandes (**Abbildung 6.6 c**) nachgewiesen werden.

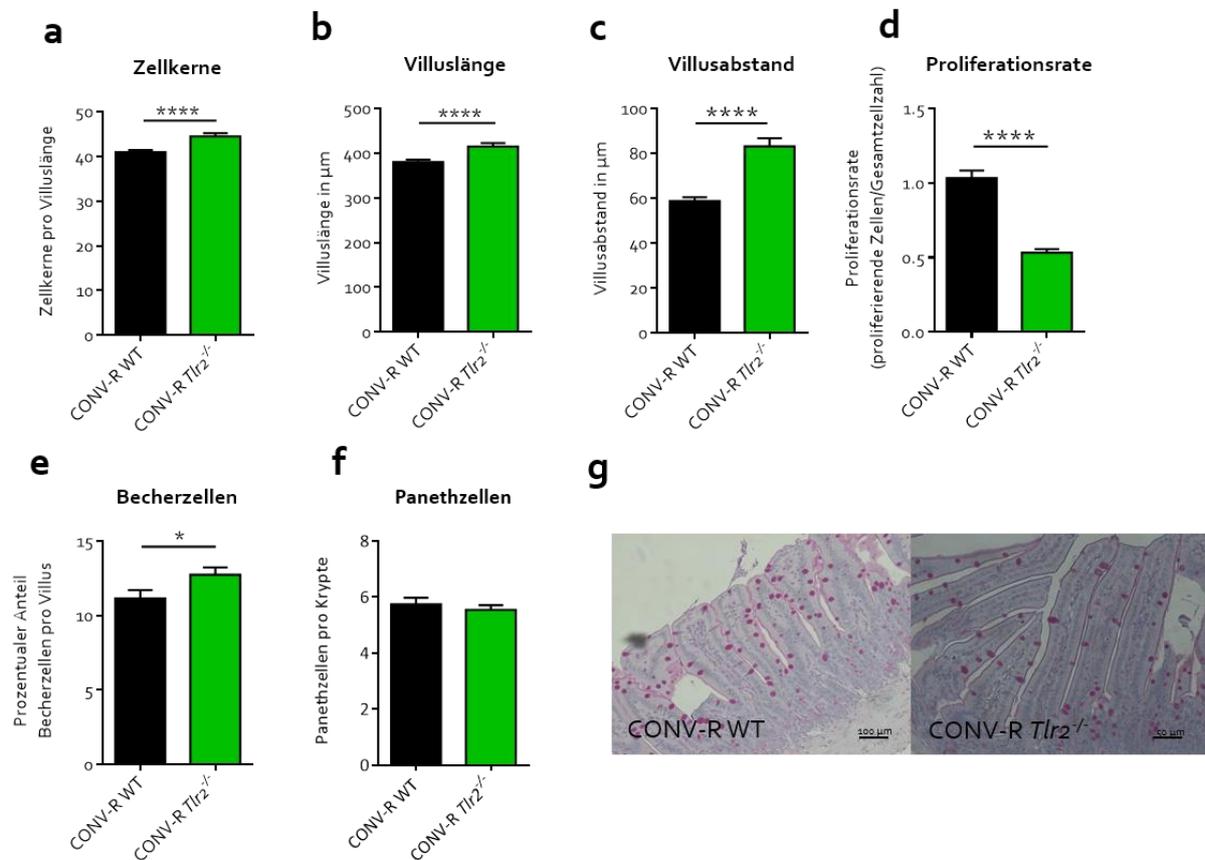


Abbildung 6.6 Toll-like Rezeptor 2 ist maßgeblich an der Adaption der Villusmorphologie beteiligt und beeinflusst die Proliferation.

Abgebildet sind **a** Zellkerne pro Villuslänge, **b** Villuslänge, **c** Villusabstand, **d** Proliferationsrate intestinaler Zellen, **e** Prozentualer Anteil an Becherzellen pro Villus, **f** Anzahl Panethzellen pro Krypte, **g** Krypttiefe und **h** PAS-Färbungen des distalen Dünndarms von CONV-R WT und CONV-R *Tlr2*^{-/-} Mäusen ($n=5-7$, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = $P < 0,05$; **** = $P < 0,001$.

Auch führte die verminderte Expression des TLR2 in keimfreien Mäusen zu einer verminderten Proliferation³². Diese ist auch in *Tlr2*-defizienten CONV-R Mäusen zu finden (**Abbildung 6.6 d**). Der TLR2 könnte auch bei der Differenzierung der epithelialen Linie in Becherzellen eine Rolle spielen (**Abbildung 6.6 e, g**). Im Gegensatz zu den Becherzellen war die Anzahl an Panethzellen TLR2-unabhängig reguliert (**Abbildung 6.6 f**).

Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass die Anzahl der Zellkerne, die Villuslänge und der Villusabstand TLR2-abhängig reguliert werden und die Proliferation durch eine *Tlr2*-Defizienz beeinträchtigt wird. Die Differenzierung von Becherzellen aus der Stammzellnische ist jedoch nicht klar auf die Regulation durch den TLR2 zurückzuführen. Es wäre zu erwarten, dass durch eine *Tlr2*-Defizienz der prozentuale Anteil

an Becherzellen abnimmt und mehr dem keimfreien Zustand gleicht (**Abbildung 6.2 f**). In dem vorliegenden Ergebnis steigt der prozentuale Anteil an Becherzellen in konventionellen *Tlr2*^{-/-} C67BL/6J Mäusen (**Abbildung 6.6 e**) jedoch im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen an. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Beteiligung des TLR₄ an der Becherzellendifferenzierung liefern. 2012 zeigten Sodhi et. al., dass TLR₄ die Becherzellentwicklung reguliert¹⁹³. Unsere Gruppe zeigte eine erhöhte TLR₄-Expression in *Tlr2*^{-/-} Mäusen³². Diese erhöhte Expression könnte im Fall der *Tlr2*-Defizienz für die vermehrte Becherzellendifferenzierung verantwortlich sein.

6.6 Toll-like Rezeptor 2 wirkt auf Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion

Um zu überprüfen, ob die über TLR₂ regulierten Mikrobiota-abhängigen Veränderungen der Villusmorphologie durch die genannten morphogenetischen Signaltransduktionswege hervorgerufen werden, wurde im Folgenden deren mRNA-Expression sowie die Proteinexpressionen von Ihh und Gli1 untersucht.

Die *Tlr2*-Defizienz in CONV-R Mäusen führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA Expressionen von Ihh, Shh, BMP₄ und BMP₇ im distalen Dünndarm (**Abbildung 6.7 a, b, h, i**). Eine erhöhte mRNA Expressionen der untersuchten Zielgene Gli1 und Wnt5A in *Tlr2*-defizienten Mäusen war ebenfalls erkennbar (**Abbildung 6.7 c, l**). Die Proteinexpressionen der Hedgehog-Signalkomponenten Ihh und Gli1 waren durch eine *Tlr2*-Defizienz signifikant erhöht (**Abbildungen 6.7 m, n**) Diese Unterschiede in den Expressionsmustern im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren erklärten die im vorangegangenen Abschnitt beobachtete erniedrigte Proliferationsrate (**Abbildung 6.6 d**) und die Änderungen in der Villusmorphologie (**Abbildung 6.7 a-c**). In keimfreien Mäusen ist wie in **Abbildung 6.3** gezeigt, die mRNA der gewählten Zielgene auch erhöht exprimiert, die Proliferationsrate erniedrigt und die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge, die Villuslänge und der Villusabstand verlängert, beziehungsweise erhöht. Die mRNA Expression der Hh-Zielgene Gli2 und Gli3 (**Abbildung 6.7 d, e**) sowie der BMP-Rezeptoren zeigten sich bei *Tlr2*-defizienten Mäusen unverändert (**Abbildung 6.7 f, g**). Dies mündete in einer unveränderten Expression von ID₃, Wnt11 und Wnt5A (**Abbildung 6.7 j-l**).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine *Tlr2*-Defizienz zu einer erhöhten Expression von *Ihh*, *Shh*, *Gli1*, *BMP4* und *BMP7* führt (Abbildungen 6.7 a-c, h, i, m, n). Diese veränderten Expressionsmuster scheinen für die Erhöhung der Zellkerne pro Villuslänge, der Villuslänge, des Villusabstandes sowie der Erniedrigung der Proliferationsrate essentiell zu sein (Abbildungen 6.6 a-d).

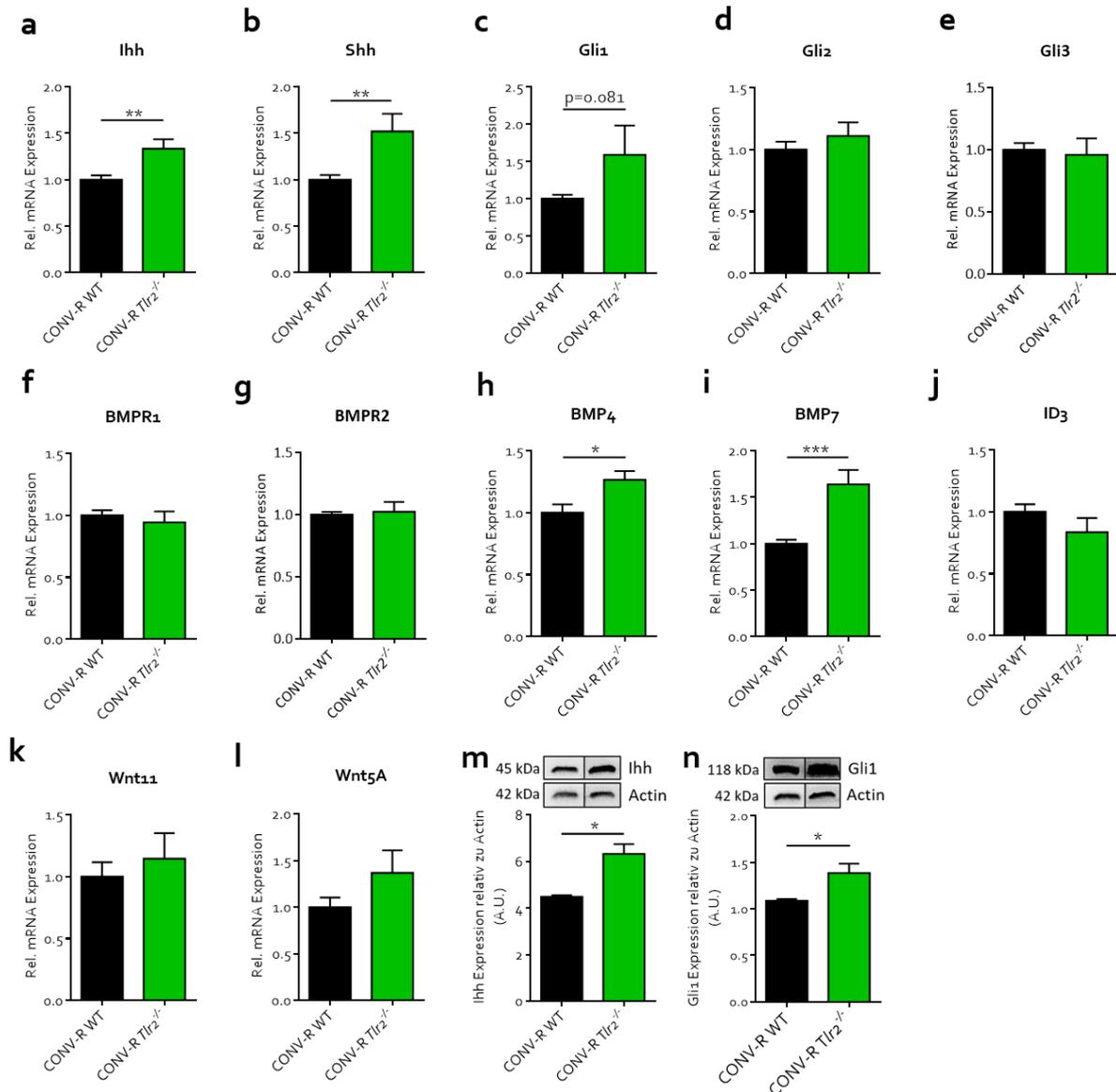


Abbildung 6.7 Toll-like Rezeptor 2 beeinflusst Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion

Abgebildet sind die relativen mRNA Expressionen von **a** *Ihh*, **b** *Shh*, **c** *Gli1*, **d** *Gli2*, **e** *Gli3*, **f** *BMPR1*, **g** *BMPR2*, **h** *BMP4*, **i** *BMP7*, **j** *ID3*, **k** *Wnt11* und **l** *Wnt5A* im Vergleich zu L32 sowie **m** *Ihh* und **n** *Gli1* Proteinexpressionen im Vergleich zu Actin von CONV-R WT und CONV-R *Tlr2*^{-/-} Mäusen (n=5-7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,005; **** = P < 0,001.

