

Aus dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg- Universität
Mainz

**„Rolle von Dual-Oxidase 2 bei akuter
Dünndarmmukositis“**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Jana Schulz
aus Neuwied

Mainz, 2019

Tag der Promotion: 06.07.2021

...für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	6
2. Literaturdiskussion.....	8
2.1. Aufbau und Funktionen des Dünndarms.....	8
2.2 Bedeutung der Mikrobiota.....	11
2.3 Gnotobiotische Tierhaltung.....	13
2.4 Morbus Crohn.....	15
2.5 NADPH-Oxidase-Familie und die Rolle von Duox2 und DuoxA2.....	17
2.6 Signalwege zur Aufrechterhaltung der Epithelzellhomöostase im Dünndarm.....	20
2.6.1 Hedgehog-Signalweg.....	20
2.6.2 Bone Morphogenetic Protein-Signalweg.....	22
3. Material und Methoden.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Mauslinien.....	25
3.1.2 Geräte.....	25
3.1.3 Software.....	27
3.1.4 Verbrauchsmaterial.....	27
3.1.5 Chemikalien.....	28
3.1.6 Kits.....	28
3.1.7 Primer.....	29
3.2 Methoden.....	30
3.2.1 Mäuse.....	30
3.2.2 Kolonisierung keimfreier Mäuse.....	30
3.2.3 DSS- Behandlung von Mäusen.....	31

3.2.4 Entnahme von Mausgeweben.....	31
3.2.5 RNA-Extraktion.....	31
3.2.6 cDNA- Synthese.....	32
3.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	33
3.2.8 Statistische Analyse.....	34
3.2.9 Auswahl der Crohn-Patienten und Kontrollen.....	34
3.2.10 Entnahme der menschlichen Gewebeproben	35
4. Ergebnisse	36
4.1 DSS-Behandlung verändert Expression von Duox2 und DuoxA2 in CONV-R und keimfreien Mäusen	36
4.2 DSS-Behandlung beeinflusst Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion in CONV-R Mäusen	37
4.3 Morbus Crohn hat Einfluss auf Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion	38
4.4 Morbus Crohn und Mikrobiota beeinflussen Expression von Duox2 und DuoxA2	39
4.5 Duox2-defiziente Mäuse zeigen veränderte Expression von Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Zielgenen	41
4.6 Duox2-defiziente Mäuse zeigen im DSS-Modell veränderte Expressionen in den untersuchten Zielgenen von Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion	42
5. Diskussion	44
5.1 Mikrobiom und Duox2-Regulation im Darmepithel.....	44
5.2 Akute intestinale Mukositis und Duox2-Regulation im Darmepithel	46
5.3 Die Verbindung zwischen epithelialer Duox2-Aktivität und Hedgehog- bzw. BMP-Expression im entzündeten Dünndarm	50
5.4 Veränderung von Hedgehog- und BMP-Signalweg im terminalen Ileum von Morbus Crohn Patienten	53
5.5 Ausblick.....	58
6. Zusammenfassung.....	61
7. Literaturverzeichnis.....	63

8. Anhang.....	69
Danksagungen.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.1 a: Bau des Dünndarms, b: Aufbau einer Dünndarmzotte	9
Abb. 2.1.2 Differenzierung von Stammzellen in intestinalen Zelltypen	10
Abb. 2.2 Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota.....	12
Abb. 2.3 Flexibler Folienisolator zur Haltung keimfreier Mäuse	14
Abb. 2.5 Aufbau von Duox1, Duox2	18
Abb. 2.6.1: Hedgehog-Signalweg. a: Inaktiver Zustand, b: aktiver Zustand	21
Abb. 2.6.2: Bone Morphogenetic Protein-Signalweg	23
Abb. 2.6.3: Zusammenhang des Hedgehog-, BMP-, und Wnt-Signaltransduktionsweges	24
Abb. 4.1: DSS-Behandlung induziert Expression von Duox2 und DuoxA2 mikrobiotaabhängig	36
Abb. 4.2: DSS-Behandlung beeinflusst Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion in CONV-R Mäusen	37
Abb. 4.3: Morbus Crohn hat Einfluss auf Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion	39
Abb. 4.4: Morbus Crohn und Mikrobiota beeinflussen Expression von Duox2 und DuoxA2	40
Abb. 4.5: Duox2-defiziente Mäuse zeigen veränderte Expression von Ihh und BMP4	41
Abb. 4.6: Duox2-defiziente Mäuse zeigen im DSS-Modell eine verminderte Expression von Ihh und BMP4 sowie eine Verminderung in der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67	43
Abb. 5.3: Verbindung zwischen Hedgehog-Signalweg und Duox-Aktivität	52
Abb. 8.1: Aufklärungsbogen für Crohn Patienten	71
Abb. 8.2: Aufklärungsbogen für Probanden/ Kontrollen	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.3: Charakteristika keimfreier Mäuse im Vergleich zu konventionell- aufgewachsenen Mäusen	15
Tabelle 3.1.1: Mauslinien	25
Tabelle 3.1.2: Geräte	25
Tabelle 3.1.3: Software	27
Tabelle 3.1.4: Verbrauchsmaterial	27
Tabelle 3.1.5: Chemikalien	28
Tabelle 3.1.6: Kits	28
Tabelle 3.1.7: Primer	29
Tabelle 3.2.1: Mastermix für cDNA- Synthese	32
Tabelle 3.2.2: PCR- Programm	32
Tabelle 3.2.3: Mastermix für eine halbe qPCR- Platte	33
Tabelle 3.2.4: qPCR- Programm	33
Tabelle 3.2.5: Charakteristika der eingeschlossenen Kontrollen	69
Tabelle 3.2.6: Charakteristika der eingeschlossenen Crohn-Patienten	70

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APOA1	Apolipoprotein A1
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP7	Bone Morphogenetic Protein 7
BMPR-1	Bone Morphogentic Protein- Rezeptor 1
BMPR-2	Bone Morphogentic Protein- Rezeptor 2
Cad99C	Cadherin 99C
CAMKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
CCP	<i>Complement Control Protein</i> , Komplement Kontroll Protein
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNS
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CONV-D	<i>Conventionally-derived</i> , kolonisierte keimfreie Mäuse
CONV-R	<i>Conventionally- raised</i> , konventionell-aufgewachsene Mäuse
CU	Colitis Ulcerosa
Dhh	Desert Hedgehog
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSS	Dextran- Natrium- Sulfat
Duox1	Dual Oxidase 1
Duox2	Dual Oxidase 2 (Gen)
DUOX2	Dual Oxidase 2 (Protein)
DuoxA2	Dual Oxidase maturation factor 2, Dual Oxidase Aktivator 2 (Gen)
DUOXA2	<i>Dual Oxidase maturation factor 2</i> , Dual Oxidase Aktivator 2 (Protein)

FAD	Flavin- Adenin- Dinucleotid
for	<i>forward</i>
GF	<i>Germ- free</i> , keimfrei
Gli1	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 1
Gli2	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 2
Gli3	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 3
Hh	Hedgehog
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgA	Immunglobulin A
Ihh	Indian Hedgehog
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> , Mitogen aktivierte Protein Kinase
MC	Morbus Crohn
MCFAs	<i>Medium chain- length fatty acids</i> , mittelkettige Fettsäuren
MEKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MjDUOX2	DUOX2 der <i>kuruma shrimp Marsupenaeus japonicus</i>
MM	Mastermix
mRNA	<i>Messenger- RNA</i> , Boten- RNA
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> , Tlr- Adaptermolekül
NADPH	Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NF- κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOD	<i>Nucleotide- binding Oligomerization Domain</i>
Nox	NADPH Oxidase
PAMPs	<i>Pathogen- Associated Molecular Pattern</i> , Pathogen- assoziierte molekulare Muster

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat- gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase- Kettenreaktion
PKC	Protein Kinase C
PLC β	Phospholipase C β
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
Ptch-1	Patched-1
qPCR	Quantitative Echtzeit- Polymerase- Kettenreaktion
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
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>Smoothed</i>
SuFu	<i>Supressor of Fused</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLR	Toll- like Rezeptor
TRIF	TIR-domain- containing adapter- inducing interferon- β
VEOIBD	<i>Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease</i> , frühkindliche chronisch entzündliche Darmerkrankungen
WT	<i>Wildtype</i> , Wildtyp

1. Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), zu denen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gehören, sind Erkrankungen mit steigender Inzidenz, deren Pathogenese bisher weitestgehend unbekannt ist (1). Als zugrundeliegende Ursache scheint eine intestinale Barrierestörung vorzuliegen, die sich bei polygenetischem Hintergrund erst durch Interaktion mit der intestinalen Mikrobiota bzw. weiteren Umweltfaktoren manifestiert und über eine chronische Aktivierung des mukosalen Immunsystems zu einer Entzündung und Destruktion des Darmes führt. Aktuell basieren Therapie und Diagnostik auf klinischer und endoskopischer Bewertung sowie histopathologischen Analysen (2). Viele Patienten erreichen mit den vorhandenen Medikamenten keine dauerhafte Remission, weshalb neue Ansatzpunkte für eine bessere Therapie nötig sind (3-5). Die anhaltende entzündliche Aktivität bei Patienten führt zu einem erhöhten Risiko für Fistel- und Stenosebildung und fördert die Entwicklung von Karzinomen (6). Neue Ideen liegen in der Analyse der Genexpression und mikrobiellen Markern bei Patienten, um eine schnelle Diagnose und möglichst individuell angepasste Therapie identifizieren zu können.

Bisher sind über 242 Genloci bekannt, die im Verdacht stehen, an der Pathogenese von CED beteiligt zu sein (7). Die meisten Studien zeigen eine Beteiligung von Nikotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen, zu denen auch die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Dual Oxidase 2 (DUOX2; Protein) und deren Aktivator *Dual Oxidase maturation factor 2* (DUOXA2; Protein) zählt. Duox2 (Gen) und DuoxA2 (Gen) gehören zu den am stärksten hochregulierten Genen in Patienten mit CED (2, 8-11). Grasberger H et al. zeigten 2015, dass Duox2 bei Patienten mit CED bereits vor einer manifesten Entzündung induziert wird. Ob Duox2 allerdings die eigentliche Entzündung auslöst oder erst als Sekundärantwort aktiviert wird, ist noch ungeklärt. Studien konnten zeigen, dass eine gestörte Darmhomöostase und damit eine Dysbiose der intestinalen Mikrobiota Duox2 über bisher ungeklärte Signalwege aktiviert (8).

Des Weiteren finden sich genetische Varianten im Hedgehog (Hh)-Signalweg bei Patienten mit CED (12-14). Der Hh-Signaltransduktionsweg spielt nicht nur in der embryonalen Entwicklung des Darms eine große Rolle, sondern ist auch ein Schlüsselfaktor in der Regulation der Stammzellhomöostase im adulten Darm und ist assoziiert mit Entzündung

und Gewebereparatur (12, 15). Bezüglich der Expression von Hh-Liganden existieren in der Literatur viele, teils widersprüchliche Daten. Einige Studien zeigten eine Herunterregulation (12-14, 16), andere eine Hochregulation (17-20) des Hh-Signalweges bei Entzündung. Auch die zur *Transforming Growth Factor-β* (TFG-β)-Superfamilie gehörenden Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) scheinen eine Rolle in der Pathogenese von CED zu spielen (12). Ebenso wie der Hh-Signalweg sind BMPs in der Embryogenese und Entwicklung beteiligt. BMP2, 4, und 7 werden im Gastrointestinaltrakt exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der epithelialen Zelldifferenzierung und Proliferation (21, 22).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Rolle von Duox2 bei akuter Dünndarmmukositis. Dabei wird unter anderem der Einfluss der Mikrobiota auf die Expression von Duox2 und DuoxA2 untersucht. Des Weiteren soll die Expression von Hh-Liganden und BMPs bei Entzündung untersucht werden. Hierzu werden keimfreie (GF), kolonisierte, ehemals keimfreie (CONV-D), konventionell aufgewachsene (CONV-R) sowie Duox2-defiziente Mäuse untersucht. Um die Ergebnisse in den Mausversuchen auf den Menschen zu übertragen, werden zusätzlich Biopsieproben aus dem terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn sowie gesunden Kontrollprobanden untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, das pathogenetische Verständnis von CED weiter aufzuklären, sowie mögliche zukünftige therapeutische Ansätze zu finden.

2. Literaturdiskussion

2.1. Aufbau und Funktionen des Dünndarms

Der gesamte Magen- Darm- Trakt der Säugetiere zeigt durchgehend den gleichen schematischen Aufbau der Darmwand aus vier Schichten: Zum Lumen hin liegt die *Mukosa*, bestehend aus einer Lage hochprismatischen Epithels, Schleimhautbindegewebe und einer Schleimhautmuskelschicht, der *Lamina muscularis mucosae*. Auf die *Mukosa* folgt die *Submukosa*, eine Bindegewebsschicht aus Blut- und Lymphgefäßen, sowie Nerven. Daran schließt sich eine Schicht glatter innerer Ring- und äußerer Längsmuskulatur an, die *Muscularis*. Über die *Adventitia* oder *Serosa* wird der Magen- Darm- Trakt in die Umgebung „eingebaut“. Das hochkomplexe und weitgehend autonome enterische Nervensystem beeinflusst Motilität, Sekretion und Durchblutung des Darms und besteht aus dem sogenannten *Plexus myentericus* zwischen Längs- und Ringmuskulatur und dem *Plexus submucosus*, lokalisiert in der *Submukosa* (23).