6 Ergebnisse und Diskussion

Unsere Gruppe konnte 2014 in der Epithelzelllinie MODE-K zeigen, dass durch die Behandlung mit Peptidoglykan, einem TLR2-Agonisten, die Proliferation der Epithelzellen signifikant zunimmt, während durch siRNA gegen TLR2 die Proliferation signifikant abnimmt³². Hier konnten diese Erkenntnisse *in vivo* belegt werden. Dies spricht dafür, dass das Fehlen des TLR2 in den Epithelzellen die mRNA-Spiegel von *Ihh*, *Shh*, *Gli1*, *BMP4* und *BMP7* (**Abbildungen 6.7 a-c, h, i, m, n**) senkt und so die Anzahl der Zellen pro Villuslänge, die Villuslänge, den Villusabstand erhöht und die Proliferationsrate (**Abbildungen 6.6 a-d**) senkt. Genauer verifizieren ließen sich diese Ergebnisse mit einem Mausmodell, das einen selektiven Epithelzell-spezifischen *Tlr2*-Knockout aufweist. Nur so könnte man genau klären, ob der auf der epithelialen Linie exprimierte-TLR2 die Mikrobiota-vermittelte Regulation der Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signalwege überträgt und damit für die genannten veränderten Villusmorphologieparameter verantwortlich ist.

Ein kompletter *Tlr2*-Knockout bedingt auch ein Fehlen des TLR2 auf den Myofibroblasten, Kryptepithelzellen sowie den im Darm vorhandenen Immunzellen und könnte so einen Einfluss auf das Modellsystem nehmen. Deshalb kann eine Beteiligung dieser Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Bisherige Arbeiten, die die Auswirkungen der Stimulation von TLRs auf Myofibroblasten untersuchen, fokussieren stets auf die immunregulatorische Rolle dieser Zellen bei der adaptiven Immunität^{194,195}. Kryptepithelzellen exprimieren ebenfalls TLRs¹⁹⁶ und werden durch die Mikrobiota beeinflusst¹⁹⁷. Über die Mechanismen und deren Auswirkungen wird aktuell geforscht¹⁹⁷. Bisher ist kein Zusammenhang zwischen Myofibroblasten- oder Kryptepithelzell-exprimiertem TLR2 oder eine Auswirkung auf die Proliferation beziehungsweise Adaption der Villusmorphologie beschrieben. Dementsprechend scheinen die erniedrigten mRNA-Spiegel bzw. Proteinspiegel von *Ihh*, *Shh*, *Gli1*, *BMP4* und *BMP7* (**Abbildungen 6.7 a-c, h, i, n, m**) sowie die einhergehenden veränderten Villusmorphologieparameter (**Abbildungen 6.6 a-d**) ein Epithelzell-spezifisches Ereignis zu sein.

6.7 Die Mikrobiota prägt den Villusabstand und reguliert die Proliferation und die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge über Toll-like Rezeptor 2 im distalen Dünndarm

Um genau zu lokalisieren auf welche Villusmorphologieparameter die kommensale Mikrobiota ihren Einfluss über den Toll-like Rezeptor 2 nimmt, wurden vergleichsweise zu den konventionell-aufgewachsenen Wildtypen und *Tlr2*-defizienten Mäusen die keimfreien Wurfgeschwister auf deren Villusmorphologie untersucht. Zusätzlich wurden die Komponenten des Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signalweges analysiert.

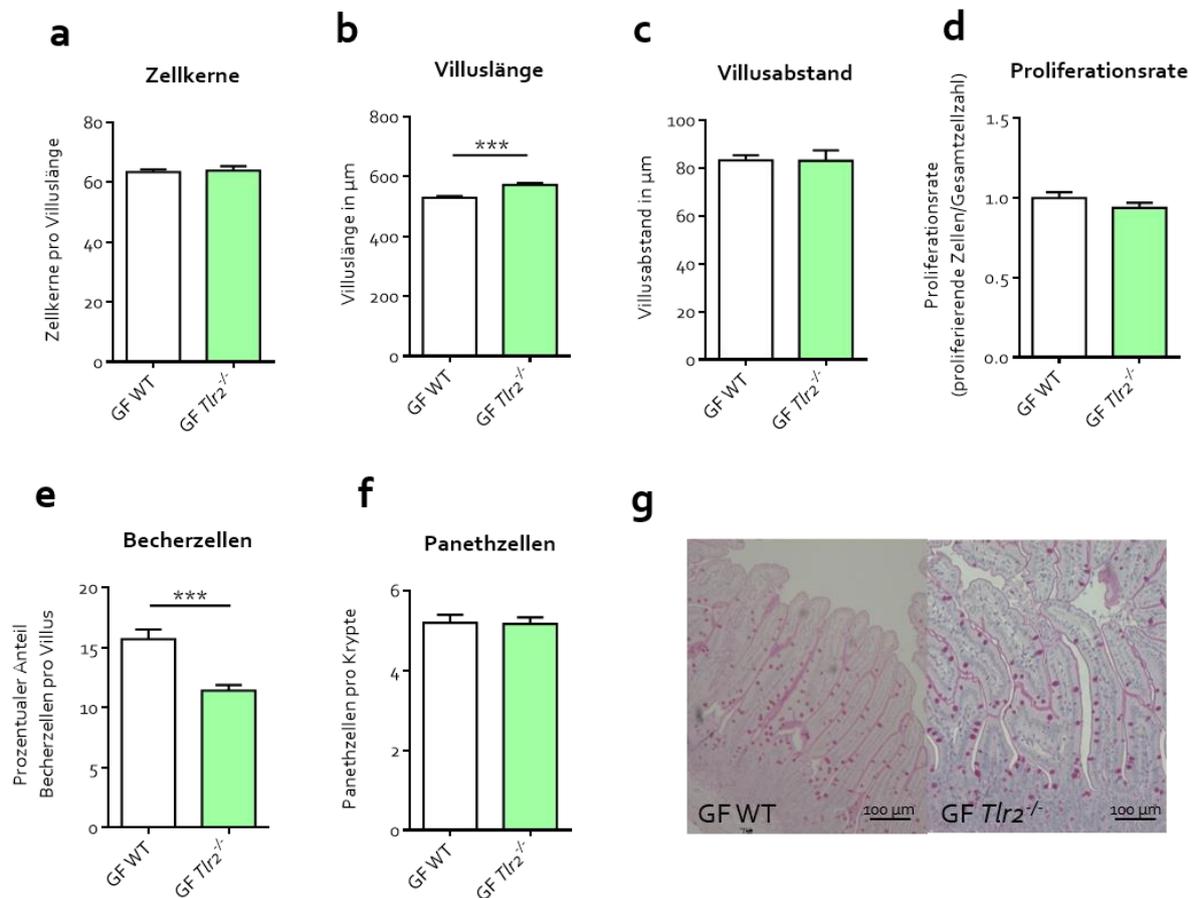


Abbildung 6.8 Mikrobiota prägt den Villusabstand und reguliert die Proliferation über Toll-like Rezeptor 2 im distalen Dünndarm

Abgebildet sind **a** Zellkerne pro Villuslänge, **b** Villuslänge, **c** Villusabstand, **d** Proliferationsrate intestinaler Zellen, **e** Prozentualer Anteil an Becherzellen pro Villus, **f** Anzahl Panethzellen pro Krypte und **h** PAS-Färbungen des distalen Dünndarms von GF WT und GF *Tlr2*^{-/-} Mäusen (n=5-7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. *** = $P < 0,005$;

6 Ergebnisse und Diskussion

Im keimfreien System war die Anzahl der epithelialen Zellkerne zwischen WT und *Tlr2*-defizienten Mäusen im distalen Dünndarmsegment unverändert (**Abbildung 6.8 a**). Die Villuslänge war in den keimfreien Mäusen im Falle der *Tlr2*-Defizienz erhöht (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **b**). Bei diesem Villusmorphologieparameter scheint möglicherweise ein weiterer Immunrezeptor für dessen Regulation verantwortlich zu sein. Interessant wird es bei dem Villusmorphologieparameter Villusabstand: zum einen zeigte sich dieser unverändert zwischen den untersuchten Gruppen in Abwesenheit einer kommensalen Mikrobiota (**Abbildung 6.8**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **c**), zum anderen lag der gefundene durchschnittliche Villusabstand von 80 μm auch bei den CONV-R *Tlr2*^{-/-}-Mäusen vor (**Abbildung 6.6 c**). Die Proliferationsrate zeigte sich im keimfreien Zustand zwischen den beiden Gruppen ebenfalls unverändert (**Abbildung 6.8 d**). Betrachtete man den Unterschied im prozentualen Anteil an Becherzellen (**Abbildung 6.8**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **e**), wurde klar, dass hier ein anderer Immunrezeptor für deren Mikrobiota-abhängige Regulation zum Tragen kommen muss (**Abbildung 6.2 f, h**). Die Anzahl der Panethzellen zeigten sich auch in diesem Experiment gleichbleibend zwischen den betrachteten Gruppen (**Abbildung 6.8 f**).

In Übereinstimmung mit den unveränderten Villusmorphologieparametern (Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge, Villusabstand, Proliferationsrate, **Abbildungen 6.8 a, c, d**) war die mRNA Expression der untersuchten Komponenten des Hedgehog-, Bone Morphogenetic Proteins- und Wnt-Signalweges im Dünndarm der keimfreien WT Mäuse im Vergleich zu den keimfreien *Tlr2*^{-/-} Mäusen gleichbleibend (**Abbildungen 6.9 a-k**).

Grundsätzlich konnte durch diese Analysen gezeigt werden, dass die kommensale Mikrobiota mittels Toll-like Rezeptor 2 über den Hedgehog- sowie den Bone Morphogenetic Protein-Signalweg den Villusabstand, die Anzahl der Zellkerne pro Villus sowie die Proliferationsrate in den Krypten steuert (**Abbildung 6.6 a, c, d**, **Abbildung 6.7 a-c, h, i, m n**, **Abbildung 6.8 a, c, d**, **Abbildung 6.9 a-c, h, i**)

Hier wurde erstmals eine Verbindung zwischen Toll-like Rezeptor 2-Signaltransduktion und den morphogenetischen Signalwegen hergestellt. Neben der in **Kapitel 6.6** diskutierten näheren Betrachtungsweise des epithelspezifischen *Tlr2*-Knockouts müssen die Kreuzvernetzungen des TLR2- und des Hedgehog-Signalweges im Detail untersucht werden.

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass eine *Tlr2*-Defizienz die Hedgehog-Signaltransduktion beeinflusst (Abbildung 6.7 a-c, n, m).