Der menschliche Dünndarm ist zwischen fünf und sechs Metern lang und besteht aus den drei Abschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum. Der aus dem Magen kommende Speisebrei passiert den Dünndarm innerhalb von sieben bis neun Stunden. Mit Hilfe von Sekreten aus Pankreas, Galle und Darmschleimhaut werden Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette enzymatisch gespalten und Nährstoffe resorbiert. Eine weitere wichtige Aufgabe des Dünndarms besteht in der Bildung von Hormonen zur Steuerung der Verdauungstätigkeit und des Energiestoffwechsels. Des Weiteren beinhaltet er einen wesentlichen Teil des Immunsystems und enthält lymphatisches Gewebe.

Um die Oberfläche des Dünndarms zu vergrößern und damit die Resorption von Nährstoffen zu steigern, finden sich verschiedene strukturelle Merkmale. Zum einen bildet die *Mucosa* sogenannten Kerckringfalten (**Abb. 2.1.1 a**), ca. einen Zentimeter hohe zirkuläre Schleimhautfalten, die quer zur Längsrichtung des Dünndarms stehen. Außerdem zeigt die Schleimhaut fingerförmige Ausstülpungen, Zotten (*Villi intestinales*, **Abb. 2.1.1 b**) genannt, welche von Dünndarmepithel bedeckt sind. Zur weiteren Oberflächenvergrößerung dienen die apikal auf den Enterozyten sitzenden Mikrovilli. An der Basis der Zotten finden sich als Einsenkungen die Lieberkühn Krypten (*Glandulae intestinales*). Kerckringfalten und Zotten

nehmen im Verlauf des Dünndarms ab, während die Krypten zunehmend tiefer werden (24-26).

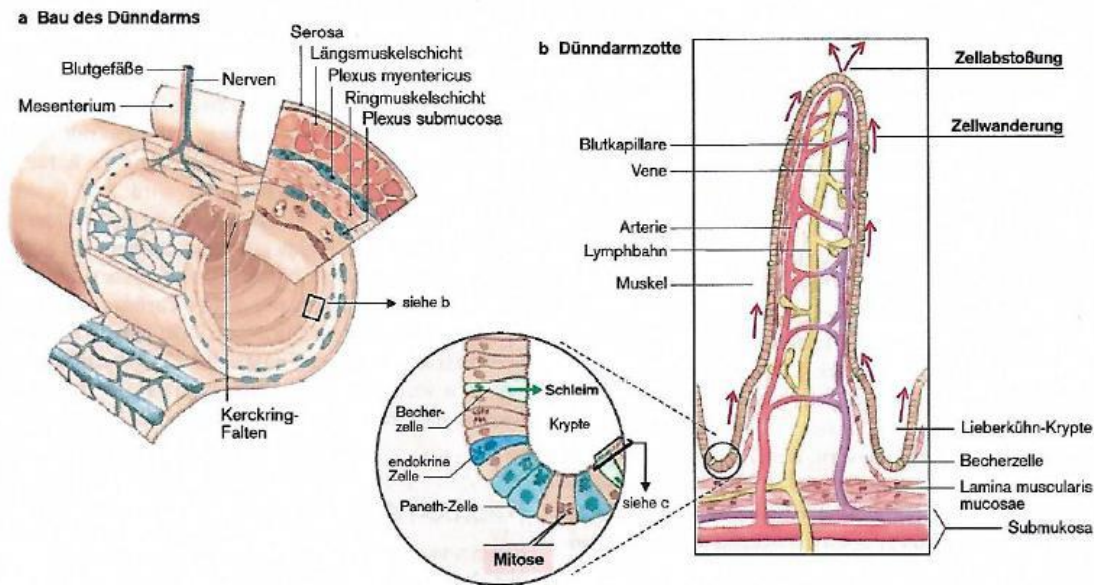


Abb. 2.1.1 a: Bau des Dünndarms, b: Aufbau einer Dünndarmzotte (Abbildung aus Klinker R, Pape H, Kurtz A, Silberagl S. Physiologie. 6. Auflage ed. New York: Georg Thieme Verlag; 2010)

Aufgrund der vielfältigen mechanischen und chemischen Einflüsse und den auf das Darmepithel wirkenden Pathogenen ist eine regelmäßige Erneuerung des Epithels nötig, die an der Basis der Krypten beginnt. Hier finden sich pluripotente Stammzellen, die wiederum Progenitorzellen bilden, die sich weiter in die verschiedenen Zelltypen des Dünndarmepithels differenzieren. Währenddessen wandern die Zellen entlang der Villi nach oben, bis sie sterben und ins Lumen abgestoßen werden. So wird das gesamte Epithel alle drei bis fünf Tage erneuert. Während der Differenzierung der Vorläuferzellen entstehen so die verschiedenen Zelltypen, zu denen die absorbierenden Enterozyten, Becherzellen, Panethzellen, Tuftzellen und enteroendokrinen Zellen gehören (**Abb. 2.1.2**) (27). Die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen werden durch verschiedene Signalwege beeinflusst und reguliert. Neben dem β -Catenin Signalweg spielen hier der Hedgehog- und der Bone Morphogenetic Protein Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle (28). Den überwiegenden Teil stellen mit 80-90% die Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut, die Enterozyten dar, die der Aufnahme von Ionen, Wasser, Nährstoffen, Vitaminen und der Absorption von unkonjugierten Gallensäuren dienen (29). Es handelt sich um polare Zellen, die an ihrer apikalen Seite Mikrovilli tragen. Über membranständige Enzyme werden Peptide

und Kohlenhydrate gespalten und können anschließend resorbiert werden (25). Durch die Verbindung der Enterozyten über *Tight Junction* Proteine entsteht eine Barriere, die das parazelluläre Eindringen von immunogenen Molekülen aus dem Darmlumen verhindert. Des Weiteren spielen Enterozyten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer immunologischen Toleranz gegenüber aufgenommenen Proteinen aus der Nahrung und mikrobieller Peptide (29). Durch die Degradation von Antigenen in den Lysosomen und deren Präsentation gegenüber T-Zellen sind Enterozyten direkt in Immunprozesse involviert und tragen über die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden direkt zur Abwehr pathogener Keime bei (30).

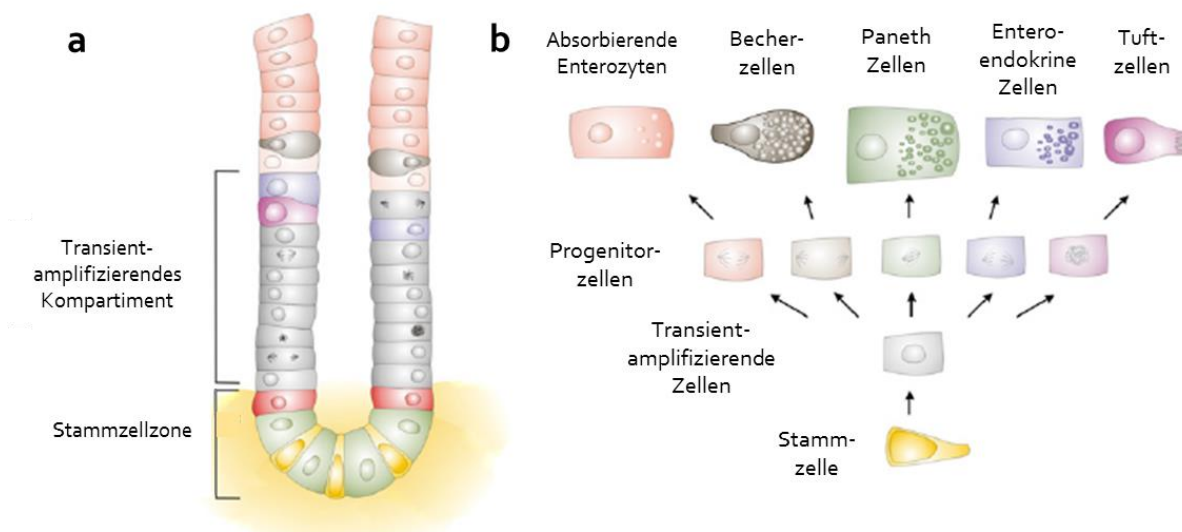


Abb. 2.1.2 Differenzierung von Stammzellen in intestinale Zelltypen (Abbildung aus Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell stem cell*. 2010;7(6):656-70.)

a: Kryptbasis bestehend aus Stammzellzone und Transient- amplifizierendem Kompartiment, **b:** Differenzierungsmöglichkeiten von Stammzellen

5-10% der Stammzellen differenzieren zu Becherzellen, die der Sekretion von Schleim (*Mucus*) dienen. Dieser dient zum einen als Gleitschleim und erleichtert den Transport des Nahrungsbreis. Zum anderen bildet der Schleim eine schützende Schicht, indem er körpereigene und fremde Enzyme, Mikroorganismen und Toxine vom Epithel abschirmt (26, 31). Außerdem enthält der *Mucus* Immunglobulin A (IgA), welches Pathogene und bakterielle Exotoxine binden und dadurch neutralisieren kann (32). Der Anteil der Paneth-Zellen liegt bei etwa 5%. Sie befinden sich am Grund der Krypten und regulieren die lokale mikrobielle

Flora durch die Sekretion von Lysozym und Defensinen. Lysozym ist ein bakteriolytisches Enzym, das die Zellwand der Bakterien schädigt. Defensine gehören zu den antimikrobiellen Peptiden und dienen der Abwehr von Bakterien, Viren und Pilzen (26, 27, 33). Den geringsten Anteil der Epithelzellen machen die enteroendokrinen Zellen aus (1%). Es gibt zwölf verschiedene endokrine Zelltypen, die mehr als 20 verschiedene Hormone sezernieren. Dazu gehören unter anderem Gastrin, Cholezystokinin, Sekretin, Somatostatin, Serotonin und Enteroglukagon. Enteroendokrine Zellen regulieren die Verdauungstätigkeit, sie nehmen Einfluss auf Appetit, Magenentleerung, Enzymfreisetzung, Darmdurchlässigkeit, Insulinsekretion und Immunantwort (26, 34).

2.2 Bedeutung der Mikrobiota

Der menschliche Körper wird von einer Vielzahl Mikroorganismen besiedelt, darunter Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen. In ihrer Gesamtheit bilden sie über 100 Trillionen Zellen, mehr als ein menschlicher Organismus besitzt (35, 36). Man findet sie vor allem auf Körperpartien, die mit der Außenwelt in Kontakt stehen, wie Haut, Respirationstrakt und Magen-Darm-Trakt. Die Gesamtheit apathogener Mikroorganismen, die den Menschen besiedeln, bezeichnet man als autochthone Flora (37). Die meisten Bakterien finden sich im Darm, mit einer Zahl von über 10^{13} , was einer Biomasse von 1,5- 2 kg entspricht. (38, 39). Bis heute konnten über 1200 verschiedene Spezies im menschlichen Darm nachgewiesen werden, wobei jeder Mensch mindestens 160 davon beherbergt (36). Bei über 99% handelt es sich um anaerobe Bakterien. Von proximal nach distal zeigt sich ein Anstieg in Diversität und Quantität der Mikrobiota mit der dichtesten Besiedelung im Kolon und Rektum (36, 40, 41). Man findet fünf Hauptstämme von Bakterien, zu denen die *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobakterien*, *Proteobakterien* und *Verrucomokrobiota* gehören (**Abb. 2.2**) (39). Man vermutet, dass die Kolonisation des Darms bereits pränatal durch Bakterien in Plazenta und Amnionflüssigkeit beginnt (42). Während der Geburt kommt der Fötus dann in Kontakt mit der maternalen vaginalen und fäkalen Mikrobiota. Aus dieser Besiedelung entsteht mit der Zeit ein komplexes Ökosystem, dessen Struktur von Genetik und Umweltfaktoren bestimmt wird (36, 39, 41). Ernährung, Gesundheitszustand, Lebensumfeld und Medikamente wie Antibiotika haben einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen

Mikrobiota (36). Zeitweise Veränderungen durch Infektionen oder die Einnahme von Antibiotika können wieder ausgeglichen werden, was man als Resilienz bezeichnet (43). Die Darmflora beeinflusst unter anderem die anatomische, physiologische und immunologische Entwicklung des Menschen (44). Außerdem verhindert sie die Besiedelung des Darms mit pathogenen Keimen (45, 46) und hilft bei der Metabolisierung von Nährstoffen, die der Wirt nicht verarbeiten kann (38, 47). Durch Zusammenspiel und Wechselwirkungen zwischen Mikrobiota und Darmepithel wird die Homöostase des Magen- Darm- Traktes aufrechterhalten. Eine Veränderung in der Zusammensetzung der Bakterienflora wird als Dysbiose bezeichnet und kann über eine Dysregulation im Immunsystem zu Infektionen, Krebs sowie schweren metabolischen und immunologischen Störungen führen (35, 48). So zeigen viele Arbeiten einen Zusammenhang zwischen einer Dysbiose und Krankheiten wie Diabetes mellitus, Adipositas, Atherosklerose, Darmkrebs sowie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (40, 41, 47, 49-52).

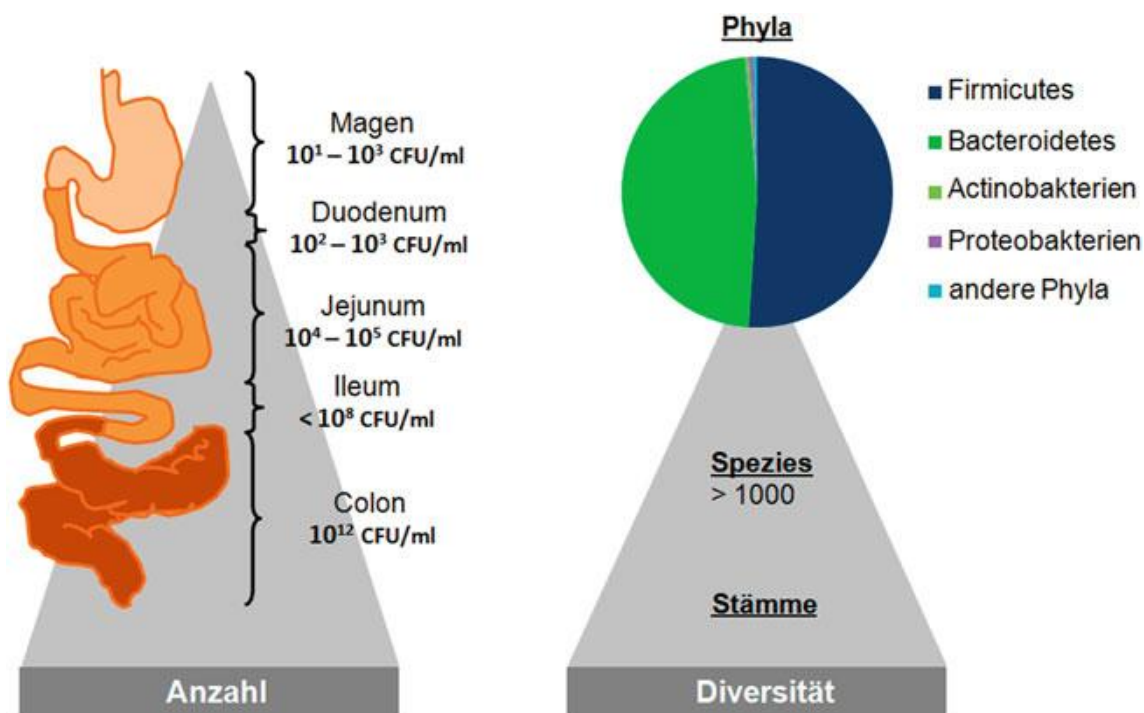


Abb. 2.2 Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota (Abbildung aus Haller D, Hörmannspenger G. Darmgesundheit und Mikrobiota : Ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit. essentials. Wiesbaden2015.)

2.3 Gnotobiotische Tierhaltung

Bei einer gnotobiotischen Tierhaltung ist die mikrobielle Besiedelung der Versuchstiere, vor allem die bakterielle, genau bekannt. Folglich unterscheidet man keimfreie von assoziierten Gnotobioten (37). Man spricht von keimfreien Gnotobioten, wenn die Versuchstiere noch nie Kontakt zu Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen oder anderen parasitologischen Organismen hatten (53). Assoziierte Gnotobioten hingegen sind mit einem qualitativ genau bekannten Bakterienspektrum besiedelt und werden je nach Anzahl der Bakterienspezies als mono-, die- oder triassozierte Tiere bezeichnet (37). Die Grundidee, keimfreie Tiere zu züchten, um die Interaktion zwischen Mikroorganismen und ihrem Wirt besser zu verstehen, hatte bereits Louis Pasteur im Jahre 1885. Rund 10 Jahre später gelang es Nuttall und Thierfelder erstmals, ein Meerschweinchen keimfrei aufzuziehen. Die Aufrechterhaltung des keimfreien Zustands gelang anfangs noch nicht und es dauerte weitere 50 Jahre, bis die Produktion keimfreier Mäuse gelang, deren Reproduktion sich dann in den 50-er Jahren etablierte (54, 55). Die Herstellung keimfreier Tiere kann auf zwei Arten erfolgen: Beim sogenannten Embryotransfer werden physiologisch keimfreie Embryonen in einem Isolator auf keimfreie Empfängertiere übertragen, von diesen ausgetragen und aufgezogen (56). Die andere Methode besteht in der Durchführung eines sterilen Kaiserschnittes kurz vor der natürlichen Geburt. Die Jungtiere werden in Isolatoren übertragen und von keimfreien Ammentieren aufgezogen. Die Haltung keimfreier Tiere erfolgt in Isolatoren aus luftdichten, transparenten, flexiblen PVC-Hüllen (**Abb. 2.3**) (37).

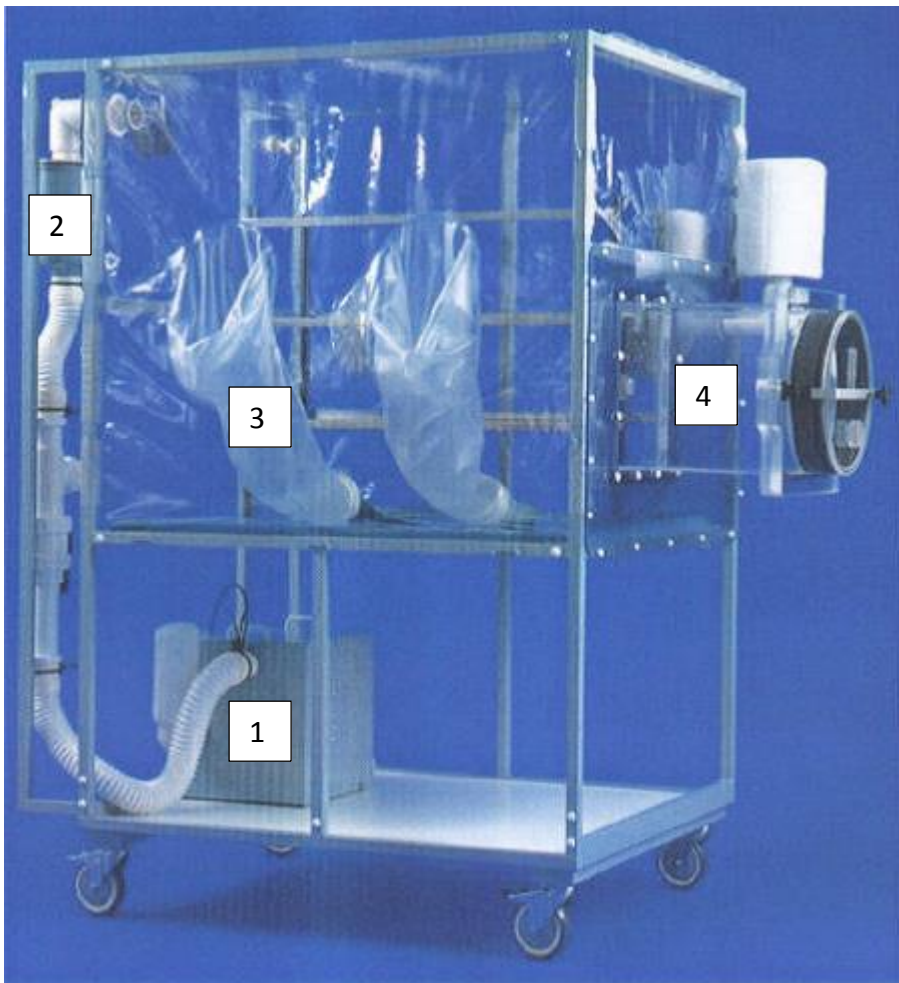


Abb. 2.3 Flexibler Folienisolator zur Haltung keimfreier Mäuse (Abbildung aus Reifenberg DK. Hygiene in Versuchstierhaltungen [Available from: www.ag-wolfrum.bio.uni-mainz.de/Dateien/Vorl7-Hygiene.pdf])

1: Ventilator zur Versorgung mit Frischluft, 2: Sterilfilter, 3: Handschuhe, 4: Materialschleuse

Tiere, die herkömmlich, also mit Kontakt zur Außenwelt, aufgezogen werden und deren Keimbeseidlung unbekannt ist, werden als konventionell-aufgewachsene (CONV-R, *conventionally raised*) Mäuse bezeichnet. Sogenannte kolonisierte keimfreie (CONV-D, *conventionally derived*) Mäuse sind hingegen ehemals keimfreie Tiere, die mit der Flora einer konventionell- aufgewachsenen Maus in Kontakt gekommen sind (53).

Es existieren viele Untersuchungen zu den Mikrobiota- abhängigen Unterschieden zwischen keimfreien und konventionell- aufgewachsenen Mäusen, die erstmals 1963 vorgenommen wurden (57). 2012 gelang es Reinhardt C. et al. in mechanistischen Untersuchungen, den Einfluss der Mikrobiota auf die Vaskularisierung des Dünndarms zu zeigen (58). Weitere Versuche weisen gravierende Einflüsse der Mikrobiota auf die morphologische, physiologische, biochemische und immunologische Entwicklung des Wirtes nach (**Tabelle**

2.3 (45). Morphologisch zeigen keimfreie Mäuse einen größeren Blinddarm und längere, aber dünnere Villi. Das Gewicht der Darmwand ist geringer, die Darmoberfläche sowie die Dicke der Lamina propria sind verringert. Physiologisch und biochemisch zeigen keimfreie Tiere eine verminderte Darmperistaltik und Proliferationsrate des Darmepithels. Der pH-Wert sowie der Blutfluss im Darm sind verringert, wohingegen die Sauerstoffmenge und damit das Oxidations- und Reduktionspotential im Darm erhöht ist. Das Herzminutenvolumen und das gesamte Blutvolumen sind bei keimfreien Mäusen vermindert. Immunologisch finden sich kleinere Lymphknoten und Peyer-Plaques sowie weniger intraepitheliale T-Zellen. Somit reagieren keimfreie Tiere mit einer verspäteten Immun- und geringeren Entzündungsantwort auf Einflüsse von außen (45, 54, 55, 57, 58).

Physiologische Veränderungen	Morphologische Veränderungen	Immunologische Veränderungen
Darmperistaltik	Blinddarmgröße	Intraepitheliale T-Zellen
Proliferationsrate des Darmepithels	Länge der Villi	Lymphknoten
Blutfluss im Darm	Darmwandgewicht	Peyer-Plaques
pH-Wert im Darm	Darmoberfläche	
Sauerstoffmenge im Darm	Dicke der Lamina propria	
Herzminutenvolumen		

Tabelle 2.3 Charakteristika keimfreier Mäuse im Vergleich zu konventionell- aufgewachsenen Mäusen (45)

rot= verringert, grün= vergrößert

2.4 Morbus Crohn

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (CU) sind die häufigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Das mittlere Erkrankungsalter von Morbus Crohn Patienten liegt zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr. Die Inzidenz in Europa beträgt 6/ 100.000/J (59). Es zeigt sich eine familiäre Häufung mit polygenetischem Hintergrund. So führt eine homozygote NOD2 (*Nucleotide- binding Oligomerization Domain*) -Mutation zu einem 17-fach erhöhten Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken (60-62). NOD-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem und sind in der Lage, in das Zytoplasma eingedrungene Bakterien zu erkennen und über nachfolgende Signalwege zu bekämpfen (63, 64). Ätiologie und Pathogenese des Morbus Crohn sind bisher unbekannt, wobei man

vermutet, dass Stillen protektiv wirkt und häufige Antibiotikabehandlungen in der Kindheit das Risiko für CED erhöhen (65). Auffällig ist auch, dass bestimmte Bevölkerungsgruppen häufiger an Morbus Crohn erkranken. Besonders hohe Inzidenzen finden sich bei Ashkenazi-Juden, in Städten und nördlichen Regionen. Als weitere Risikofaktoren gelten Rauchen, ballaststoffarme Ernährung, wenig Schlaf, Stress, Vitamin D-Mangel, sowie die Einnahme bestimmter Medikamente wie Aspirin, nichtsteroidale-Antirheumatika und Kontrazeptiva. Rauchen ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert (66).

Generell scheinen die Mikrobiota und eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems durch die kommensale Bakterienflora eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen (38). Bisher hat man kein bestimmtes Bakterium gefunden, das alleine für die Pathogenese verantwortlich ist. Man vermutet eher eine Dysbiose in der Darmflora, mit einer Abnahme an Symbionten und einer Zunahme pathogener Erreger, die zu den üblicherweise schubweise verlaufenden Entzündungen führt. Untersuchungen zeigen zudem eine verminderte Sekretion von alpha-Defensin 5 (HD5) und HD6, wichtige antimikrobielle Peptide, die von den Paneth-Zellen sezerniert werden (67). Dadurch verringert sich die Abwehr- und Barrierefunktion der Darmschleimhaut.