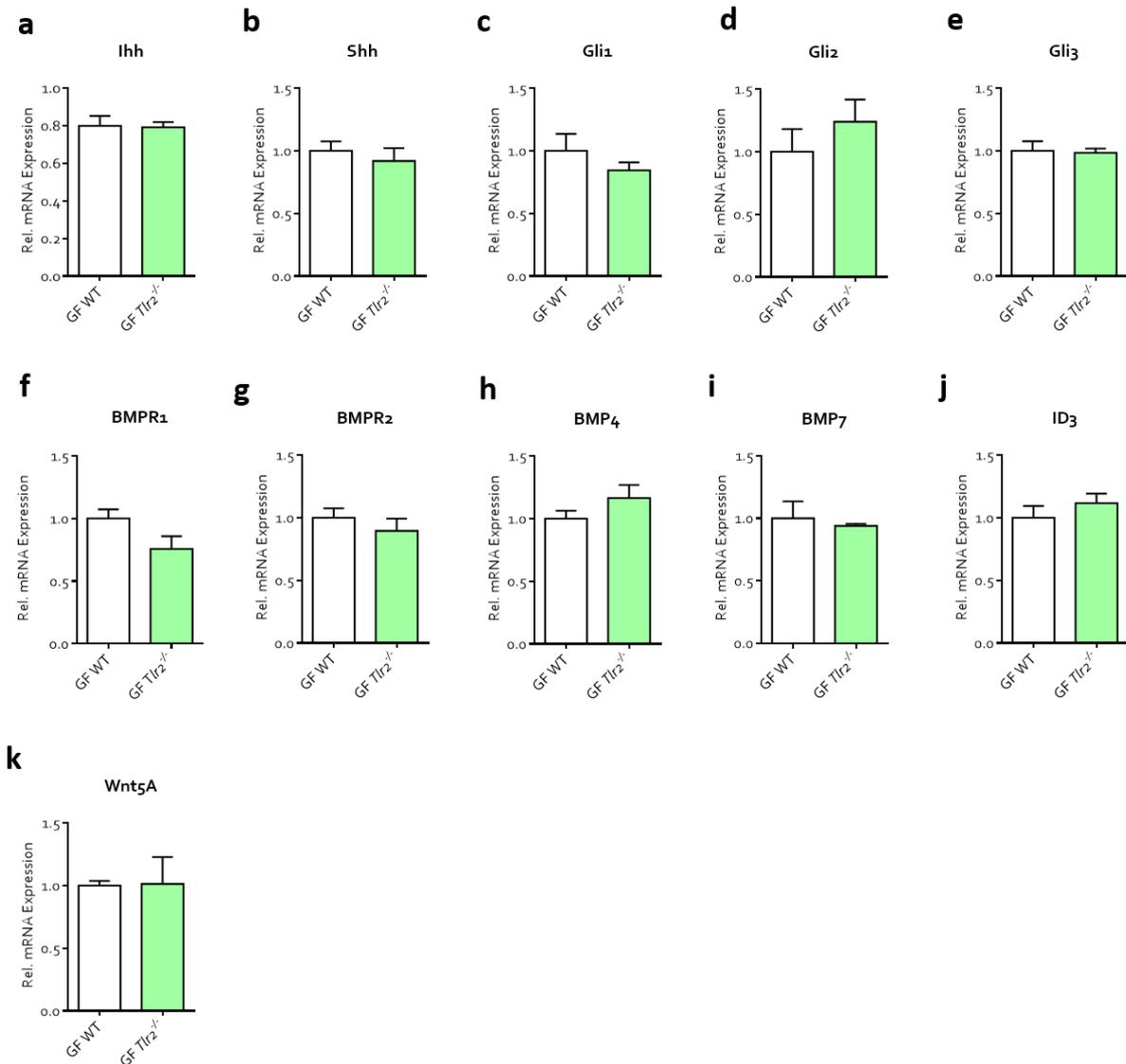


Abbildung 6.9 Hedgehog-, Bone Morphogenetic Protein- und Wnt-Signaltransduktion bleiben im keimfreien Zustand durch *Tlr2*-Defizienz unverändert

Abgebildet sind die relativen mRNA Expressionen von a) *Ihh*, b) *Shh*, c) *Gli1*, d) *Gli2*, e) *Gli3*, f) *BMPR1*, g) *BMPR2*, h) *BMP4*, i) *BMP7*, j) *ID3* und k) *Wnt5A* im Vergleich zu L32 von GF WT und GF *Tlr2*^{-/-} Mäusen (n=5-7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M.

Ein potentielles Bindeglied zwischen der Toll-like Rezeptor-Signaltransduktion und dem Hedgehog-Signalweg könnte die Protein Kinase C-Familie (PKC) darstellen. PKC ist eine Familie an Serin/Threonin-Kinasen, die in vielen verschiedenen Signalwegen der Zelle eine Rolle spielt¹⁹⁸. Die Klasse der Protein Kinase C scheint mitverantwortlich für die

6 Ergebnisse und Diskussion

Tumorentstehung und -entwicklung zu sein und einen Einfluss auf die Proliferation zu haben^{198,199}.

Heo et. al. zeigten 2007 *in vitro*, dass Shh die PKC-Aktivität erhöht und dadurch die Proliferation in Stammzellen der Maus steuert²⁰⁰. In den letzten Jahren zeigte sich zudem, dass Protein Kinase C auch während der TLR-Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt. Die Isoformen der Protein Kinase C assoziieren mit den TLRs oder den Adaptermolekülen und sind in der nachgeschalteten Übertragung des TLR-Signals beteiligt²⁰¹. Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass die PKC auch einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg nimmt^{202,203}. Der Wnt-Signalweg wird wiederum Hedgehog-Signal-abhängig reguliert (**Abbildung 2.9**). In weiterführenden Analysen müsste daher die potentielle Kreuzvernetzung zwischen TLR- und Hedgehog-Signalwegen erforscht werden, um zu klären über welche Signalmechanismen die Proliferation beeinflusst wird.

Durch die bei StarSeq in Auftrag gegebenen Sequenzierungsergebnisse der konventionell-aufgewachsenen Wildtyp und *Tlr2*^{-/-} C57BL/6J Mäuse, konnte gezeigt werden, dass durch eine *Tlr2*-Defizienz die Zusammensetzung der Mikrobiota auf Phylum-Ebene unbeeinflusst ist (**Abbildung 9.2**).

In der vorliegenden Arbeit konnten somit die Einflüsse des komplexen Gesamtmikrobioms auf die morphogenetischen Signalwege unter Berücksichtigung des TLR2 untersucht werden. Ein weiterer Schritt wäre es, konkrete Agonisten des TLR2 zu finden, die die Hedgehog-aktivierte Proliferation steuern. Ein dafür geeignetes Versuchsmodell wäre die vergleichende Gabe verschiedener TLR2-Agonisten in CONV-R und GF C57BL/6J Mäusen, um herauszufinden, welcher Ligand über welches TLR2-Heterodimer die Hedgehog- und BMP-Signalweg vermittelten Villusmorphologieparameter beeinflusst. Anschließend könnte durch die Besiedlung keimfreier Mäuse durch minimale mikrobielle Konsortien (z.B. *Altered Schaedler Flora*²⁰⁴) beziehungsweise einzelnen Mikroorganismen die Beteiligung der Mikroorganismen ausgemacht werden, die eine Adaption der Villusmorphologie bewirken. Ein mögliches unterstützendes Werkzeug in der Untersuchung verschiedener Konstellationen bakterieller Gemeinschaften untereinander und in Interaktion dieser mit dem Wirt ist die Bioinformatik^{205,206}.

Zudem wäre es sicherlich sinnvoll Sequenzierungsergebnisse in neuer Form einem breiteren Forscherkreis zugänglich zu machen. Ein wesentliches Problem ist ein riesengroßer Fundus an Daten, den jede Forschergruppe nur sehr individualistisch für die eigene Fragestellung ausschöpft.

6.8 Der Mikrobiota-regulierte Hedgehog-Signalweg beeinflusst die Barrierefunktion des distalen Dünndarmepithels

Immer mehr Hinweise deuten auf einen Zusammenhang zwischen Permeabilität, Krebsentstehung und einer Rolle der Mikrobiota in diesen Prozessen hin^{50-53,55,77}. Dementsprechend sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Hedgehog-Signal-abhängige Veränderung der Villusmorphologie (Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge, Villuslänge, Villusabstand, Proliferationsrate, prozentualer Anzahl an Becherzellen, **Abbildungen 6.2, 6.4**) auch mit einem Einfluss auf die Darmpermeabilität in Verbindung steht. Hierzu wurde zunächst der Einfluss der Mikrobiota auf die Permeabilität überprüft. Diese wurde mittels FITC-Dextran 4000 in keimfreien (GF) sowie konventionell-aufgewachsenen (CONV-R) C57BL/6J Mäusen bestimmt und die mRNA Expression der *Tight Junction* Proteine Occludin und ZO-1 analysiert. Das skizzierte Experiment wurde anschließend mit konventionell-aufgewachsenen Vismodegib-behandelten (CONV-R + Vismodegib) und Kontrolltieren (CONV-R CTR) wiederholt, um eine mögliche Regulation über den Hedgehog-Signalweg zu überprüfen.

Ein in der Literatur beschriebener Regulator der Permeabilität stellt Trefoil Factor 3 (TFF3) dar⁶³. Da dieser von Becherzellen exprimiert wird und die Becherzellendifferenzierung durch die Mikrobiota Hedgehog-Signal-abhängig reguliert wird (**Abbildungen 6.2, 6.3**), sollte das mRNA Expressionsmuster dieses regulierenden Kandidaten in keimfreien, konventionell-aufgewachsenen, Vismodegib-behandelten und Kontrolltieren untersucht werden.

6 Ergebnisse und Diskussion

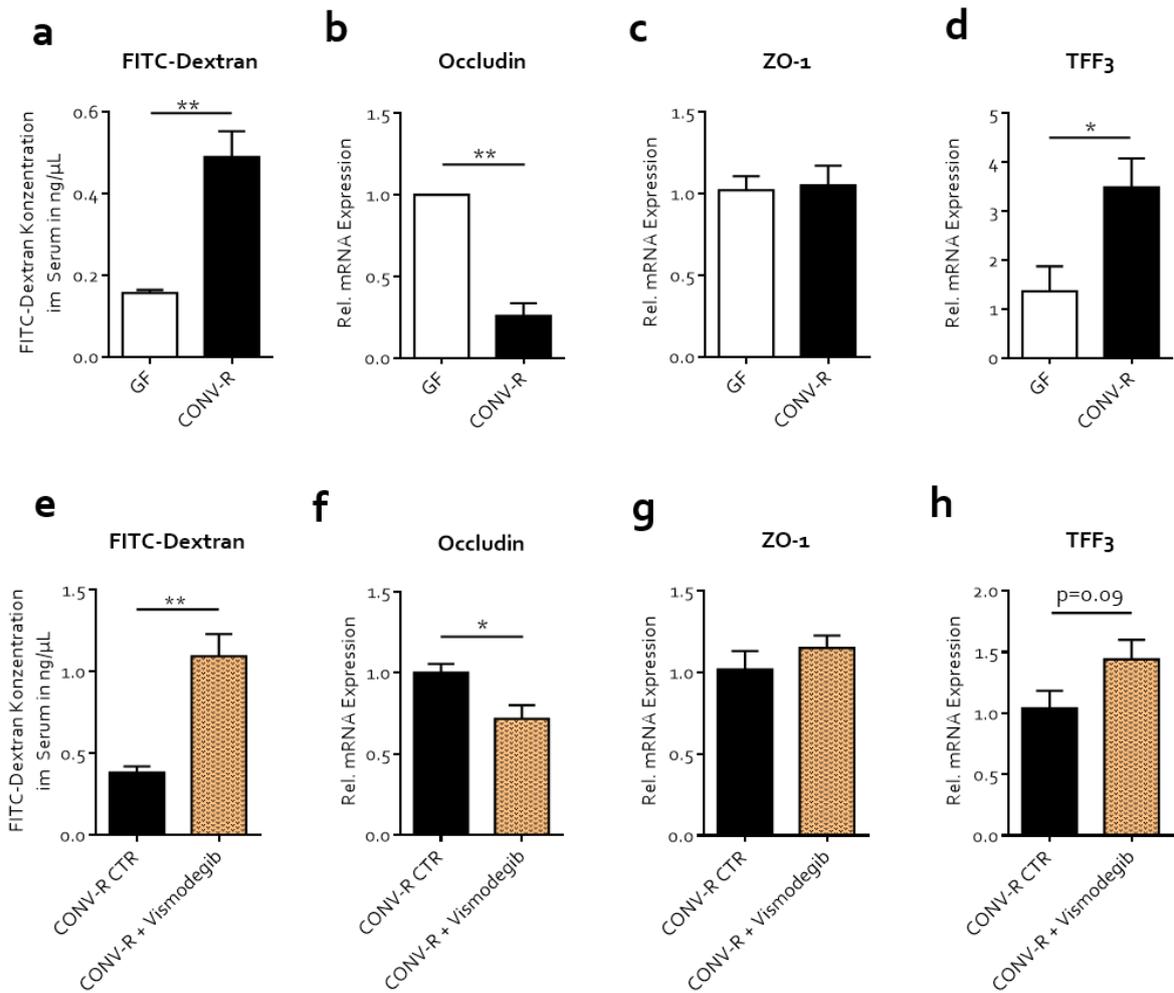


Abbildung 6.10 Der Mikrobiota-abhängige Hedgehog-Signalweg beeinflusst die Permeabilität im distalen Dünndarm

Abgebildet sind **a** die gemessene Konzentration von FITC-Dextran in Serum sowie die relativen mRNA Expressionen von **b** Occludin, **c** ZO-1 und **d** TFF3 im Vergleich zu L32 und von GF und CONV-R WT Mäusen (n=5-7, C57BL/6J Mäuse), zudem **e** die gemessene Konzentration von FITC-Dextran in Serum sowie die relativen mRNA Expressionen von **f** Occludin, **g** ZO-1 und **h** TFF3 im Vergleich zu L32 von CONV-R und CONV-R Vismodegib-behandelten Mäusen (n=3-7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Die Permeabilität für FITC-Dextran 4000 war in konventionell-aufgewachsenen Mäusen gegenüber keimfreien Mäusen signifikant erhöht (**Abbildung 6.10 a**). Verantwortlich für die erhöhte Permeabilität schien Occludin zu sein, dessen mRNA Expression in CONV-R Mäusen signifikant runterreguliert war (**Abbildung 6.10 b**). Die ZO-1 mRNA-Expression lag in beiden Gruppen unverändert vor (**Abbildung 6.10 c**). Interessanterweise war TFF3 in CONV-R Mäusen erhöht exprimiert (**Abbildung 6.10 d**).

Durch die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges war eine signifikant erhöhte Permeabilität zu beobachten (**Abbildung 6.10 e**). Auch hier schien Occludin das ausschlaggebende *Tight*

Junction Protein für die erhöhte Darmpermeabilität zu sein. Occludin lag signifikant vermindert exprimiert vor (**Abbildung 6.10 f**). ZO-1 hingegen zeigte auch in diesem Experiment keine Veränderung zwischen den beiden Gruppen (**Abbildung 6.10 g**). Und auch in dieser Untersuchung war eine erhöhte mRNA Expression des TFF₃ in den Vismodegib-behandelten Mäusen gegenüber der CONV-R Kontrollgruppe zu beobachten (**Abbildung 6.10 h**).

2015 zeigten Nevado et. al. eine reduzierte intestinale Permeabilität in Antibiotika-behandelten Mäusen gegenüber Kontrollmäusen²⁰⁷. Da eine Antibiotikagabe die Diversität der Mikrobiota verringert, kann man diese Ergebnisse mit unseren vergleichen. Sie gehen konform. In konventionell-aufgewachsenen Mäusen sind die Hedgehog-Signalmoleküle gegenüber keimfreien Geschwistertieren runterreguliert (**Abbildung 6.3 a-c**). Diese Mikrobiota-abhängige Signaltransduktion scheint neben den Auswirkungen auf die Villusmorphologie (**Abbildungen 6.1 und 6.2**) auch einen direkten Einfluss auf die Barriere des Dünndarmepithels zu haben (**Abbildung 6.10 a**). Dies wird besonders deutlich, betrachtet man **Abbildung 6.10 e**: die Inhibierung des Hedgehog-Signalweges konventionell-aufgewachsener Mäuse erhöht direkt die Permeabilität des Darms. Bislang ist in der Literatur lediglich der Einfluss von Desert Hedgehog auf die vaskuläre Permeabilität im *Glioblastoma multiforme*, einem aggressiven Tumor des zentralen Nervensystems, beschrieben²⁰⁸. Die vorliegende Arbeit weist erstmals auf einen Mikrobiota-abhängigen Einfluss des Hedgehog-Signalweges auf die Permeabilitätsregulation des Darms hin.

Diese Wirkung scheint durch die geringere Expression von Occludin ausgelöst zu sein (**Abbildungen 6.10 b, f**). Nevado et. al. beschrieben zusätzlich eine verringerte Expression von ZO-1 im Dünndarm konventionell-aufgewachsener im Vergleich zu Antibiotika-behandelten Mäusen²⁰⁷. Die ZO-1-Transkripte lagen in unseren Untersuchungen allerdings unverändert vor. Ebenfalls zeigten Nevado et. al. eine erhöhte Expression von JAM-A, einem weiteren *Tight Junction* Protein, in Antibiotika-behandelten Mäusen, während die Claudin-Familie unbeeinflusst durch die Mikrobiota-Dezimierung blieb²⁰⁷. Die Ergebnisse von Nevado et. al. stützen die von uns gezeigte Mikrobiota-abhängige Regulation der Barriere des Dünndarms (**Abbildung 6.10 a, b**). Zudem können hier erste Befunde für die Mikrobiota-abhängige Regulation der Permeabilität über den Hedgehog-Signalwege gezeigt

werden (**Abbildung 6.10 e, f**). Eine weiterführende Analyse der *Tight Junction* Protein-Expression auf Proteinebene wäre wichtig, um eine Regulation dieser Komponenten zu bestätigen. Zudem müsste der Einfluss des Mikrobiota-regulierten Hedgehog-Signalweges auf die Barrierefunktion des Darms auch im Kontrollexperiment durch Aktivierung des Hedgehog-Signalweges mittels Purmorphamin-Gabe bestätigt werden.

Zusätzlich geklärt werden müsste, über welchen Immunrezeptor die Mikrobiota Hedgehog-Signalweg-vermittelt auf die Permeabilität des Darmepithels wirkt. Geeignete Kandidaten scheinen auch hier der TLR2 und TLR4 zu sein ^{154,209-216}

Trefoil Factor 3 wird mit der Regulation der Permeabilität in Zusammenhang gebracht. Buda et al beschrieben *in vitro* einen aktivierenden Effekt des TFF3 auf die ZO-1 Expression ⁶³. Podolski et. al. zeigten *in vitro*, dass die Expression des TFF3 TLR2-abhängig reguliert wird und einen protektiven Effekt auf das Darmepithel hat ⁶¹. Auch wird TFF3 als potentieller diagnostischer Marker für die Früherkennung kolorektaler Tumore gehandelt ²¹⁷, welche mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität in Verbindung gebracht werden ⁵¹.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von TFF3 Mikrobiota-abhängig und Hedgehog-Signal-vermittelt reguliert wird (**Abbildung 6.10 d, h**). Comelli et. al. untersuchten 2008 die mRNA Expression von TFF3 im distalen Dünndarm und Kolon keimfreier und konventionell-aufgewachsener C3H Mäuse ²¹⁸. Comelli et. al. fanden ebenfalls eine Mikrobiota-abhängige Regulation des TFF3. Allerdings war in diesen Untersuchungen die mRNA Expression von TFF3 in keimfreien Mäusen signifikant höher ausgeprägt. Dies widerspricht den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen (**Abbildung 6.10 d**). Comelli et. al. zeigen in ihrer Publikation auch eine signifikant verminderte Muc2-Expression in konventionell-aufgewachsenen Mäusen im Vergleich zu keimfreien C3H Mäusen ²¹⁸. Dies widerspricht ebenfalls unseren Analysen zur Muc2 mRNA Expression in keimfreien und konventionell-aufgewachsenen Mäusen (**Abbildung 9.3**) sowie den Untersuchungen von Schütte et. al. ²¹⁹. Schütte et. al. zeigen eine erhöhte Muc2 Expression in konventionell-aufgewachsenen Mäusen im Vergleich zu den keimfreien Wurfgeschwistern. Da in konventionell-aufgewachsenen Tieren eine erhöhte Becherzelleexpression im Vergleich zu keimfreien Tieren durch mehrere Arbeiten bestätigt wurde (**Abbildung 6.2 f**, ^{171,172}) und

Becherzellen Muc2 und TFF₃ exprimieren, scheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie Schütte et. al. mehr Gewicht zu haben.

Zusammenfassend kann hier gezeigt werden, dass Trefoil Faktor 3 Mikrobiota-abhängig sowie Hedgehog-Signalweg-vermittelt reguliert wird (**Abbildungen 6.10 d, h**). Die möglichen Zusammenhänge zwischen TFF₃, Mikrobiota, Hedgehog-Signalweg, Toll-like Rezeptor 2 und Permeabilität müssen in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

7 Fazit

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung des Einflusses der Mikrobiota auf morphogenetische Signalwege und der Auswirkung auf Proliferation, Morphologie und Permeabilität im Dünndarm adulter C57BL/6J-Mäuse.

Durch die vorliegende Untersuchung konnte erstmals deutlich gezeigt werden, dass die morphogenetischen Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signalwege Mikrobiota-abhängig reguliert sind und so einen direkten Einfluss auf die Proliferation, die Differenzierung von Becherzellen, die Dünndarmmorphologie und Erneuerung der Epithelschicht sowie die Darmbarriere haben. Die Befunde dieser Arbeit erweitern das Verständnis über die physiologische Rolle der kommensalen Mikrobiota bei der Adaption der Dünndarmhomeostase.

Durch den Eingriff in den Hedgehog-Signalweg durch Inhibierung von Smoothed mit Vismodegib *in vivo* ließen sich die Verminderung der Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge und des Villusabstandes, die Verkürzung der Villuslänge sowie die Erhöhung der Proliferationsrate, dem prozentualen Anteil an Becherzellen pro Villus und die Erhöhung der Darmpermeabilität direkt modulieren. Im Gegensatz dazu bewirkte die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges durch Bindung von Purmorphamin an Smoothed eine Verlängerung der Villuslänge, eine Vergrößerung des Villusabstandes und eine Erniedrigung der Proliferationsrate.

Die Anzahl der Zellkerne pro Villuslänge, der Villusabstand und die Proliferation werden Mikrobiota-abhängig über den TLR2-Rezeptor gesteuert. Hier konnte gezeigt werden, dass dieser Mustererkennungsrezeptor den Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktionsweg reguliert.

Nicht abschließend geklärt werden konnte, ob diese Übertragung über den von Epithelzellen exprimierten TLR2 verläuft oder ob hierbei auch andere Zelltypen beteiligt sind. Auch bleibt unklar, wie genau der TLR2-vermittelte Mechanismus in die Signaltransduktionskaskade des Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein -Signalweges eingreift, um die genannten Villusmorphologieparameter zu steuern. Zudem konnte nicht eindeutig abgeklärt werden, welcher Rezeptor in der Adaption der Villuslänge, der Regulation der Permeabilität und der

Differenzierung von Becherzellen eine Rolle spielt und so Mikrobiota-reguliert das Signal hierfür entlang der morphogenetischen Signalwege überträgt.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse über die Interaktionen von Signalwegen, die der Erkennung bakterieller Muster dienen und morphogenetischen Signalwegen, die zusätzlich zur Darmentwicklung und bekanntermaßen auch bei der Entstehung gastrointestinaler Tumore eine zentrale Rolle spielen. Bisher wurden die Mikrobiota, der Hedgehog-, der BMP- und Wnt-Signalweg sowie der TLR2 als mögliche Ziele einer Krebstherapie diskutiert. Die hier erstmalig aufgezeigten Mikrobiota-abhängigen Zusammenspiele der Signalwege und deren Auswirkung auf die Proliferation, den Villusabstand und die Anzahl der Zellkerne pro Villus macht deutlich, dass diese Protagonisten der Epithelzellerneuerung nicht unabhängig voneinander sind, sondern gemeinsam Signale der ‚Außenwelt‘ (Mikrobiota) entlang der Krypt-Villus-Achse integrieren und übertragen und so die Morphologie und Proliferation des Darmgewebes steuern. Im Fall einer Dysbiose oder einer funktionell aktivierenden Mutation des TLR2 könnten die dadurch bedingte Veränderung der morphogenetischen Signalwege also zur Krebsentstehung beitragen. Somit ist es wichtig bei der Suche nach einem geeigneten Krebstarget dieses Zusammenspiel zu berücksichtigen.