Pathogenetisch verläuft die Erkrankung in drei Phasen: Zunächst kommt es zu einem Eindringen von Bakterien in die Darmschleimhaut, gefolgt von einer Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen, die die Krypten infiltrieren und Zytokine sezernieren. Dies führt zu einer Schädigung der Darmschleimhaut, was sich in Form von Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen äußert. Es bilden sich dabei Knötchenaggregate von Entzündungszellen, die man als Granulome bezeichnet (26). Die Erkrankung manifestiert sich am häufigsten im terminalen Ileum, wobei jeder Abschnitt des Gastrointestinaltraktes betroffen sein kann. Typisch ist ein diskontinuierlicher Befall mit einer transmuralen Entzündung aller Schichten der Darmwand. Leitsymptom sind chronisch-rezidivierende Abdominalschmerzen und Durchfälle. Zu den typischen Komplikationen gehören Fisteln, anorektale Abszesse, Darmstenosen und Malabsorptionssyndrome (64). Bei Kindern kann es zu Wachstumsstörungen kommen. Zudem ist das Risiko für kolorektale Karzinome erhöht (68-70). Generell verläuft die Erkrankung schubweise. Die Diagnosestellung erfolgt mittels Endoskopie mit typischer Morphologie, klinischem Verlauf und vereinbar, nicht immer spezifischer Histologie aus Darmbiopsien. Zur Therapie eignen sich Medikamente mit

immunmodulierender Wirkung sowie bei Komplikationen chirurgische Maßnahmen. Generell besteht eine hohe Rezidivrate. Die Lebenserwartung ist bei gut wirksamer Therapie normal (65).

2.5 NADPH-Oxidase-Familie und die Rolle von Duox2 und DuoxA2

Die epitheliale Barriere des Darms und das Freisetzen antimikrobieller Stoffe gehören zu den Grundabwehrmechanismen gegen pathogene Erreger. Durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), z.B. im Phagosom von neutrophilen Granulozyten, können fremde DNA und Proteine zerstört und so Schädigungen der Darmschleimhaut eine Entzündungsreaktion verhindert werden. ROS werden unter anderem von der Familie der Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen (NOX) synthetisiert. Dazu gehören NOX1-5 sowie Dual Oxidase 1 (DUOX1; Protein) und Dual Oxidase 2 (DUOX2; Protein), die im Epithel verschiedener Organe wie zum Beispiel in der apikalen Membran ausdifferenzierter Enterozyten des Darms synthetisiert werden (71). NOX1-5 katalysieren die Reduktion von extrazellulärem Sauerstoff zu Superoxid, indem NADPH oxidiert wird. DUOX1 und DUOX2 hingegen produzieren Wasserstoffperoxid (72). Alle NADPH-Oxidasen haben einen ähnlichen Aufbau: Sie bestehen aus einer C-terminalen intrazellulären Domäne, die NADPH und Flavin- Adenin- Dinucleotid (FAD) binden kann und sechs transmembranären Helices, die wiederum Bindungsstelle für zwei Hämgruppen darstellen. DUOX1 und DUOX2 besitzen zusätzlich eine N-terminale extrazelluläre Peroxidase homologe Domäne, eine weitere transmembranäre Helix und eine cytosolische EF-Hand enthaltenden Region, die Calcium binden kann (**Abb. 2.5**). Für die volle Funktionsfähigkeit und den Einbau von DUOX2 in die Plasmamembran ist der Reifefaktor Duox- Aktivator 2 (DUOXA2; Protein) nötig (71).

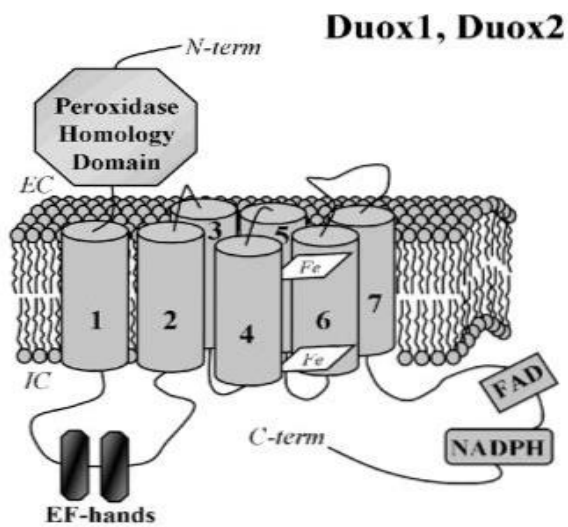


Abb. 2.5 Aufbau von DUOX1, DUOX2 (Abbildung aus Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(10):2607-19.)

NADPH-Oxidasen, insbesondere DUOX, findet man nicht nur im Darm, sondern auch in der Schilddrüse, im Respirationstrakt, in den exokrinen Drüsen und auf Schleimhäuten. In der Schilddrüse dient DUOX als Generator von Wasserstoffperoxid, welches wiederum als Elektronenakzeptor bei der Synthese der Schilddrüsenhormone durch die Thyreoperoxidase fungiert. Patienten mit Duox2 (Gen)-Mutationen zeigen eine kongenitale Hypothyreose, da die Synthese der Schilddrüsenhormone gestört ist (72). Über die Oxidasekomplexe NOX1-p22^{phox} und DUOX2-DUOXA2 sind auch Zellen in der Mukosa des Darms in der Lage, ROS zu produzieren (73). Die Aktivierung von Duox fördert die Stammzellproliferation und – differenzierung. Des Weiteren ist das DUOX-System essentiell für die Beseitigung von Erregern und ist in viele verschiedene Signalwege eingebunden (74). DUOX2 wird im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert, NOX1 nur im Colon (73). Eine besonders hohe Expression von DUOX2 findet man im Coecum und Sigmoidium, hier vor allem in der apikalen Membran von ausdifferenzierten Enterozyten (71). Im Darm hilft DUOX bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. So führt ein Duox-knock-out bei Drosophila Fliegen zu einer veränderten kommensalen Bakterienflora, es finden sich mehr Bakterien und Pilze. Damit erhöhte sich die Mortalität der Fliegen (71, 74). Verschiedene Arbeiten weisen darauf hin, dass Duox durch die Mikrobiota reguliert wird (8, 11). So zeigen konventionell aufgezogene Mäuse eine höhere Produktion von ROS als keimfreie Mäuse. Nicht alle Mechanismen der Induktion von Duox sind geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass

Toll-like Rezeptoren (TLRs), ein Bestandteil des innaten Immunsystems, durch die Mikrobiota aktiviert werden und zur Induktion von Duox führen können (74). Versuche zeigten außerdem, dass die Expression von DUOX2 sehr stark durch eine normale Mikrobiota induziert wird, eine Kolonisierung keimfreier Mäuse mit verschiedenen Kommensalen aber keinen so starken Effekt aufweist. Des Weiteren scheint die Induktion von Duox2 durch die Mikrobiota im Colon schneller zu verlaufen als im Ileum, da unterschiedliche Signalwege involviert sind. Im Dünndarm spielt TIR-enthaltendes Interferon- β -induzierendes Adaptermolekül (TRIF) eine Rolle in der Regulation von Duox2 (11).

Eine gestörte Produktion von ROS findet man bei vielen Krankheiten wie auch bei Darmtumoren. So zeigt sich eine erhöhte Expression von NOX1 in Adenomen und gut differenzierten Adenokarzinomen im Colon (75). Auch in der Pathogenese von CED scheinen NADPH-Oxidasen eine wesentliche Rolle zu spielen. Duox2 und DuoxA2 gehören zu den Genen, die bei Patienten mit CED am stärksten hochreguliert werden (2). Eine Überproduktion von ROS scheint mit Colitis ulcerosa in Zusammenhang zu stehen, wohingegen ein Mangel an ROS zur Pathophysiologie bei Morbus Crohn beizutragen scheint (76). Grasberger H. et al. zeigten eine erhöhte Expression von DUOX2 bereits vor der eigentlichen Entzündungsphase, was die Ursache von CED in einer Dysbiose der intestinalen Flora vermuten lässt. Über die Produktion von ROS reguliert DUOX2 die Interaktion zwischen Mikrobiota und Darmepithel und trägt so zu einer immunologischen Homöostase im Darm bei. Eine Dysbiose erhöht die Expression von DUOX2, weshalb man dies als frühen Marker für eine gestörte Homöostase bei CED nutzen könnte (8).

Um oxidativen Stress durch zu viele ROS zu verhindern, muss ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Detoxifikationsmechanismen aufrechterhalten werden (77). So kann das Zellgift Wasserstoffperoxid über Katalase und Glutathion entgiftet werden (71).

2.6 Signalwege zur Aufrechterhaltung der Epithelzellhomöostase im Dünndarm

Das Dünndarmepithel bildet neben seiner resorptiven Funktion auch eine schützende Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen (29, 30). Aufgrund der vielfältigen Einflüsse, die auf das Epithel wirken und dem daraus resultierenden Zellverlust, findet alle drei bis fünf Tage eine komplette Erneuerung der Zellschicht aus den Stammzellen der Krypten statt (27, 28). Unter gleichbleibenden Bedingungen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung. Dahingegen führen Entzündungen und Verletzungen des Epithels zu einer erhöhten Proliferationsrate (15). Die ständige Zellerneuerung dient allerdings nicht nur dem Ersatz abgestorbener Zellen, sondern verhindert auch eine Besiedelung des Epithels mit Parasiten und das Eindringen pathogener Keime (15, 78). Es existieren verschiedene Signaltransduktionsmechanismen, die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen regulieren und so die Homöostase im Dünndarm aufrechterhalten (28). Das Prinzip der Regulation besteht in negativen Feedback-Mechanismen. So senden differenzierte Zellen Signale aus, die die Proliferation und die Größe des Vorläuferzellkompartiments hemmen. Kommt es zum Verlust von differenzierten Zellen, fällt die Hemmung weg und die Proliferation steigt an (15).

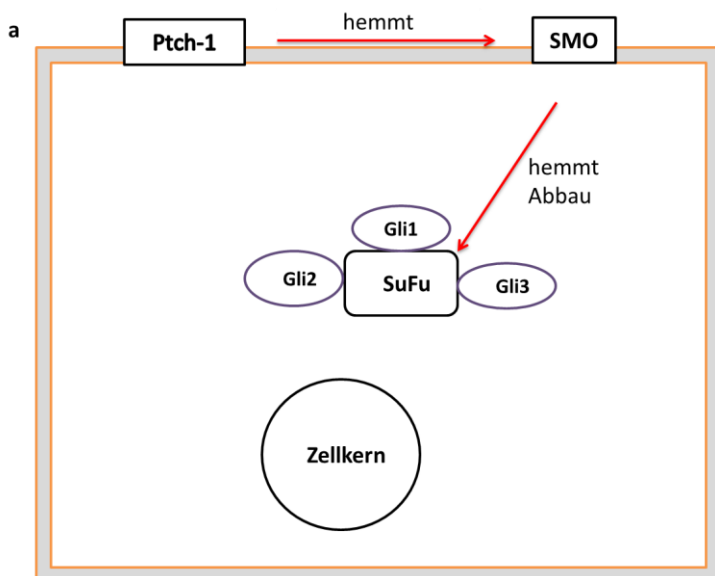
2.6.1 Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog (Hh)-Signaltransduktionsweg spielt nicht nur in der embryonalen Entwicklung eine große Rolle, sondern ist auch ein Schlüsselfaktor in der Regulation der Stammzellhomöostase im adulten Darm (15). Dysregulationen können zu kongenitalen Syndromen wie Holoprosencephalus führen, und eine Überaktivierung im Hh-Signaltransduktionsweg scheint in Verbindung mit der Entwicklung verschiedener Krebsarten wie Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen zu stehen (79, 80). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen in Zielgenen des Signalweges das Risiko für CED erhöhen können (14, 15).

In Mäusen und Menschen findet man drei verschiedene epithelial-exprimierte Hh-Liganden,

Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh). Ihh wird im gesamten Gastrointestinaltrakt synthetisiert, wobei die Expression in den Epithelzellen des proximalen Duodenums am höchsten ist. Shh findet sich vor allem im Magen und Colon, wobei die geringen in den Krypten von Dünndarm und Colon exprimierten Level schwer zu detektieren sind (81). Folglich scheint Shh in der Homöostase des adulten Dünndarms nur eine geringe Rolle zu spielen (15). Ein Verlust von Ihh hingegen führt zu einer erhöhten Proliferation und dem Einwandern von Fibroblasten, Makrophagen und Leukozyten in die Villi, was die Bedeutung von Ihh für die Dünndarmhomöostase zeigt (14).