8 Ausblick

Zukünftig sollte das Zusammenspiel von Mikrobiota und TLR₄ untersucht werden, um zu evaluieren, ob die Villuslänge sowie der prozentuale Anteil an Becherzellen über diese Interaktion reguliert werden. Riehl et. al. bringen den TLR₄ mit Stammzellproliferation, Krypt- und Darmentwicklung von Mäusen in Verbindung²²⁰, Santaolalla et. al. beschreiben einen aktivierenden Effekt des TLR₄ auf den β -Catenin Signalweg und eine daraus resultierende Neoplasie des Darms²²¹ und erste Hinweise für die TLR₄-regulierte Becherzellendifferenzierung liefert die Arbeit von Sohdi et.al¹⁹³. Für das Aufzeigen einer Mikrobiota-abhängigen Regulation wäre zunächst die Evaluierung der Villusmorphologie in *Tlr4*-defizienten konventionell-aufgewachsenen Mäusen und deren WT-Geschwistertieren notwendig. Liegt die Villusmorphologie verändert durch eine TLR₄-Defizienz vor, so sollten zunächst die morphogenetischen Signaltransduktionskomponenten untersucht werden und anschließend das Versuchspanel im keimfreien Pendant ergänzt werden. So ließe sich möglicherweise die Mikrobiota-abhängige Adaption von Villuslänge und Becherzellen durch eine potentielle Beteiligung des TLR₄ klären.

Die genannten Untersuchungen sollten auch an Epithelzell-spezifischen TLR₄- und TLR₂-Knockout Mäusen durchgeführt werden, denn neben dem TLR₂ ist auch der TLR₄ auf vielen weiteren Zelltypen des Darms exprimiert. Dann könnte neben der Auswirkung auf die Villusmorphologie zudem der Epithelzell-spezifische Einfluss der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 auf die einzelnen Villusmorphologieparameter aufgeklärt werden.

Zudem sollten die zu Grunde liegenden Mechanismen der TLR-Rezeptor- und Hedgehog-Signalweg-Interaktion untersucht werden. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf die mechanistische Interaktion von TLR₂ und dem Hedgehog-Signalweg gelegt werden. Hier wäre die Protein Kinase C-Familie ein potentieller Kandidat^{201,222-224}. Für die Untersuchung würde sich beispielsweise für vorangestellte *in vitro* Versuche die Zelllinien MODE-K (murine Epithelzelllinie²²⁵) oder Caco-2 (humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen²²⁶) eignen. Durch Stimulation mit verschiedener TLR₂-Agonisten könnten die Expressionsmuster der Protein Kinasen C, Gli1 und SuFu analysiert werden. Durch die gezielte Inhibierung oder knock-down Experimente der Protein Kinasen C könnte untersucht werden, ob dadurch Komponenten des Hedgehog-Signalweges beeinträchtigt werden. Zeigt

sich, dass eine der Protein Kinasen C besonders über TLR2-Agonisten stimuliert wird, so wäre eine solche Knockout-Maus von Vorteil, um die Villusmorphologieparameter sowie die Expression der morphogenetischen Signalwege zu untersuchen. Auch sollten bei diesem Mausmodell der Hedgehog-Signalweg aktiviert und inhibiert werden, um mögliche Interaktionen zu validieren.

9 Annex

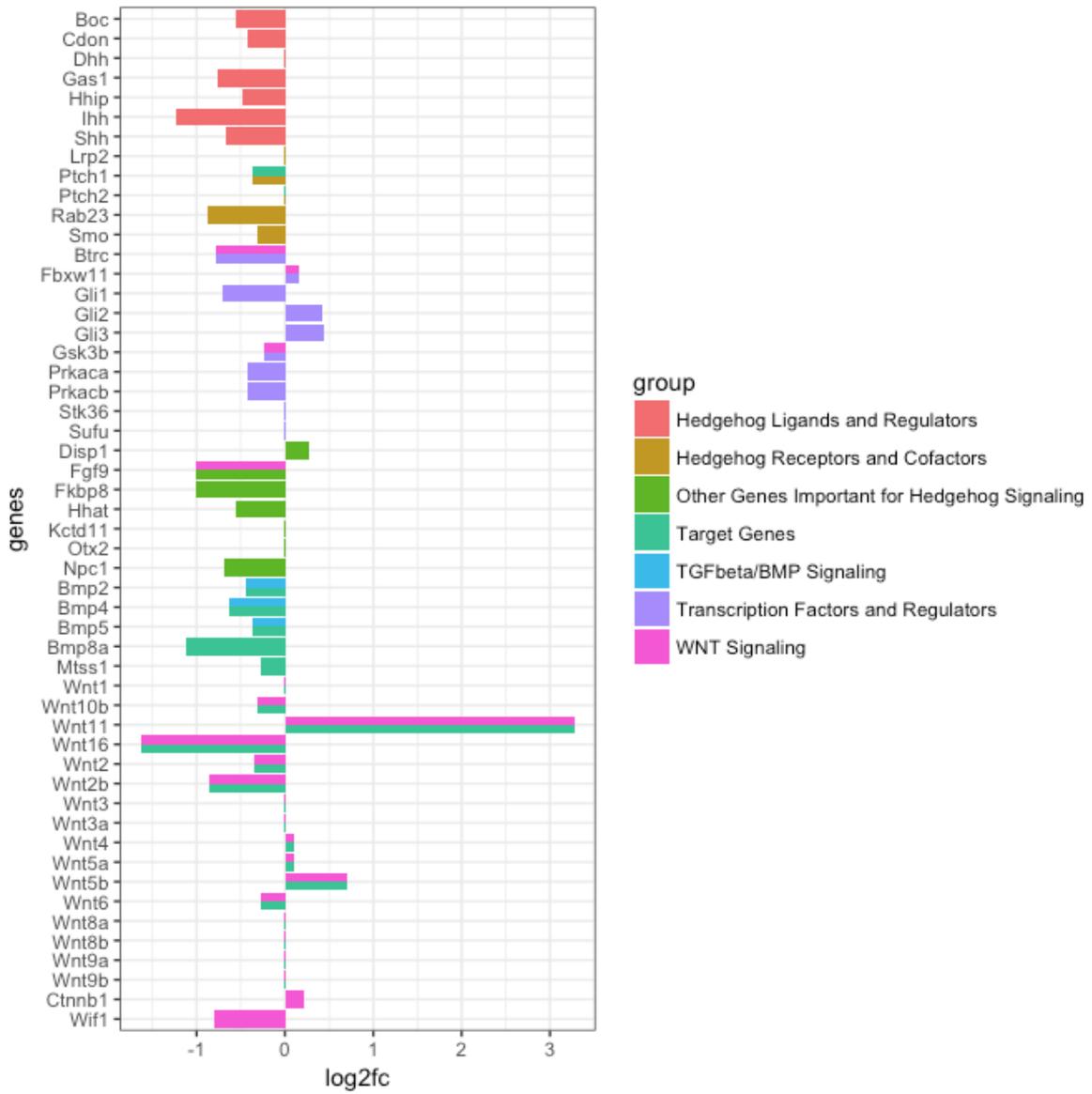


Abbildung 9.1 Hedgehog mRNA-Array

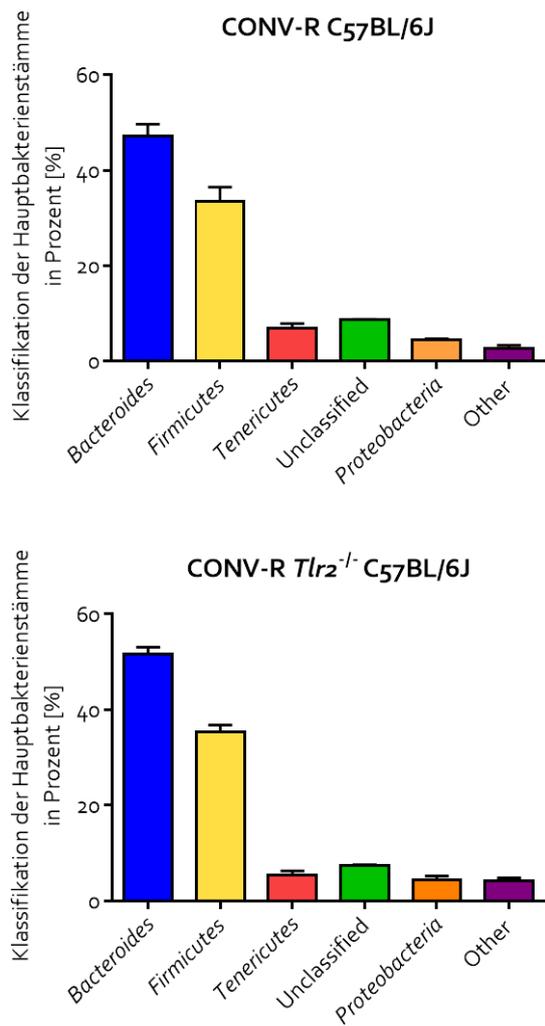


Abbildung 9.2 Sequenzierungsdaten von konventionell-aufgewachsenen Wildtyp und *Tlr2*^{-/-} C57BL/6J Mäusen

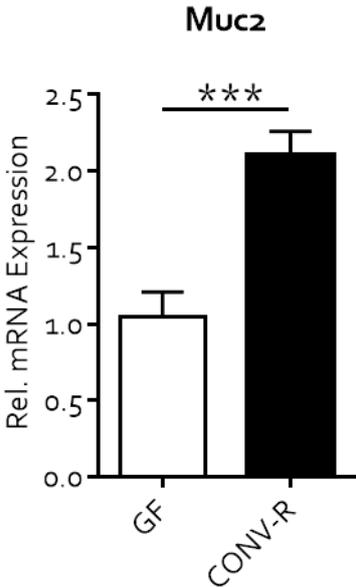


Abbildung 9.3 Muc2 mRNA Expression in keimfreien (GF) und konventionell-aufgewachsenen (CONV-R) C57BL/6J Mäusen

10 Lebenslauf

11 Literatur

- 1 Schroeder, B. O. & Backhed, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine* **22**, 1079-1089, doi:10.1038/nm.4185 (2016).
- 2 Thomas Gensollen, S. S. I., Dennis L. Kasper, Richard S. Blumberg. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539-543 (2016).
- 3 Rapozo, D. C., Bernardazzi, C. & de Souza, H. S. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World Journal of Gastroenterology* **23**, 2124-2140, doi:10.3748/wjg.v23.i12.2124 (2017).
- 4 Blaser, M. J. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* **352**, 544-545 (2016).
- 5 Woting, A. & Blaut, M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients* **8**, 202, doi:10.3390/nu8040202 (2016).
- 6 E., I. Microbiota and Obesity. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **88**, 95-105 (2017).
- 7 Tang, W. H., Kitai, T. & Hazen, S. L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circulation Research* **120**, 1183-1196, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309715 (2017).
- 8 Althani, A. A. *et al.* Human Microbiome and its Association With Health and Diseases. *Journal of Cellular Physiology* **231**, 1688-1694, doi:10.1002/jcp.25284 (2016).
- 9 Barnes, D. & Park, K. T. Donor Considerations in Fecal Microbiota Transplantation. *Current Gastroenterology Reports* **19**, 10, doi:10.1007/s11894-017-0548-y (2017).
- 10 Rieder, R., Wisniewski, P. J., Alderman, B. L. & Campbell, S. C. Microbes and mental health: A review. *Brain, Behavior and Immunity*, **66**, 9-17, doi:10.1016/j.bbi.2017.01.016 (2017).
- 11 Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J. & Abu-Farha, M. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in health and disease* **15**, 108, doi:10.1186/s12944-016-0278-4 (2016).
- 12 Knip, M. & Siljander, H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* **12**, 154-167, doi:10.1038/nrendo.2015.218 (2016).
- 13 Moreno-Indias, I., Cardona, F., Tinahones, F. J. & Queipo-Ortuno, M. I. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Microbiology* **5**, 190, doi:10.3389/fmicb.2014.00190 (2014).
- 14 Paun, A., Yau, C. & Danska, J. S. The Influence of the Microbiome on Type 1 Diabetes. *Journal of Immunology* **198**, 590-595, doi:10.4049/jimmunol.1601519 (2017).
- 15 Wu, H. *et al.* Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nature Medicine* **23**, 850-858, doi:10.1038/nm.4345 (2017).
- 16 Spiegel.de. Bauchsache. <http://www.spiegel.de/spiegel/spiegelwissen/d-119150836.html> (12.11.2013).

- 17 Spiegel.de. Die Vertreibung der Besiedler. <http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-88656085.html> (17.09.2012).
- 18 Spektrum.de. Übergewicht durch Darmflora. <http://www.spektrum.de/magazin/darmbakterien-und-gesundheit/1382042> (20.01.2016).
- 19 Spektrum.de. Wenn der Bauch das Gehirn krank macht. <http://www.spektrum.de/magazin/darmflora-und-hirngesundheit/1396790> (24.02.2016).
- 20 Institut, R. K. Zahlen und Trends aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *6/2012 3.Jahrgang*.
- 21 WHO. Die Diabetes-Epidemie in der Europäischen Region. <http://www.euro.who.int/de/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/news/news/2011/11/diabetes-epidemic-in-europe> (2017).
- 22 Enders, G. Darm mit Charme. *Ullstein ebooks ISBN-10:3843707111* (2014).
- 23 Organization, I. A. f. R. o. C.-W. H. World Cancer Report 2014. (2014).
- 24 Soler, A. P. *et al.* Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* **20**, 1425-1431 (1999).
- 25 Van der Flier, L. G. *et al.* The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* **132**, 628-632, doi:10.1053/j.gastro.2006.08.039 (2007).
- 26 van der Flier, L. G. & Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology* **71**, 241-260, doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163145 (2009).
- 27 Bailey, M. T. The contributing role of the intestinal microbiota in stressor-induced increases in susceptibility to enteric infection and systemic immunomodulation. *Hormones and Behavior* **62**, 286-294, doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.006 (2012).
- 28 Abrams GD., B. H., Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Laboratory Investigation March*, 355-364 (1963).
- 29 Wostmann, B. S. The Germfree Animal in Nutritional Studies. *Annual Review of Nutrition* **1**, 257-79 (1981).
- 30 Yi, P. & Li, L. The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Veterinary Microbiology* **157**, 1-7, doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.024 (2012).
- 31 Reinhardt, C. *et al.* Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature* **483**, 627-631, doi:10.1038/nature10893 (2012).
- 32 Hormann, N. *et al.* Gut microbial colonization orchestrates TLR2 expression, signaling and epithelial proliferation in the small intestinal mucosa. *PLoS one* **9**, e113080, doi:10.1371/journal.pone.0113080 (2014).
- 33 Kirsch, J. Anatomie. *Thieme Verlag*, 703-709, doi:ISBN: 9783131449917.
- 34 Zilles, T. Anatomie. *Springer-Lehrbuch Springer Medizin Verlag Heidelberg* (2010).

11 Literatur

- 35 Rainer Klinke, H.-C. P., Armin Kurtz, Stefan Silbernagel. *Physiologie. 6. Auflage Thieme Verlagsgruppe*, 418, doi:10.1055/b-002-46974 (2010).
- 36 Furness, J. B., Rivera, L. R., Cho, H. J., Bravo, D. M. & Callaghan, B. The gut as a sensory organ. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* **10**, 729-740, doi:10.1038/nrgastro.2013.180 (2013).
- 37 Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* **1**, 11-22, doi:10.1038/mi.2007.6 (2008).
- 38 Moor, K. *et al.* High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature* **544**, 498-502, doi:10.1038/nature22058 (2017).
- 39 Meimei Shan, M. G., John R. Yeiser, A. Cooper Walland, Victor U. Bornstein,, Kang Chen, B. H., Linda Cassis, Anna Bigas, Montserrat Cols, Laura Comerma,, Bihui Huang, J. M. B., Huabao Xiong, Lloyd Mayer, Cecilia Berin, & Leonard H. Augenlicht, A. V., Andrea Cerutti. Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals. *Science* **342**, 447-435 (2013).
- 40 Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* **3**, 710-720, doi:10.1038/nri1180 (2003).
- 41 Dvorak, A. M. & Dickersin, G. R. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. I. Barrier function. Possible changes related to alterations of cell coat, mucous coat, epithelial cells, and Paneth cells. *Human Pathology* **11**, 561-571 (1980).
- 42 Barker, N., Bartfeld, S. & Clevers, H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell* **7**, 656-670, doi:10.1016/j.stem.2010.11.016 (2010).
- 43 Meran, L., Baulies, A. & Li, V. S. W. Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells International* **2017**, 7970385, doi:10.1155/2017/7970385 (2017).
- 44 Noah, T. K., Donahue, B. & Shroyer, N. F. Intestinal development and differentiation. *Experimental Cell Research* **317**, 2702-2710, doi:10.1016/j.yexcr.2011.09.006 (2011).
- 45 Biswas, S. *et al.* Microenvironmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of Pathology* **237**, 135-145, doi:10.1002/path.4563 (2015).
- 46 van Es, J. H. *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-963, doi:10.1038/nature03659 (2005).
- 47 Miron, N. & Cristea, V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical and Experimental Immunology* **167**, 405-412, doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x (2012).
- 48 Snoeck, V., Goddeeris, B. & Cox, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection* **7**, 997-1004, doi:10.1016/j.micinf.2005.04.003 (2005).
- 49 Zihni, C., Mills, C., Matter, K. & Balda, M. S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **17**, 564-580, doi:10.1038/nrm.2016.80 (2016).
- 50 Saggiaro, A. Leaky Gut, Microbiota, and Cancer An Incoming Hypothesis. *Journal of Clinical Gastroenterology* **48**, 62-66 (2014).

- 51 Alejandro Peralta Soler, R. D. M., Kathleen V. Laughlin, Ned Z. Carp, David M. Klurfeld and James M. Mullin. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* **20**, 1425-1431 (1999).
- 52 Landy, J. *et al.* Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **22**, 3117-3126, doi:10.3748/wjg.v22.i11.3117 (2016).
- 53 Martin, T. A. & Jiang, W. G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 872-891, doi:10.1016/j.bbame.2008.11.005 (2009).
- 54 Miele, L. *et al.* Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **49**, 1877-1887, doi:10.1002/hep.22848 (2009).
- 55 Odenwald, M. A. & Turner, J. R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* **14**, 9-21, doi:10.1038/nrgastro.2016.169 (2017).
- 56 Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews. Immunology* **9**, 799-809, doi:10.1038/nri2653 (2009).
- 57 Kim, Y. S. & Ho, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports* **12**, 319-330, doi:10.1007/s11894-010-0131-2 (2010).
- 58 Pelaseyed, T. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, **260**, 8-20 (2014).
- 59 Jakobsson, H. E. *et al.* The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports* **16**, 164-177, doi:10.15252/embr.201439263 (2015).
- 60 Johansson, M. E. & Hansson, G. C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews. Immunology* **16**, 639-649, doi:10.1038/nri.2016.88 (2016).
- 61 Podolsky, D. K., Gerken, G., Eyking, A. & Cario, E. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology* **137**, 209-220, doi:10.1053/j.gastro.2009.03.007 (2009).
- 62 Lin, N., Xu, L. F. & Sun, M. The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **440**, 143-149, doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.049 (2013).
- 63 Buda, A., Jepson, M. A. & Pignatelli, M. Regulatory function of trefoil peptides (TFF) on intestinal cell junctional complexes. *Cell Communication & Adhesion* **19**, 63-68, doi:10.3109/15419061.2012.748326 (2012).
- 64 Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **164**, 337-340, doi:10.1016/j.cell.2016.01.013 (2016).
- 65 Paul B. Eckburg, E. M. B., Charles N. Bernstein, Elizabeth Purdom, Les Dethlefsen, Michael Sargent, Steven R. Gill, Karen E. Nelson, David A. Relman. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* **308** (2005).

11 Literatur

- 66 ERWIN G. ZOETENDAL, A. D. L. A., AND WILLEM M. DE VOS. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 15-21 (1998).
- 67 Hold, G. L., Pryde, S.E., Russel, V.J., Furrie, E., Flint, H. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **39**, 33-39; doi 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00904.x (2002).
- 68 Human Microbiome Project, C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207-214, doi:10.1038/nature11234 (2012).
- 69 Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65, doi:10.1038/nature08821 (2010).
- 70 Reinhardt, C., Reigstad, C. S. & Backhed, F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **48**, 249-256 (2009).
- 71 Costea, P. I. Stratification and Variation of the Human Gut Microbiota. *Doctoral thesis* Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2016).
- 72 Haller, D., Hörmannspenger, G. Darmgesundheit und Mikrobiota. *SpringerSpektrum* (2015).
- 73 Brestoff, J. R. & Artis, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology* **14**, 676-684, doi:10.1038/ni.2640 (2013).
- 74 Buffie, C. G. & Pamer, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews. Immunology* **13**, 790-801, doi:10.1038/nri3535 (2013).
- 75 Grover, M. & Kashyap, P. C. Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **26**, 745-748, doi:10.1111/nmo.12366 (2014).
- 76 Rooks, M. G. & Garrett, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews. Immunology* **16**, 341-352, doi:10.1038/nri.2016.42 (2016).
- 77 Yu, L. C., Wang, J. T., Wei, S. C. & Ni, Y. H. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* **3**, 27-43, doi:10.4291/wjgp.v3.i1.27 (2012).
- 78 Caballero, S. *et al.* Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host & Microbe* **21**, 592-602.e594, doi:10.1016/j.chom.2017.04.002 (2017).
- 79 Boulange, C. L., Neves, A. L., Chilloux, J., Nicholson, J. K. & Dumas, M. E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine* **8**, 42, doi:10.1186/s13073-016-0303-2 (2016).
- 80 Roy, S. & Trinchieri, G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* **17**, 271-285, doi:10.1038/nrc.2017.13 (2017).
- 81 Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J. & Rosenstiel, P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews. Microbiology* **15**, 630-638, doi:10.1038/nrmicro.2017.58 (2017).

- 82 Ubeda, C. & Pamer, E. G. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology* **33**, 459-466, doi:10.1016/j.it.2012.05.003 (2012).
- 83 Kim, S., Covington, A. & Pamer, E. G. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews* **279**, 90-105, doi:10.1111/imr.12563 (2017).
- 84 Reikvam, D. H. *et al.* Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS one* **6**, e17996, doi:10.1371/journal.pone.0017996 (2011).
- 85 Lundberg, R., Toft, M. F., August, B., Hansen, A. K. & Hansen, C. H. Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes* **7**, 68-74, doi:10.1080/19490976.2015.1127463 (2016).
- 86 Reifenberg, D. K. Hygiene in Versuchstierhaltungen.
- 87 Pesti, H. A. G. a. L. The Gnotobiotic Animal as a Tool in the Study of Host Microbial Relationships. *Bacteriological Reviews* **35**, 390-429 (1971).
- 88 José Inzunza, T. M., Mona Fartoo, Elisabeth Norin, Ewa Österlund, Anna-Karin Persson and Lars Ährlund-Richter. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. *Laboratory Animals* **39**, 421-427 (2005).
- 89 Berg, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* **4** (1996).
- 90 Berg, R. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* **4** (1996).
- 91 Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology* **4**, 499-511, doi:10.1038/nri1391 (2004).
- 92 Abreu, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews. Immunology* **10**, 131-144, doi:10.1038/nri2707 (2010).
- 93 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 94 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 (2002).
- 95 Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **1** (2001).
- 96 Cario, E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**, 1182-1193, doi:10.1136/gut.2004.062794 (2005).
- 97 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 98 O'Neill, L. A., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* **13**, 453-460, doi:10.1038/nri3446 (2013).
- 99 Santaolalla, R. & Abreu, M. T. Innate immunity in the small intestine. *Current Opinion in Gastroenterology* **28**, 124-129, doi:10.1097/MOG.0b013e3283506559 (2012).
- 100 Yiu, J. H., Dorweiler, B. & Woo, C. W. Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. *Journal of Molecular Medicine*, doi:10.1007/s00109-016-1474-4 (2016).