Abb. 2.6.1 zeigt den inaktiven und den aktiven Zustand des Hh-Signalweges. Im Ruhezustand (**Abb. 2.6.1 a**) inhibiert der Transmembranrezeptor Patched (Ptch) den Transmembranrezeptor Smoothed (Smo), sodass die Ubiquitinierung und damit der Abbau des Proteins Suppressor of Fused (SuFu) gehemmt wird. SuFu wiederum bindet die Glioblastoma Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3 und verhindert so deren Translokation in den Zellkern. Im aktiven Zustand (**Abb. 2.6.1 b**) binden die Hh- Liganden an Ptch, sodass durch eine Konformationsänderung der inhibierende Effekt auf Smo aufgehoben wird. Auch Smo verliert durch eine Konformationsänderung seine hemmende Wirkung auf SuFu, wodurch dieses ubiquitiniert und abgebaut wird und die Glioblastoma Transkriptionsfaktoren in den Zellkern dislozieren können. Als Folge werden dort die Hh-Zielgene transkribiert (79, 80). Bei der Signaltransduktion wirken die Glioblastoma Transkriptionsfaktoren Gli1 und Gli2 als Aktivatoren (82-84), wohingegen Gli3 als Repressor fungiert (85).



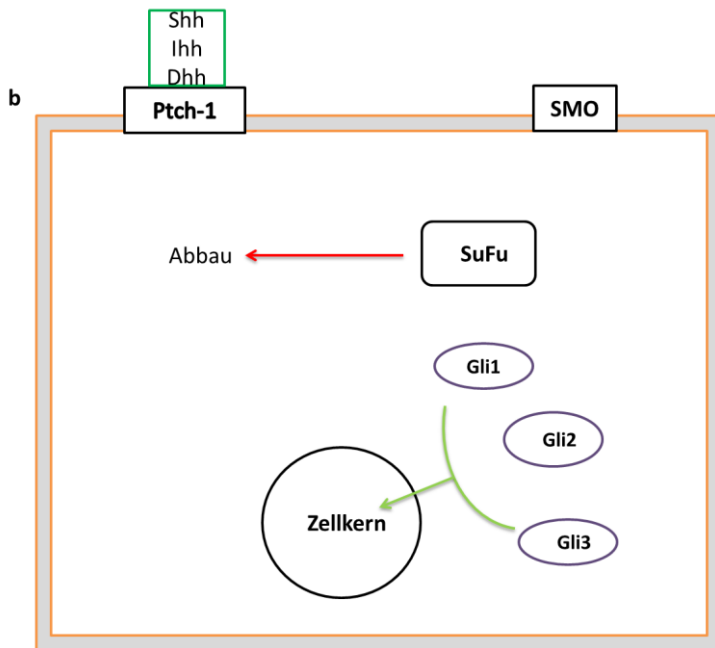


Abb. 2.6.1 Hedgehog- Signalweg. a: Inaktiver Zustand, b: aktiver Zustand

2.6.2 Bone Morphogenetic Protein-Signalweg

Bone Morphogenetic Proteine (BMP) gehören zur *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) Superfamilie. Sie beeinflussen viele verschiedene Zelltypen und Organsysteme und spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung sowie bei der Regulation der adulten Gewebekomöostase. Sie regulieren unter anderem das Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung (22). Es existieren etwa 20 verschiedene BMPs (86), wobei vor allem BMP2, -4, und -7 im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden und dort eine wichtige Rolle in der Regulation von Zelldifferenzierung und –Proliferation spielen (21). Eine Expression von BMPs findet man sowohl in den Epithelzellen (BMP2), wie auch in den Mesenchymzellen des Darms (BMP4, BMP7) (87). **Abb. 2.6.2 zeigt** die Hauptkomponenten des BMP-Signalweges. BMPs binden an den BMP Typ1 Rezeptor (BMPR-1), was zur Dimerisierung mit dem BMP Typ2 Rezeptor (BMPR-2) führt, ein Serin/Threonin- Kinase- Rezeptor. Dies wiederum triggert die Phosphorylierung von SMAD 1, -5 und -8, die daraufhin einen heterodimeren Komplex mit SMAD4 bilden. Der Komplex transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkription der Zielgene (21, 86, 88).

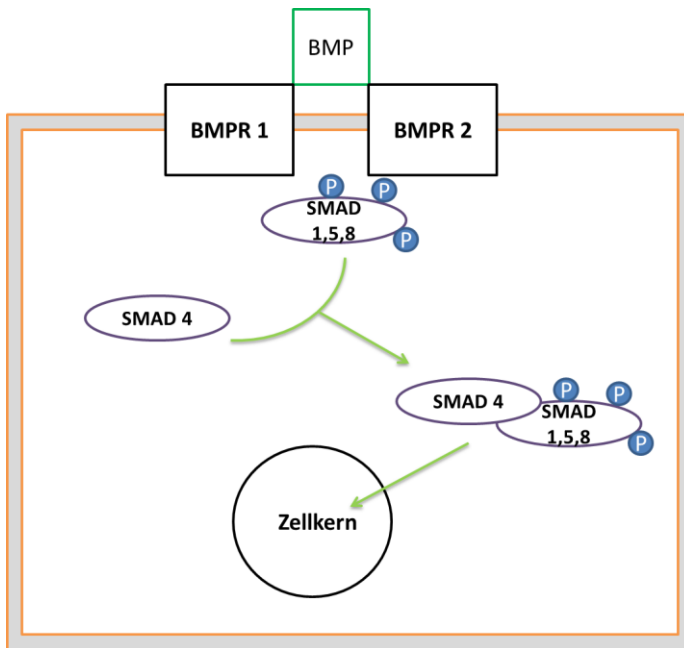


Abb. 2.6.2 Bone Morphogenetic Protein- Signalweg

Sowohl der Hh- wie auch der BMP-Signaltransduktionsweg wirken über einen negativen Feedbackmechanismus auf die Proliferation und Differenzierung des Stammzellkompartiments der Krypten. Die Zielgene des Hh-Signalweges wirken vom Epithel ausgehend auf das darunter liegende Mesenchym. Über vom Mesenchym sezernierte BMPs wird der sogenannte kanonischen Wnt-Signalweg gehemmt, der wiederum aktivierend auf die Proliferation der Stammzellen in den Krypten wirkt (**Abb. 2.6.3**). Somit führt eine vermehrte Aktivierung des Hh-Signalweges zu einer Hemmung der Proliferation und Differenzierung des Dünndarmepithels (15).

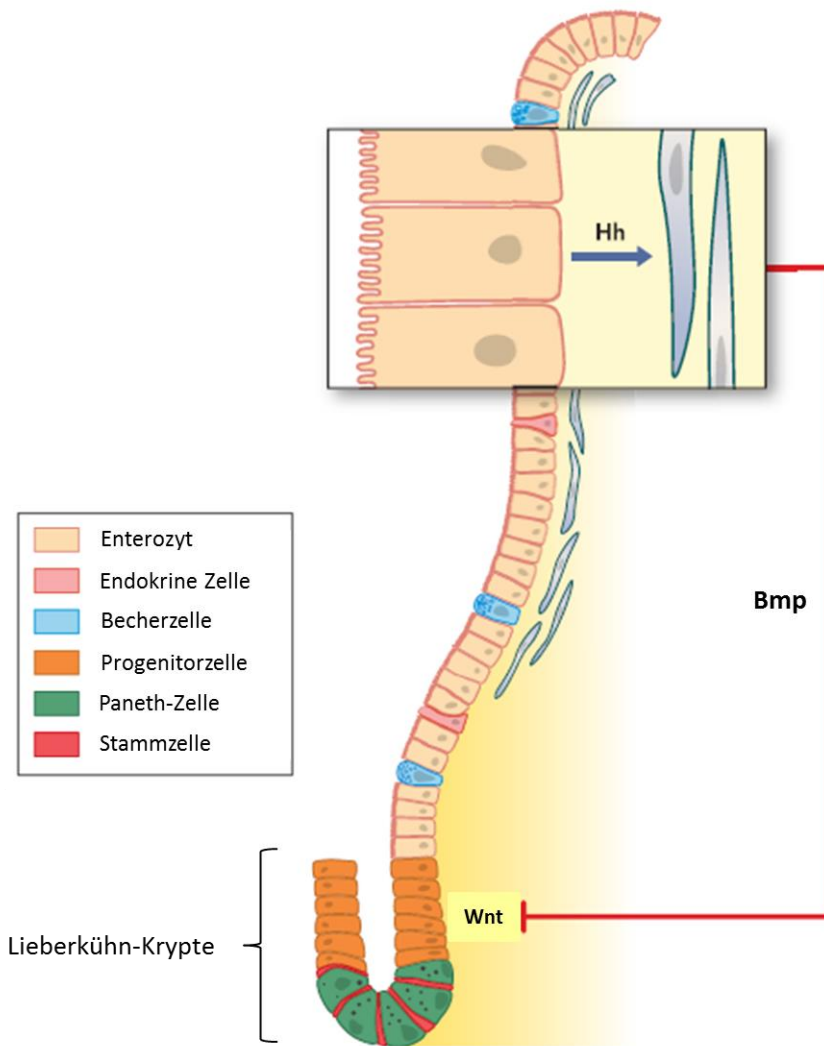


Abb. 2.6.3 Zusammenhang des Hedgehog-, BMP-, und Wnt-Signaltransduktionsweges (Abbildung aus Buller NV, Rosekrans SL, Westerlund J, van den Brink GR. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology* (Bethesda, Md). 2012;27(3):148-55.)

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mauslinien

Tabelle 3.1.1: *Mauslinien*

Stamm	Typ	Herkunft	Zucht
C57BL/6J	Inzuchtstamm, spontane Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
Duox2thyd/J	Kongener Stamm, spontane Mutation (89)	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung

3.1.2 Geräte

Tabelle 3.1.2: *Geräte*

Gerät	Modell	Hersteller
Feinwaage	R180	Sartorius, Göttingen, 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

Mikrozentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, Radnor, USA
PCR-Cycler	Mastercycler® pro	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
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
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
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage	VWR-1502	VWR International, Radnor, USA
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	Megafuge 16R	
	Micro1814	VWR International, Radnor, USA

3.1.3 Software

Tabelle 3.1.3: Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San Jose, USA
GraphPad Prism 6	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmont, USA

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.1.4: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcons (15 mL, 30 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Hämocult Test	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Latexhandschuhe Semper-care	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.h., Wien, Österreich
Metallkugeln (7 mm)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Microseal® PCR Plate Adhesive Sealing Films	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
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
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
Skalpelle	Feather Safety Razor, Ltd., Osaka, Japan

3.1.5 Chemikalien

Tabelle 3.1.5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNase- freies Wasser	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Dextransodiumsulfat (DSS)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
Ethanol, 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS 10-fach Pulver	AppliChem, Chicago, USA
RNase- freie DNase	Quiagen, Hilden, Deutschland
RNA- later Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA

3.1.6 Kits

Tabelle 3.1.6: Kits

Kit	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

3.1.7 Primer

Tabelle 3.1.7: qPCR- Primer

Primer	Gen	Sequenz
BMP4_for	Bone Morphogenetic Protein 4	TTCCTGGTAACCGAATGCTGA
BMP4_rev		CCTGAATCTCGGCGACTTTTT
BMP7_for	Bone Morphogenetic Protein 7	ACGGACAGGGCTTCTCCTAC
BMP7_rev		ATGGTGGTATCGAGGGTGGAA
Duox2_for	Dual Oxidase 2	AAGTTCAAGCAGTACAAGCGAT
Duox2_rev		TAGGCACGTCTGCAAACAG
DuoxA2_for	Dual Oxidase A2	GACGGGGTGCTACCCTTTTAC
DuoxA2_rev		CCCACGGATTCCAGGCAAG
Gli1_for	Glioblastomatranskriptionsfaktor 1	TACCATGAGCCCTTCTTTAGGA
Gli1_rev		GCATCATTGAACCCCGAGTAG
Ihh_for	Indian Hedgehog	GACGAGGAGAACACGGGTG
Ihh_rev		GCGGCCCTCATAGTGTAAGA
Ki67_for	Ki67, Proliferationsmarker	ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT
Ki67_rev		GCTCGCCTTGATGGTTCCT
L32_for	60S ribosomales Protein L32	CCTCTGGTGAAGCCCAAGATC
L32_rev		TCTGGGTTTCCGCCAGTTT
Shh_for	Sonic Hedgehog	AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA
Shh_rev		TGAGTTCCTTAAATCGTTCGGAG

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Alle in den Versuchen verwendeten Mauslinien waren in der TARC (Translational Animal Research Center) der Universitätsmedizin Mainz untergebracht und wurden unter SPF- (*specific-pathogen-free*) bzw. GF- (*germ-free*) Bedingungen gehalten.

Die keimfreien Tiere wurden in keimfreien flexiblen Folienisolatoren gehalten und bekamen unbegrenzt autoklaviertes Futter (LabDiet, St. Louis, MI) und Wasser. Die Haltung erfolgte unter einem künstlichen 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus bei konstanter Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur in EU Typ II IVC Käfigen mit maximal fünf Tieren pro Käfig. Um die Keimfreiheit der Mäuse zu überprüfen, wurden anaerobe Kulturen angelegt sowie PCRs für bakterielle 16s DNA durchgeführt. Alle Tiere waren zwischen 8 und 12 Wochen alt und wurden dem Geschlecht und Alter entsprechend in Gruppen eingeteilt und untersucht.

Alle Versuche wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland- Pfalz genehmigt (G16-1-B13).

Die Genotypisierung der *Duox2^{thyd}/J* Mäuse wurde von einer Mitarbeiterin der JG Reinhardt übernommen. Die Sterilkontrollen der Isolatoren wurden von einer Mitarbeiterin der JG Reinhardt durchgeführt.