11 Literatur

- 101 Medzhitov, S. R.-N. a. R. Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* **9** (2009).
- 102 Michael A. West, W. H. Endotoxin tolerance: A review. *Critical Care Medicine* **30** (2002).
- 103 Fresno, E. L.-C. a. C. d. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Critical Care* **17:242** (2013).
- 104 Lotz, M. *et al.* Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 973-984, doi:10.1084/jem.20050625 (2006).
- 105 Li, T. T., Ogino, S. & Qian, Z. R. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 17699-17708, doi:10.3748/wjg.v20.i47.17699 (2014).
- 106 El-Omar, E. M., Ng, M. T. & Hold, G. L. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* **27**, 244-252, doi:10.1038/sj.onc.1210912 (2008).
- 107 O'Neill, L. A. J. Toll-like receptors in cancer. *Oncogene* **27**, 158-160, doi:10.1038/sj.onc.1210903 (2008).
- 108 Li, X., Qian, D., Ju, F. & Wang, B. Upregulation of Toll-like receptor 2 expression in colorectal cancer infected by human cytomegalovirus. *Oncology Letters* **9**, 365-370, doi:10.3892/ol.2014.2621 (2015).
- 109 Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M. A. & Choi, S. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology* **5**, 334, doi:10.3389/fimmu.2014.00334 (2014).
- 110 Dajon, M., Iribarren, K. & Cremer, I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology* **222**, 89-100, doi:10.1016/j.imbio.2016.06.009 (2017).
- 111 Laura J. Cliffe, N. E. H., Thomas E. Lane, Chris S. Potten, Cath Booth, Richard K. Grensis. Accelerated Intestinal Epithelial Cell Turnover: A New Mechanism of Parasite Expulsion. *Science* **308**, 1463-1465 (2005).
- 112 Buller, N. V., Rosekrans, S. L., Westerlund, J. & van den Brink, G. R. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology* **27**, 148-155, doi:10.1152/physiol.00003.2012 (2012).
- 113 Briscoe, J. & Therond, P. P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **14**, 416-429, doi:10.1038/nrm3598 (2013).
- 114 Gorojankina, T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **73**, 1317-1332, doi:10.1007/s00018-015-2127-4 (2016).
- 115 Saqui-Salces, M. & Merchant, J. L. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1803**, 786-795, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.03.008 (2010).
- 116 Nigmatullina, L. *et al.* Id2 controls specification of Lgr5+ intestinal stem cell progenitors during gut development. *The EMBO Journal*, doi:10.15252/embj.201694959 (2017).
- 117 Ding Q., M. J., Gasca S., Mo R., Sasaki H., Rossant J., Hui CC. Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* **125**, 2533-2543 (1998).

- 118 Matisse MP., E. D., Park HL., Platt KA., Joyner AL. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* **125**, 2759-2770 (1998).
- 119 Pan, Y., Bai, C. B., Joyner, A. L. & Wang, B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 3365-3377, doi:10.1128/MCB.26.9.3365-3377.2006 (2006).
- 120 Wang, B., Fallon, J. F. & Beachy, P. A. Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/Posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. *Cell* **100**, 423-434, doi:10.1016/s0092-8674(00)80678-9 (2000).
- 121 van Dop, W. A. *et al.* Loss of Indian Hedgehog activates multiple aspects of a wound healing response in the mouse intestine. *Gastroenterology* **139**, 1665-1676, 1676 e1661-1610, doi:10.1053/j.gastro.2010.07.045 (2010).
- 122 Zhang, X. H. *et al.* Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma. *Cell* **154**, 1060-1073, doi:10.1016/j.cell.2013.07.036 (2013).
- 123 Hao, F. *et al.* Protein kinase Calpha signaling regulates inhibitor of DNA binding 1 in the intestinal epithelium. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 18104-18117, doi:10.1074/jbc.M110.208488 (2011).
- 124 Kosinski, C. *et al.* Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15418-15423, doi:10.1073/pnas.0707210104 (2007).
- 125 Walton, K. D. *et al.* Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. *Development* **143**, 427-436, doi:10.1242/dev.130112 (2016).
- 126 Anna-Pavlina G. Haramis, H. B., Maaïke van den Born, Johan van Es, Suzanne Jonkheer, G. Johan A. Offerhaus, Hans Clevers. De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine. *Science* **303** (2004).
- 127 Anastas, J. N. & Moon, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews. Cancer* **13**, 11-26, doi:10.1038/nrc3419 (2013).
- 128 Birchmeier, A. K. a. W. Wnt signalling and its impact on development cancer. *Nature Reviews Cancer* **8** (2008).
- 129 Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F. & Ricciardiello, L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 16365-16385, doi:10.3390/ijms140816365 (2013).
- 130 Voorneveld, P. W. *et al.* The BMP pathway either enhances or inhibits the Wnt pathway depending on the SMAD4 and p53 status in CRC. *British Journal of Cancer* **112**, 122-130, doi:10.1038/bjc.2014.560 (2015).
- 131 Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
- 132 Lucas, C., Barnich, N. & Nguyen, H. T. T. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18061310 (2017).

11 Literatur

- 133 Wong, S. H. *et al.* Gavage of Fecal Samples From Patients with Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-free and Conventional Mice. *Gastroenterology* **17**, 1-13, doi:10.1053/j.gastro.2017.08.022 (2017).
- 134 Schwabe, R. F. & Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nature Reviews. Cancer* **13**, 800-812, doi:10.1038/nrc3610 (2013).
- 135 Zitvogel, L. *et al.* Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Science Translational Medicine* **7**, 271-281, doi:10.1126/scitranslmed.3010473 (2015).
- 136 Werb, L. M. C. a. Z. insight review article Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867, doi:10.1038/nature01322 (2002).
- 137 Van Raay, T. & Allen-Vercoe, E. Microbial Interactions and Interventions in Colorectal Cancer. *Microbiology Spectrum* **5**, doi:10.1128/microbiolspec.BAD-0004-2016 (2017).
- 138 Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* **3**, 730-737 (1997).
- 139 de Sousa e Melo, F. *et al.* A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* **543**, 676-680, doi:10.1038/nature21713 (2017).
- 140 Barker, N. *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608-611, doi:10.1038/nature07602 (2009).
- 141 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115, doi:10.1038/nature05384 (2007).
- 142 An, N., Yang, X., Cheng, S., Wang, G. & Zhang, K. Developmental genes significantly afflicted by aberrant promoter methylation and somatic mutation predict overall survival of late-stage colorectal cancer. *Scientific Reports* **5**, 18616, 1-13, doi:10.1038/srep18616 (2015).
- 143 Gerling, M. *et al.* Stromal Hedgehog signalling is downregulated in colon cancer and its restoration restrains tumour growth. *Nature Communications* **7**, 12321, 1-15, doi:10.1038/ncomms12321 (2016).
- 144 Loh, K. *et al.* Bone morphogenetic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development. *Genes, Chromosomes & Cancer* **47**, 449-460, doi:10.1002/gcc.20552 (2008).
- 145 Feng, H. C. *et al.* Low folate metabolic stress reprograms DNA methylation-activated sonic hedgehog signaling to mediate cancer stem cell-like signatures and invasive tumour stage-specific malignancy of human colorectal cancers. *International Journal of Cancer* **12**, 2537-2550, doi:10.1002/ijc.31008 (2017).
- 146 Dempke, W. C. M., Fenchel, K., Uciechowski, P. & Chevassut, T. Targeting Developmental Pathways: The Achilles Heel of Cancer. *Oncology*, **93** (4), 213-223, doi:10.1159/000478703 (2017).
- 147 Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Developmental pathways associated with cancer metastasis: Notch, Wnt, and Hedgehog. *Cancer Biology & Medicine* **14**, 109-120, doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0032 (2017).
- 148 Kreso, A. *et al.* Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nature Medicine* **20**, 29-36, doi:10.1038/nm.3418 (2014).

- 149 Chin, A. M., Hill, D. R., Aurora, M. & Spence, J. R. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **66**, 81-93, doi:10.1016/j.semcdb.2017.01.011 (2017).
- 150 Le Guen, L., Marchal, S., Faure, S. & de Santa Barbara, P. Mesenchymal-epithelial interactions during digestive tract development and epithelial stem cell regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**, 3883-3896, doi:10.1007/s00018-015-1975-2 (2015).
- 151 van den Brink, G. R. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiological Reviews* **87**, 1343-1375, doi:10.1152/physrev.00054.2006 (2007).
- 152 Ishizuya-Oka A., H. T. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. *Digestion* **77**, 42-47, doi: 10.1159/000111487 (2008).
- 153 Ishizuya-Oka, A. & Hasebe, T. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling pathway involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. *Digestion* **77** **Suppl 1**, 42-47, doi:10.1159/000111487 (2008).
- 154 Kuugbee, E. D. *et al.* Structural Change in Microbiota by a Probiotic Cocktail Enhances the Gut Barrier and Reduces Cancer via TLR2 Signaling in a Rat Model of Colon Cancer. *Digestive Diseases and Sciences* **61**, 2908-2920, doi:10.1007/s10620-016-4238-7 (2016).
- 155 Kuo, A. H. & Scheeren, F. A. Cell-intrinsic TLR2/MyD88 pathway in breast and colon cancer. *Cell Cycle* **13**, 3785-3786, doi:10.4161/15384101.2014.989947 (2014).
- 156 Lu, C. C. *et al.* Upregulation of TLRs and IL-6 as a marker in human colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 159-177, doi:10.3390/ijms16010159 (2014).
- 157 Guttmann-Raviv, N. *et al.* The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Letters* **231**, 1-11, doi:10.1016/j.canlet.2004.12.047 (2006).
- 158 Worzfeld, T. & Offermanns, S. Semaphorins and plexins as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug Discovery* **13**, 603-621, doi:10.1038/nrd4337 (2014).
- 159 Amakye, D., Jagani, Z. & Dorsch, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Medicine* **19**, 1410-1422, doi:10.1038/nm.3389 (2013).
- 160 Donna E. Hansel, R. E. W., Charles J. Yeo, Richard D. Schulick, Elizabeth Montgomery and Anirban Maitra. Expression of Neuropilin-1 in High-grade Dysplasia, Invasive Cancer and Metastases of the Human Gastrointestinal Tract. *The American Journal of Surgical Pathology* **28**, 346-356 (2004).
- 161 Jubb, A. M. *et al.* Neuropilin-1 expression in cancer and development. *The Journal of Pathology* **226**, 50-60, doi:10.1002/path.2989 (2012).
- 162 Tulstrup, M. V. *et al.* Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS one* **10**, e0144854, doi:10.1371/journal.pone.0144854 (2015).
- 163 Xue, Y., Zhang, H., Sun, X. & Zhu, M. J. Metformin Improves Ileal Epithelial Barrier Function in Interleukin-10 Deficient Mice. *PLoS one* **11**, e0168670, doi:10.1371/journal.pone.0168670 (2016).

11 Literatur

- 164 Gustafsson, B. E. The physiological importance of the colonic microflora. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement* **77**, 117-131 (1982).
- 165 Kenneth A. Khoury, M. H. F., Theodore Hersh. Small intestinal mucosal cell Proliferation an Bacterial Flora in the Conventionalization of the Germfree Mouse. *Journal of Experimental Medicine* **September** (1969).
- 166 Marino, S., Baxter, N. T., Huffnagle, G. B., Petrosino, J. F. & Schloss, P. D. Mathematical modeling of primary succession of murine intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 439-444, doi:10.1073/pnas.1311322111 (2014).
- 167 Thomas Gensollen, S. S. I., Dennis L. Kasper, Richard S. Blumberg. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539-544, doi: 10.1126/science.aad9378 (2016).
- 168 Lim, E. S. *et al.* Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature Medicine* **21**, 1228-1234, doi:10.1038/nm.3950 (2015).
- 169 Sommer, F. & Backhed, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature Reviews. Microbiology* **11**, 227-238, doi:10.1038/nrmicro2974 (2013).
- 170 Blaser, M. j. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* **352**, 544-545, doi: 10.1126/science.aad9358 (2016).
- 171 Hitoshi Kandori, K. H., Makio Takeda, Kunio Doi. Histochemical, Lectin-Histochemical and Morphometrical Characteristics of Intestinal Goblet Cells of Germfree and Conventional Mice. *Experimental Animals* **45**, 155-160 (1996).
- 172 Bates, J. M. *et al.* Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology* **297**, 374-386, doi:10.1016/j.ydbio.2006.05.006 (2006).
- 173 Rawls, J. F., Samuel, B. S. & Gordon, J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4596-4601, doi:10.1073/pnas.0400706101 (2004).
- 174 Johansson, M. E., Larsson, J. M. & Hansson, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 1**, 4659-4665, doi:10.1073/pnas.1006451107 (2011).
- 175 Batts, L. E., Polk, D. B., Dubois, R. N. & Kulessa, H. Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 1563-1570, doi:10.1002/dvdy.20741 (2006).
- 176 Cordero, J. B. & Sansom, O. J. Wnt signalling and its role in stem cell-driven intestinal regeneration and hyperplasia. *Acta Physiologica* **204**, 137-143, doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02288.x (2012).
- 177 Bertrand, F. E., Angus, C. W., Partis, W. J. & Sigounas, G. Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle* **11**, 4344-4351, doi:10.4161/cc.22134 (2012).
- 178 Guo, X. & Wang, X. F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Research* **19**, 71-88, doi:10.1038/cr.2008.302 (2009).

- 179 He, X. C. *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature Genetics* **36**, 1117-1121, doi:10.1038/ng1430 (2004).
- 180 Wang, R. N. *et al.* Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases* **1**, 87-105, doi:10.1016/j.gendis.2014.07.005 (2014).
- 181 Kolterud, A. *et al.* Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning. *Gastroenterology* **137**, 618-628, doi:10.1053/j.gastro.2009.05.002 (2009).
- 182 O'Shaughnessy, R. F., Christiano, A. M. & Jahoda, C. A. The role of BMP signalling in the control of ID3 expression in the hair follicle. *Experimental Dermatology* **13**, 621-629, doi:10.1111/j.0906-6705.2004.00206.x (2004).
- 183 Heiko Lickert, A. K., Stefanie Kutsch, Rolf Kemler. Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mechanisms of Development* **105**, 181-184, doi:10.1016/S0925-4773(01)00390-2 (2001).
- 184 Ouko, L., Ziegler, T. R., Gu, L. H., Eisenberg, L. M. & Yang, V. W. Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 26707-26715, doi:10.1074/jbc.M402877200 (2004).
- 185 Liu, X. *et al.* Wingless homolog Wnt11 suppresses bacterial invasion and inflammation in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **301**, G992-g1003, doi:10.1152/ajpgi.00080.2011 (2011).
- 186 Nishioka, M. *et al.* Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Molecular Carcinogenesis* **52**, 207-217, doi:10.1002/mc.21845 (2013).
- 187 Hiroyukio Miyoshi, R. A., Christine T. Luo, Terry P. Yamaguchi, Thaddeus S. Stappenbeck. Wnt5a Potentiates TGF- β Signaling to promote Colonic Crypt Regeneration After Tissue Injury. *Science* **338**, 108-112, doi: 10.1126/science.1223821 (2012).
- 188 Cervantes, S., Yamaguchi, T. P. & Hebrok, M. Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice. *Developmental Biology* **326**, 285-294, doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.020 (2009).
- 189 Kanzawa, M., Semba, S., Hara, S., Itoh, T. & Yokozaki, H. WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells. *Pathobiology : Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* **80**, 235-244, doi:10.1159/000346843 (2013).
- 190 Kumar, D., Sharma, S., Verma, S., Kumar, P. & Ambasta, R. Role of Wnt-p53-Nox Signaling Pathway in Cancer Development and Progression. *British Journal of Medicine and Medical Research* **8**, 651-676, doi:10.9734/bjmmr/2015/17996 (2015).
- 191 Sekulic, A. & Von Hoff, D. Hedgehog Pathway Inhibition. *Cell* **164**, 831, doi:10.1016/j.cell.2016.02.021 (2016).
- 192 Chechneva, O. V. *et al.* A Smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death & Disease* **5**, e1481, doi:10.1038/cddis.2014.446 (2014).
- 193 Sodhi, C. P. *et al.* Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. *Gastroenterology* **143**, 708-718.e705, doi:10.1053/j.gastro.2012.05.053 (2012).

11 Literatur

- 194 Pinchuk, I. V., Mifflin, R. C., Saada, J. I. & Powell, D. W. Intestinal mesenchymal cells. *Current Gastroenterology Reports* **12**, 310-318, doi:10.1007/s11894-010-0135-y (2010).
- 195 Zawahir, S. *et al.* Inflammatory and Immune Activation in Intestinal Myofibroblasts Is Developmentally Regulated. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **35**, 634-640, doi:10.1089/jir.2014.0071 (2015).
- 196 Brown, M., Hughes, K. R., Moossavi, S., Robins, A. & Mahida, Y. R. Toll-like receptor expression in crypt epithelial cells, putative stem cells and intestinal myofibroblasts isolated from controls and patients with inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology* **178**, 28-39, doi:10.1111/cei.12381 (2014).
- 197 Peck, B. C. E., Shanahan, M. T., Singh, A. P. & Sethupathy, P. Gut Microbial Influences on the Mammalian Intestinal Stem Cell Niche. *Stem Cells International* **2017**, 5604727, doi:10.1155/2017/5604727 (2017).
- 198 Mochly-Rosen, D., Das, K. & Grimes, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews. Drug Discovery* **11**, 937-957, doi:10.1038/nrd3871 (2012).
- 199 Garg, R. *et al.* Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene* **33**, 5225-5237, doi:10.1038/onc.2013.524 (2014).
- 200 Heo, J. S., Lee, M. Y. & Han, H. J. Sonic hedgehog stimulates mouse embryonic stem cell proliferation by cooperation of Ca²⁺/protein kinase C and epidermal growth factor receptor as well as Gli1 activation. *Stem Cells* **25**, 3069-3080, doi:10.1634/stemcells.2007-0550 (2007).
- 201 Loegering, D. J. & Lennartz, M. R. Protein kinase C and toll-like receptor signaling. *Enzyme Research* **2011**, 537821, doi:10.4061/2011/537821 (2011).
- 202 Luna-Ulloa, L. B., Hernandez-Maqueda, J. G., Santoyo-Ramos, P., Castaneda-Patlan, M. C. & Robles-Flores, M. Protein kinase C zeta is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* **32**, 1615-1624, doi:10.1093/carcin/bgr190 (2011).
- 203 Murray, N. R. *et al.* Overexpression of protein kinase C beta11 induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *The Journal of Cell Biology* **145**, 699-711 (1999).
- 204 Wymore Brand, M. *et al.* The Altered Schaedler Flora: Continued Applications of a Defined Murine Microbial Community. *ILAR Journal* **56**, 169-178, doi:10.1093/ilar/ilv012 (2015).
- 205 Zomorodi, A. R. & Segre, D. Synthetic Ecology of Microbes: Mathematical Models and Applications. *Journal of Molecular Biology* **428**, 837-861, doi:10.1016/j.jmb.2015.10.019 (2016).
- 206 Wade, M. J. *et al.* Perspectives in mathematical modelling for microbial ecology. *Ecological Modelling* **321**, 64-74, doi:10.1016/j.ecolmodel.2015.11.002 (2016).
- 207 Rebeca Nevado, R. F., Elena Layunta, María Divina Murillo and Laura Grasa. Neomycin and bacitracin reduce the intestinal permeability in mice and increase the expression of some tight-junction proteins. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas* **107**, 672-676, (2015).
- 208 Azzi, S. *et al.* Desert Hedgehog/Patch2 Axis Contributes to Vascular Permeability and Angiogenesis in Glioblastoma. *Frontiers in Pharmacology* **6**, 281, 1-11, doi:10.3389/fphar.2015.00281 (2015).

- 209 Bein, A., Zilbershtein, A., Golosovsky, M., Davidov, D. & Schwartz, B. LPS Induces Hyper-Permeability of Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology* **232**, 381-390, doi:10.1002/jcp.25435 (2017).
- 210 Dheer, R. *et al.* Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Signaling Affects Epithelial Function and Colonic Microbiota and Promotes a Risk for Transmissible Colitis. *Infection and Immunity* **84**, 798-810, doi:10.1128/IAI.01374-15 (2016).
- 211 Guo, S. *et al.* Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *Journal of Immunology* **195**, 4999-5010, doi:10.4049/jimmunol.1402598 (2015).
- 212 Hackam, D. J., Good, M. & Sodhi, C. P. Mechanisms of gut barrier failure in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors throw the switch. *Seminars in Pediatric Surgery* **22**, 76-82, doi:10.1053/j.sempedsurg.2013.01.003 (2013).
- 213 Cario, E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunology* **1 Suppl 1**, S62-66, doi:10.1038/mi.2008.47 (2008).
- 214 Cario, E., Gerken, G. & Podolsky, D. K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* **132**, 1359-1374, doi:10.1053/j.gastro.2007.02.056 (2007).
- 215 Oppong, G. O. *et al.* Epithelial cells augment barrier function via activation of the Toll-like receptor 2/phosphatidylinositol 3-kinase pathway upon recognition of Salmonella enterica serovar Typhimurium curli fibrils in the gut. *Infection and Immunity* **81**, 478-486, doi:10.1128/IAI.00453-12 (2013).
- 216 Cario, E., Gerken, G. & Podolsky, D. K. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* **127**, 224-238, doi:10.1053/j.gastro.2004.04.015 (2004).
- 217 Xie, H. *et al.* Diagnostic value evaluation of trefoil factors family 3 for the early detection of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **23**, 2159-2167, doi:10.3748/wjg.v23.i12.2159 (2017).
- 218 Comelli, E. M. *et al.* Multifaceted transcriptional regulation of the murine intestinal mucus layer by endogenous microbiota. *Genomics* **91**, 70-77, doi:10.1016/j.ygeno.2007.09.006 (2008).
- 219 Schutte, A. *et al.* Microbial-induced mepripin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12396-12401, doi:10.1073/pnas.1407597111 (2014).
- 220 Riehl, T. E., Santhanam, S., Foster, L., Ciorba, M. & Stenson, W. F. CD44 and TLR4 mediate hyaluronic acid regulation of Lgr5+ stem cell proliferation, crypt fission, and intestinal growth in postnatal and adult mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver physiology* **309**, G874-887, doi:10.1152/ajpgi.00123.2015 (2015).
- 221 Santaolalla, R. *et al.* TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS one* **8**, e63298, doi:10.1371/journal.pone.0063298 (2013).
- 222 Xie, J. Hedgehog signaling in human cancer and its clinical implications. *Springer*, doi:10.1007/978-1-4419-8435-7 (2011).

11 Literatur

- 223 Pysz, M. A. *et al.* Differential regulation of cyclin D1 expression by protein kinase C alpha and signaling in intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 22268-22283, doi:10.1074/jbc.M114.571554 (2014).
- 224 Wolfgang Gruber, A.-M. F. a. F. A. An old friend with new skills: Imiquimod as novel inhibitor of Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *Oncoscience* **1**, 567-573 (2014).
- 225 Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J. P., Gespach, C. & Kaiserlian, D. immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *Journal of Immunological Methods* **166**, 63-73 (1993).
- 226 Grasset, E., Pinto, M., Dussaulx, E., Zweibaum, A. & Desjeux, J. F. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *The American Journal of Physiology* **247**, C260-267 (1984).