3.2.2 Kolonisierung keimfreier Mäuse

Für die Kolonisierung der keimfreien Mäuse wurde Kot aus dem Zäkum einer konventionell- aufgezogenen Maus entnommen und den keimfreien Mäusen mittels einer Schlundsonde über den Mund in den Magen-Darm-Trakt eingebracht. Nach den Kolonisierungszeiträumen von 3, 6 und 9 Tagen wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und das Gewebe entnommen.

3.2.3 DSS- Behandlung von Mäusen

Um bei den Mäusen eine Colitis zu induzieren, erhielten *C57BL/6J* Mäuse und keimfreie Tiere 7 Tage und *Duox2thyd/J* Mäuse 5 Tage lang 3,5 % Dextran Sodium Sulfat (DSS) über das Trinkwasser. Die erfolgreiche Behandlung wurde mit einem Hämocult- Test überprüft. Dieser zeigt okkultes Blut im Stuhl an und dient als Indikator für das Vorhandensein einer Colitis. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Gewebe entnommen.

3.2.4 Entnahme von Mausgeweben

Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Mit Hilfe eines Sezierbestecks wurde der Bauchraum der Tiere geöffnet und mit einer Pinzette das proximale Ende des Dünndarms lokalisiert und vom Magen abgetrennt. Anschließend wurde durch vorsichtiges Ziehen der Dünndarm aus dem Bauchraum entfernt, das distale Ende aufgesucht und vom Zäkum abgetrennt. Nach der Entnahme des Darms wurde dieser in 8 gleiche Teile geteilt und das 5. Segment (si-5, entspricht dem proximalen Ileum) mit 1-fach Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um die Fäzes zu entfernen. Das entnommene Segment wurde mit Flüssigstickstoff schockgefroren und im Kühlschrank bei -80°C aufbewahrt.

3.2.5 RNA-Extraktion

Für die Isolation der RNA wurde das *RNeasy Mini Kit* von Quiagen verwendet. Hierfür wurden 30 mg Probe (Proben wurden die ganze Zeit auf Stickstoff gehalten) mit 600 µL RLT-Puffer und 6 µL β- Mercaptoethanol in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß versetzt. Hierbei wurde die ganze Zeit auf Eis gearbeitet. Anschließend wurden 2 Metallkugeln hinzugegeben und die Proben für 5 Minuten bei 30 Herz in der Schwingkugelmühle (tissue lyser II) homogenisiert und danach für 3 Minuten bei höchster Geschwindigkeit (full speed) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß gegeben und die weitere Extraktion der RNA nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe eines

Photometers (NanoDrop) wurde die Konzentration der RNA gemessen und anschließend auf eine Konzentration von 200 ng/ μL für die anschließende cDNA- Synthese eingestellt.

3.2.6 cDNA- Synthese

Für die Synthese der cDNA aus der extrahierten RNA wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit* von Thermo Fisher Scientific verwendet. Hierfür wurden 10 μL RNA (Konzentration 200 ng/ μL) mit 10 μL Mastermix (**Tabelle 3.2.1**) durch Auf-und Abpipettieren vermischt und anschließend mit dem PCR- Cycler (Programm: **Tabelle 3.2.2**) umgeschrieben.

Tabelle 3.2.1: Mastermix cDNA- Synthese

	μL / Reaktion
10x RT Puffer	2,0
10x RT Random Primer	0,8
25x dNTP Mix (100 mM)	2,0
RT (50 U/ μL)	1,0
H ₂ O	4,2

Tabelle 3.2.2: PCR- Programm

Zeit	Temperatur	
180 Sekunden	93°C	
30 Sekunden	93°C	35x
60 Sekunden	59°C	
60 Sekunden	72°C	
600 Sekunden	72°C	

3.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um die aus den Geweben gewonnene mRNA zu quantifizieren, wurde die semiquantitative PCR- Methode verwendet. Das hierfür benötigte Referenzgen, in diesem Fall das 60S ribosomale Protein L32, ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, welches konstant und unabhängig von äußeren Einflüssen synthetisiert wird.

Für die qPCR wurde die gewonnene cDNA auf 5 ng/ μL verdünnt. Anschließend wurden für jede Reaktion 16 μL Mastermix (**Tabelle 3.2.3**) und 4 μL cDNA in eine qPCR-Platte pipettiert und diese bei 1500 rpm (*revolutions per minute*) für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die Platte mit dem in **Tabelle 3.2.4** gezeigten Programm mit dem Real- Time PCR- Cycler gestartet und entwickelt.

Jede Probe wurde hierbei 3-fach bestimmt und die Expression des Zielgens ins Verhältnis zur relativen mRNA- Expression des Referenzgens gesetzt. Für die Analyse wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ - Methode verwendet.

Tabelle 3.2.3: Mastermix für eine halbe qPCR- Platte

	Menge
SYBR Green Supermix	520,0 μL
DNase freies Wasser	306,8 μL
Primer forward	2,6 μL
Primer review	2,6 μL

Tabelle 3.2.4: qPCR- Programm

Zeit	Temperatur	
180 Sekunden	95°C	
2 Sekunden	98°C	50x
5 Sekunden	60°C: Platte lesen	
Schmelzkurve	75-95°C	0,2°C für 10 Sekunden, Platte lesen

3.2.8 Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der *Student's two-tailed-t-Test* verwendet und für den Vergleich mehrerer Gruppen der *One- way ANOVA Test*. Ausreißer wurden mit dem *GraphPad outlier calculator* bestimmt und herausgenommen. P- Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angenommen. Hierbei wurde $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit **, $p < 0.005$ mit *** und $p < 0.001$ mit **** markiert.

3.2.9 Auswahl der Crohn-Patienten und Kontrollen

Die Probanden für diese Arbeit wurden in der Darm-Ambulanz der Inneren Medizin der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen eines Aufklärungsgespräches für eine Koloskopie rekrutiert (Probandeninformation **Abb. 8.1, 8.2**). Die Erhebung von Patientendaten sowie die Gewinnung von Probenmaterial wurde auf Antrag durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Bearb.-Nr. 837.056.15(9824)). Die Aufklärung erfolgte mindestens am Vortag der Koloskopie und wurde durch den in der Darm-Ambulanz jeweils zuständigen Arzt/Ärztin durchgeführt. Einschlusskriterien für Probanden mit Morbus Crohn waren ein Alter zwischen 18 und 75 Jahren, ein klinisch und histologisch gesicherter Morbus Crohn, sowie eine zumindest leichtgradige entzündliche Aktivität im terminalen Ileum der entnommenen Proben. Das Ausmaß der entzündlichen Aktivität des entsprechenden Dünndarmabschnittes wurde über die im Rahmen der Routine außerhalb der Studie parallel durchgeführte histologische Untersuchung am Institut für Pathologie definiert. Die Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren ein Alter zwischen 18 und 75 Jahren, fehlender Hinweis auf das Vorliegen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung oder sonstigen pathologischen Veränderungen oder Voroperationen an Colon oder terminalem Ileum. Die Indikation für eine Koloskopie bei der Kontrollgruppe bestand in einer Vorsorgeuntersuchung oder auf Grund einer Polyposis coli. Außerdem wurden diejenigen Kontrollen ausgewählt, die generell die wenigsten Medikamente einnahmen, um eventuelle Interaktionen der Medikamente mit der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes möglichst gering zu halten.

Als vollständige Ausschlusskriterien, sowohl für die Patienten mit Morbus Crohn als auch für die Kontrollprobanden, galten eine bestehende Schwangerschaft, sowie Kontraindikationen für eine Koloskopie mit Probenentnahme, wie z.B. eine bestehende therapeutische Antikoagulation.

Im Anhang findet sich eine Tabelle mit den entsprechenden Charakteristika der eingeschlossenen Crohn-Patienten und Kontrollprobanden (**Tabelle 3.2.5, 3.2.6**).

3.2.10 Entnahme der menschlichen Gewebeproben

Die Koloskopien fanden in der Interdisziplinären Endoskopie der Universitätsmedizin Mainz statt und wurden von den dort arbeitenden Gastroenterologen durchgeführt. Während der Koloskopie wurde eine Standardnarkose mit Propofol angewendet. Die Entnahme der Proben aus dem terminalen Ileum erfolgte mit einer konventionellen Darmbiopsiezange. Pro Patient wurden zwei ca. 3 mm große Gewebestücke entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung und Untersuchung in RNA-later-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei – 20°C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1 DSS-Behandlung verändert Expression von Duox2 und DuoxA2 in CONV-R und keimfreien Mäusen

Um den Einfluss einer Colitis auf die Expression von Duox2 und DuoxA2 zu untersuchen, wurden konventionell aufgewachsene und keimfreie Mäuse 7 Tage lang mit 3,5 % DSS, das über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt.

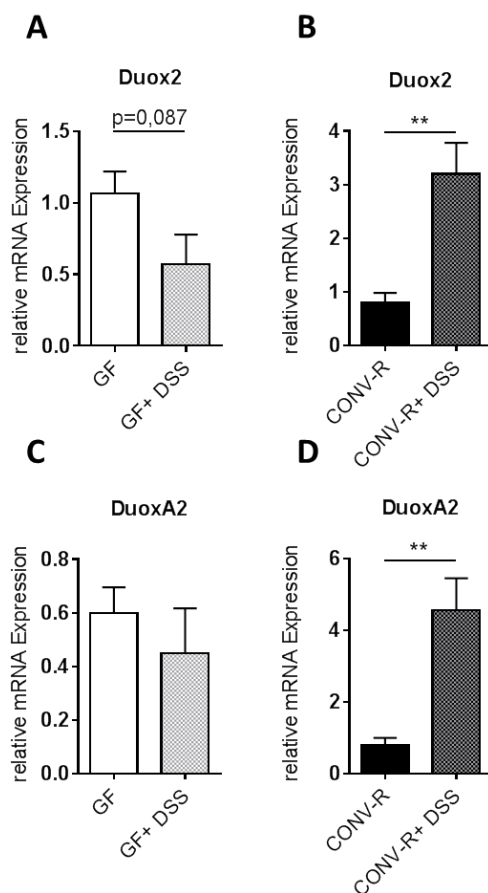


Abb. 4.1 DSS-Behandlung induziert Expression von Duox2 und DuoxA2 mikrobiotaabhängig

Relative mRNA Expression von **A:** Duox2 **B:** Duox2 **C:** DuoxA2 **D:** DuoxA2 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in CONV-R und CONV-R+ DSS (n=7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Die mRNA Spiegel des zur Gruppe der NADPH-Oxidasen gehörenden Proteins Duox2 und dessen Aktivator DuoxA2 zeigten eine signifikante Hochregulation in DSS-behandelten konventionell aufgezogenen Mäusen im Vergleich zu CONV-R Mäusen (**Abb. 4.1. B, D**). Die

keimfreien Mäuse wiesen im Gegensatz zu den CONV-R Mäusen eine deutlich verminderte Expression von Duox2 sowie eine geringere mRNA Expression von DuoxA2 nach DSS-Behandlung auf (**Abb.4.1. A, C**).

4.2 DSS-Behandlung beeinflusst Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion in CONV-R Mäusen

Um den Einfluss einer Colitis auf die Hh- und BMP-Signaltransduktion und die Proliferation zu untersuchen, wurden konventionell aufgewachsene und keimfreie Mäuse 7 Tage lang mit 3,5 % DSS, das über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt.

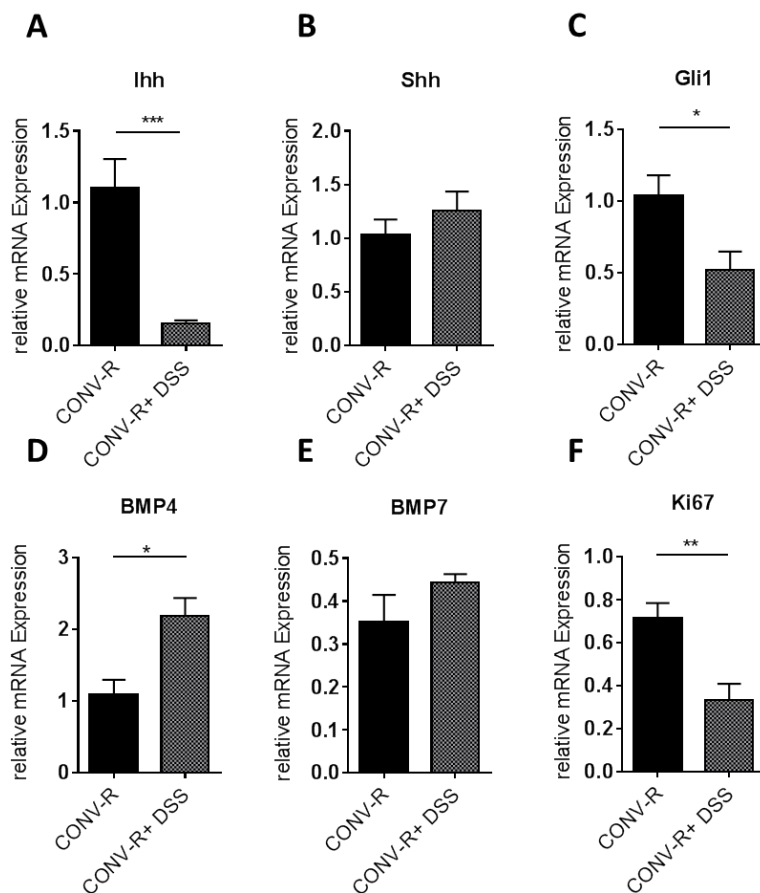


Abb. 4.2 DSS-Behandlung beeinflusst Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion in CONV-R Mäusen

Relative mRNA Expression von **A:** Ihh, **B:** Shh, **C:** Gli1, **D:** BMP4, **E:** BMP7, **F:** Ki-67 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in GF und GF+ DSS (n=7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

Im Experiment zeigte sich eine signifikante Herunterregulation des Hh-Liganden Ihh sowie dessen Zielgens Gli1 in DSS-behandelten CONV-R Mäusen, wohingegen die Shh Expression unverändert zwischen den Gruppen war (**Abb. 4.2 A, B, C**). Die DSS-Behandlung von CONV-R Mäusen induzierte die Bildung von BMP4 und BMP7 und führte zu einer signifikant niedrigeren mRNA Expression von Ki-67 (**Abb. 4.2 D, E, F**).

4.3 Morbus Crohn hat Einfluss auf Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion

Um zu überprüfen, ob die in den Mausversuchen gezeigten Auswirkungen einer Colitis auf den Hh- und BMP-Signalweg auch auf den Menschen übertragen werden können, wurden Proben aus dem terminalen Ileum von Morbus Crohn Patienten und gesunden Kontrollen entnommen und untersucht.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA Expression des Hh-Liganden Shh sowie eine verminderte Expression von Ihh in Patienten mit Morbus Crohn (**Abb. 4.3 A, B**). Die mRNA Spiegel von Gli1 und Ki-67 wiesen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf (**Abb.4.3 C, F**). Bei den Crohn-Patienten zeigte sich ein Trend zu einer verminderten mRNA Expression von BMP4 und einer vermehrten Expression von BMP7 (**Abb. 4.3 D, E**).

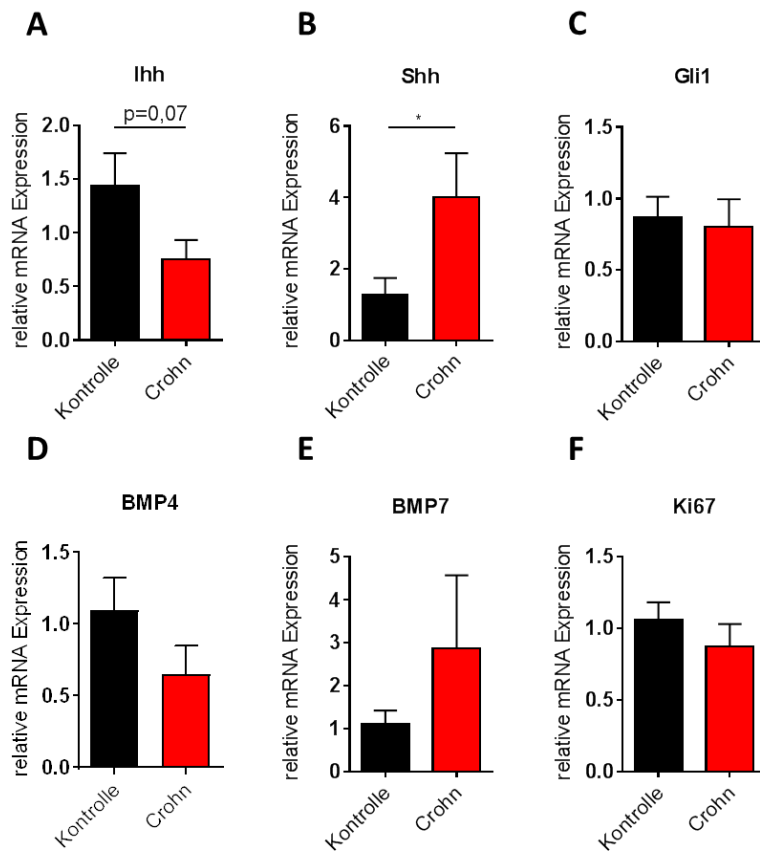


Abb. 4.3 Morbus Crohn hat Einfluss auf Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion

Relative mRNA Expression von **A:** Ihh, **B:** Shh, **C:** Gli1, **D:** BMP4, **E:** BMP7, **F:** Ki-67 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in menschlichen Proben (n=9). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. * p<0,05

4.4 Morbus Crohn und Mikrobiota beeinflussen Expression von Duox2 und DuoxA2

Die vorhergehenden Versuche zeigten bereits, dass eine DSS-Behandlung von Mäusen die mRNA Expression von Duox2 und DuoxA2 induziert. Um zu überprüfen, ob dies auch bei Patienten mit Morbus Crohn der Fall ist und Duox2 als Marker für eine intestinale Entzündung dienen kann, wurden Proben von Crohn-Patienten und Kontrollen auf die mRNA Expression der beiden Gene untersucht. Zum Nachweis eines eventuellen Einflusses der Mikrobiota auf die Expression von Duox2 und DuoxA2 wurden keimfreie Mäuse mit dem Zäkuminhalt einer CONV-R Maus kolonisiert und nach den Zeiträumen von 3 (CONV-D 3d), 6 (CONV-D 6d) und 9 Tagen (CONV-D 9d) untersucht.

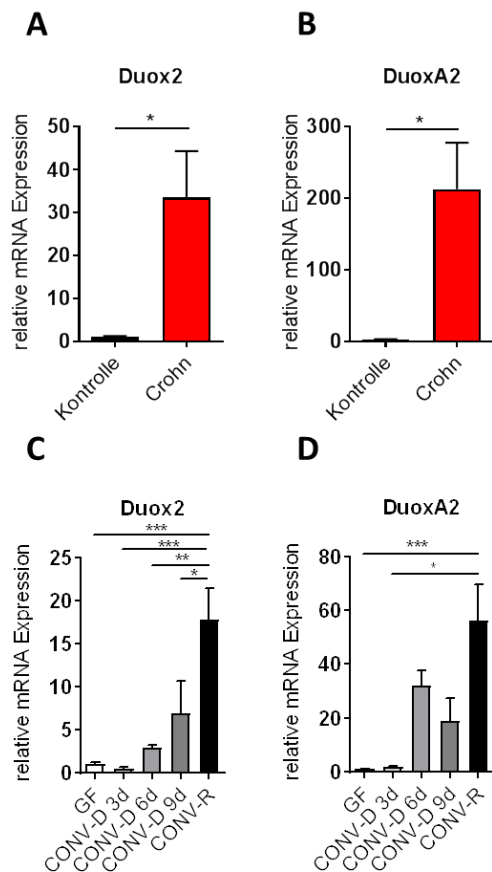


Abb. 4.4 Morbus Crohn und Mikrobiota beeinflussen Expression von Duox2 und DuoxA2

Relative mRNA Expression von **A:** Duox2, **B:** DuoxA2 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in menschlichen Proben (n=9). Relative mRNA Expression von **C:** Duox2, **D:** DuoxA2 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in GF, CONV- D 3 Tage, CONV- D 6 Tage, CONV- D 9 Tage und CONV- R (n=7, C57BL/6J Mäuse). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

In den Versuchen zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA Expression von Duox2 und DuoxA2 in Proben des terminalen Ileums von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Kontrollprobanden (**Abb. 4.4 A, B**).

CONV-R Mäuse wiesen deutlich erhöhte mRNA Spiegel von Duox2 und DuoxA2 verglichen mit keimfreien Mäusen auf (**Abb. 4.4 C, D**). Im Verlauf der Kolonisierung zeigte sich ein deutlicher Anstieg der mRNA Expression von Duox2 über 3 bis 9 Tage, mit der höchsten Expression in CONV-R Mäusen (**Abb. 4.4 C**). Die mRNA Spiegel von DuoxA2 nahmen nach 6 Tagen zunächst zu, fielen nach 9 Tagen wieder leicht ab und wiesen die höchste Expression in CONV-R Mäusen auf (**Abb. 4.4 D**).

4.5 Duox2-defiziente Mäuse zeigen veränderte Expression von Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Zielgenen

Da sich in den vorhergehenden Versuchen eine deutlich veränderte Expression von Duox2 in DSS-behandelten Mäusen und auch in an Morbus Crohn erkrankten Patienten zeigte, wurden nun Duox2-defiziente Mäuse auf die mRNA Expression von Zielgenen des Hh- und BMP-Signaltransduktionsweges untersucht, um einen eventuellen Einfluss des Rezeptors auf diese zu zeigen.

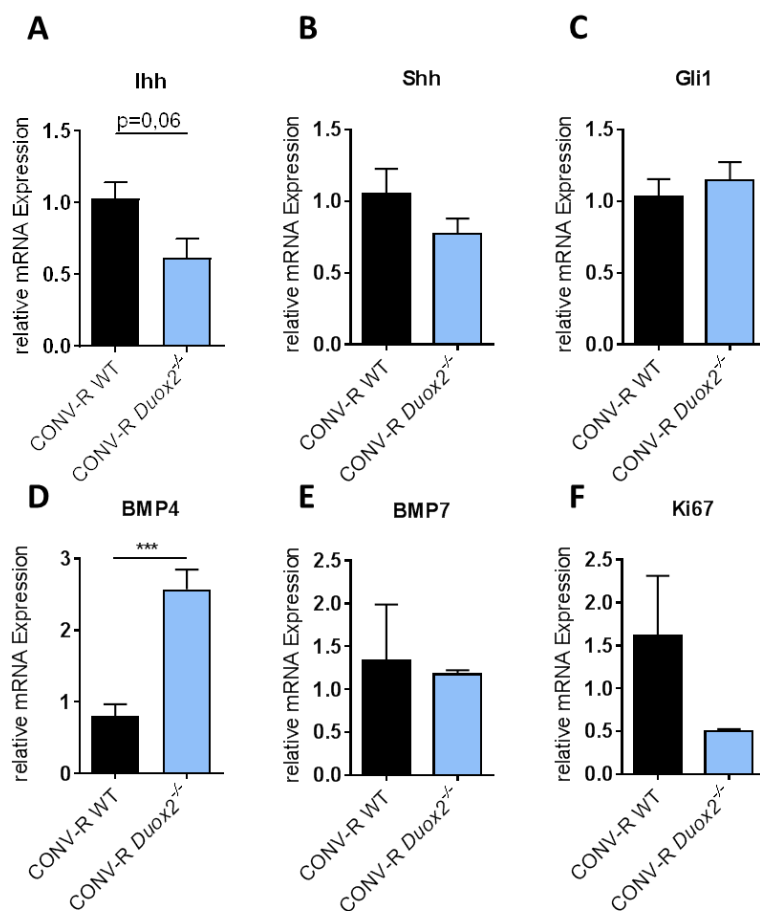


Abb. 4.5 Duox2-defiziente Mäuse zeigen veränderte Expression von Ihh und BMP4

Relative mRNA Expression von **A:** Ihh, **B:** Shh, **C:** Gli1, **D:** BMP4, **E:** BMP7, **F:** Ki-67 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in CONV-R WT und CONV-R *Duox2*^{-/-} Mäusen (n=7, C57BL/6J und *Duox2*^{thyd/J} Mäuse). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. *** p<0,005

Duox2-defiziente Mäuse wiesen eine deutlich verminderte mRNA Expression von Ihh auf. Bei der Expression von Shh zeigte sich ein Trend zu einer Herunterregulation in Duox2-

defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen (**Abb. 4.5 A, B**). Die mRNA Spiegel von Gli1 und BMP7 wiesen keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf, wohingegen BMP4 in Duox2-defizienten Mäusen signifikant hochreguliert war (**Abb. 4.5 C, D, E**). Duox2-defiziente Mäuse zeigten zudem eine verminderte mRNA Expression von Ki-67 (**Abb. 4.5 F**).

4.6 Duox2-defiziente Mäuse zeigen im DSS-Modell veränderte Expressionen in den untersuchten Zielgenen von Hedgehog- und Bone Morphogenetic Protein-Signaltransduktion

Zur Untersuchung des Einflusses von Duox2 auf die Entstehung einer Entzündung und die Beeinflussung von Zielgenen des Hh- und BMP-Signalweges wurden CONV-R Wildtyp- und CONV-R *Duox2*^{-/-} Mäuse über 5 Tage lang mit 3,5 % DSS, welches über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt und anschließend die Gewebe entnommen und untersucht.

Die DSS-Behandlung führte zu einer Herunterregulation der mRNA Spiegel der Hh-Liganden Ihh und Shh und des Zielgens Gli1 in Duox2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (**Abb. 4.6 A, B, C**). Auch die Bone Morphogenetic Proteine BMP4 und BMP7 zeigten eine verminderte Expression in DSS-behandelten Duox2-defizienten Mäusen (**Abb. 4.6 D, E**). Des Weiteren wurde eine signifikant verminderte Expression von Ki-67 in CONV-R *Duox2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu CONV-R Wildtypmäusen nach DSS-Behandlung nachgewiesen (**Abb. 4.6 F**).

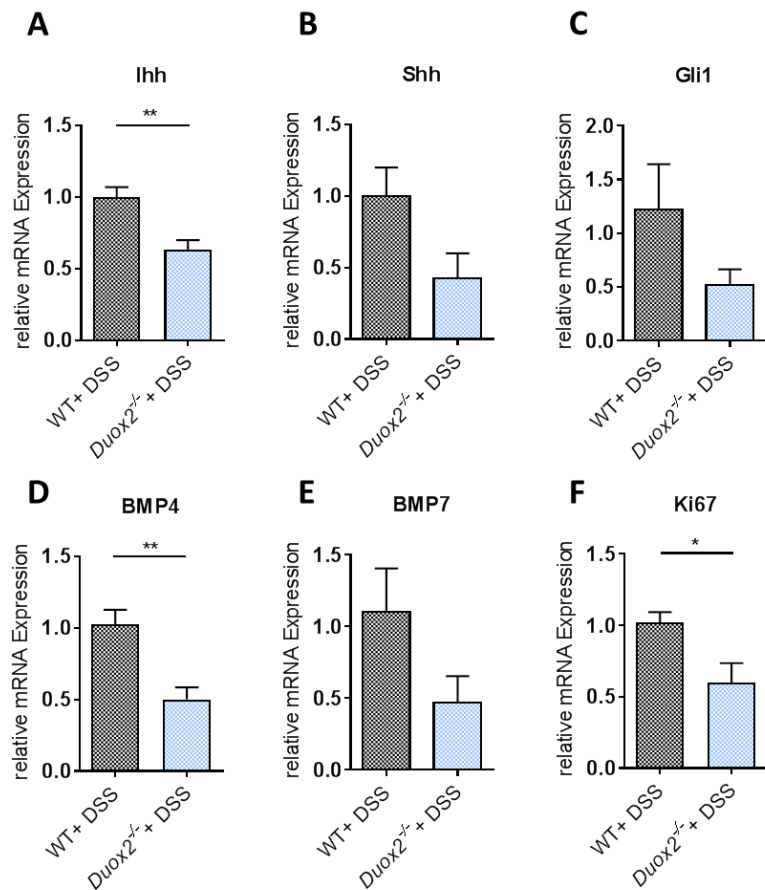


Abb. 4.6 Duox2-defiziente Mäuse zeigen im DSS-Modell eine verminderte Expression von Ihh und BMP4 sowie eine Verminderung in der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67

Relative mRNA Expression von **A:** Ihh, **B:** Shh, **C:** Gli1, **D:** BMP4, **E:** BMP7, **F:** Ki-67 im Verhältnis zum ribosomalen Protein L32 in CONV-R WT+ DSS und CONV-R Duox2^{-/-} + DSS Mäusen (n=7, C57BL/6J und Duox2^{thyl/J} Mäuse). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. * p<0,05, ** p<0,01

5. Diskussion

5.1 Mikrobiom und Duox2-Regulation im Darmepithel

Bei einer Infektion des Darms wirkt DUOX als erster Abwehrmechanismus gegen pathogene Erreger durch die Produktion von ROS. Die Regulation von Duox und die beteiligten Signalwege sind allerdings noch weitestgehend unbekannt. Untersuchungen an *Drosophila* zeigen, dass die enzymatische Aktivität von DUOX über Phospholipase C- β (PLC β) abhängige Ca²⁺-Mobilisation kontrolliert wird. Die Duox-Genexpression hingegen wird hauptsächlich über den MEKK1-p38 MAPK Weg kontrolliert (11, 90-92). Ein PLC β -Knockout führt zur DUOX-Überexpression, was zeigt, dass dieser Signalweg für die negative Regulation der enzymatischen Aktivität verantwortlich ist und somit vor übermäßigem oxidativem Stress und daraus resultierender chronischer Darmzellschädigung schützt. Eine Hemmung des MEKK1-p38 MAPK Weg führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen, was die wichtige Rolle von DUOX in der mukosalen Abwehr pathogener Erreger unterstreicht (91).

Der Darm wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterien besiedelt, doch interessanterweise scheinen nur pathogene Erreger, nicht aber Symbionten die immunogene Abwehr zu aktivieren. Einen dafür verantwortlichen Mechanismus fanden Lee KA et al. 2013: Pathogene Bakterien produzieren im Gegensatz zu Symbionten Uracil, welches über den Hh-Signalweg zur DUOX-Enzymaktivierung führt. Diese kontrollierte Immunantwort ermöglicht die effiziente Eliminierung pathogener Erreger während einer Infektion des Darms. Des Weiteren scheint DUOX an der Regulation der intestinalen Stammzellerneuerung während einer Entzündung beteiligt zu sein (93).

Zu den im Darm exprimierten NADPH-Oxidasen gehören NOX1 und 4 sowie DUOX2. Pircalabioru G et al. zeigten 2016, dass Nox1 an der Regulation von Duox2 beteiligt ist. Eine Inaktivierung von Nox1 reduziert die infektionsbedingte Hochregulation von Duox2. Mutationen in Nox1 und Duox2 führen zu einer verminderten Produktion von ROS und begünstigen die Entstehung von Morbus Crohn (94). Yang HAT et al. zeigten 2016 an der Kuruma Garnele, dass eine orale Infektion mit pathogenen Bakterien MjDuox2 (Duox2 der Kuruma Garnele) induziert und zu höheren ROS Level führt. Ein MjDuox2-Knockout

reduzierte die ROS-Level, erhöhte die Anzahl pathologischer Bakterien und führte in der Folge zu einer verringerten Lebenserwartung der untersuchten Tiere (95).

Bei Mäusen zeigt sich eine Induktion von Duox2 über die Mikrobiota, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Sowohl Duox2 wie auch DuoxA2 zeigen deutlich höhere mRNA Spiegel in CONV-R Mäusen verglichen zu keimfreien Mäusen (**Abb. 4.4 C, D**). Im Verlauf der Kolonisierung zeigte sich ein deutlicher Anstieg der mRNA Expression von Duox2 über 3 bis 9 Tage, mit der höchsten Expression in CONV-R Mäusen (**Abb. 4.4 C**). Die mRNA Spiegel von DuoxA2 nahmen nach 6 Tagen zunächst zu, fielen nach 9 Tagen wieder leicht ab und wiesen die höchste Expression in CONV-R Mäusen auf (**Abb. 4.4 C**). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Grasberger H et al. und Sommer F et al. 2015. Sommer F et al. fanden eine starke Induktion von Duox2 in Anwesenheit der normalen Mikrobiota, wohingegen die Duox2-Expression bei Kolonisation von keimfreien Mäusen mit verschiedenen Kommensalen keine Veränderung zeigte. Dabei wurden sowohl Kolonisationen mit einzelnen Bakterienstämmen wie E.coli getestet, wie auch eine Mischung aus zehn verschiedenen Kommensalen. Bei keinem der Versuche zeigte sich eine Induktion von Duox2. In Anwesenheit der normalen Mikrobiota zeigte sich eine schnellere und stärkere Induktion von Duox2 im Kolon als im Ileum. Dies könnte sich durch die Regulation von Duox2 über verschieden Signalwege in den beiden Darmabschnitten erklären. Im Ileum erfolgt die Regulation über TRIF und NF- κ B p50/p65 Signale, wohingegen im Kolon der MyD88 und p38-Signalweg involviert sind (11). Grasberger H et al. fanden wiederum, dass bei einer Kolonisation von keimfreien Mäusen mit normaler Mikrobiota die Duox2 Expression unverändert blieb, wohingegen bei einer Kolonisation mit der Mikrobiota von Patienten mit CED die Duox2-Expression signifikant induziert wurde. Somit könnten erhöhte Duox2 Spiegel als Marker für eine gestörte Schleimhauthomöostase in der frühen Pathogenese von CED dienen (8).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Duox2-Expression durch Kolonisation mit Mikrobiota verstärkt wird. Abhängig davon, ob es sich um Mensch, Maus oder Fliege handelt, scheinen dabei verschiedene Signalwege eine Rolle zu spielen. Ein spezifischer Mikroorganismus, der Duox2 induziert, ist nicht bekannt und scheint donorspezifisch zu sein.

Viele Studien zeigen, dass eine gestörte Darmhomöostase und damit eine Dysbiose der intestinalen Mikrobiota Duox2 über bisher ungeklärte Signalwege aktiviert (8). Einerseits

scheint die Mikrobiota die Duox2-Expression zu regulieren, andererseits wirkt sich Duox2 aber auch auf die Mikrobiomzusammensetzung aus. Qualität und Quantität der intestinalen Bakterien variieren in Abhängigkeit von physiologischen Veränderungen. Der Mechanismus, wie der Organismus so dynamische Wechsel vollzieht und trotzdem die Homöostase aufrechterhält, bleibt bisher unbekannt. Xiao X et al. zeigten 2017, dass das Darmmembran assoziierte Protein Mesh eine wichtige Rolle in der Duox-Regulation im Darm von *Drosophila* spielt (96). Mesh ist im Insektendarm an der Bildung von Septumverbindungen beteiligt und ist damit ein Teil der intestinalen Barrierefunktion (97). Das Protein Mesh enthält sogenannte CCPs (Complement Control Protein), welche essentiell für Komplement-vermittelte Immunfunktionen ist und so eine wichtige Rolle in der Abwehr mikrobieller Infektionen spielt. Xiao X et al. zeigten, dass ein Mesh-Knockout zu einer verminderten Duox-Expression und einem Anstieg der Bakterien im Insektendarm führt (96). DUOX trägt zu den Grundvoraussetzungen für eine normale Darmphysiologie bei und ermöglicht eine normale Ernährung, Verdauung, Entwicklung und Differenzierung.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit die bereits bekannte Tatsache, dass Duox mikrobiomabhängig reguliert wird. Es existieren bereits viele Ansätze, die zeigen, welche Signalwege in der Duox-Regulation involviert sind. Dennoch bleiben Fragen offen, die in Zukunft noch näher untersucht werden müssen. Über welche mikrobiomabhängigen Signalwege wird Duox beim Menschen reguliert? Welche Bakterienspezies genau induziert Duox und warum?

5.2 Akute intestinale Mukositis und Duox2-Regulation im Darmepithel

Die genaue Pathogenese von CED ist bisher noch unbekannt. Es handelt sich um eine polygenetische Erkrankung mit steigender Inzidenz, bei der eine genetische Prädisposition zusammen mit mikrobiellen Veränderungen und Umweltfaktoren zu einer chronischen Aktivierung des mukosalen Immunsystems führen. Nur wenige Patienten erreichen unter Therapie eine dauerhafte Remission, was an der Heterogenität der pathogenen

Mechanismen liegen könnte, die bisher nicht klassifiziert wurden. Neue Ideen für zukünftige Therapien liegen in der Analyse der Genexpression und mikrobiellen Markern bei Patienten, um eine schnelle Diagnose und angepasste Therapie zu finden (1, 2).

Kürzlich gefundene Single Gene Defekte, die mit CED assoziiert sind, sind solche der NADPH-Oxidase Familie. So finden sich Nox2-Mutationen in Phagozyten und Nox1/Duox2-Mutationen in intestinalen Epithelzellen von Patienten mit frühkindlichen CED (VEOIBD, very early onset IBD,). Rund 1% der Patienten mit CED leiden an VEOIBD und erkranken vor dem 6. Lebensjahr. Diese Patienten weisen eine besonders hohe Rate an krankheitsursächlichen Mutationen auf (1). Bei 30% der Patienten mit Morbus Crohn findet sich eine Mutation im NOD2 Gen. NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der Zellwandbestandteile von Bakterien erkennt und in Monozyten, Makrophagen und Paneth-Zellen exprimiert wird. NOD2-Risikoallele sind mit einem jüngeren Alter bei Krankheitsbeginn und einem früheren OP-Risiko assoziiert. Eine Aktivierung des NOD2-Rezeptors führt in Folge einer Immunantwort zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen. Bei CED sind sowohl Gain-of-Function wie auch Loss-of-Function-Mutationen des NOD2-Rezeptors bekannt (9, 20).

Wie bereits oben erwähnt, zeigen viele Studien eine Dysbiose als eine Ursache von CED. Diese Dysbiose scheint nicht Ursache der Entzündung zu sein, sondern der Entzündung voranzugehen (1, 2). Das aktuelle Pathogenverständnis von CED beruht auf einer veränderten luminalen bakteriellen Komposition mit epithelialer Dysfunktion. Dies wiederum führt zu mehr epithelialer Translokation von Bakterien und in der Folge zu einer dauerhaften Immunstimulation mit chronischer Entzündung. Grasberger H et al. fanden 2018 eine höhere Translokation von Bakterien in Duox-defizienten Mäusen, was die These unterstützt, dass Duox die Immunhomöostase aufrechterhält (98). Ob genetische Duox2-Varianten allerdings das CED Risiko in der Bevölkerung erhöhen, ist unbekannt und müsste genauer untersucht werden.

DChu FF et al., sehen eine vermehrte ROS Produktion als essentiellen Faktor in der Pathogenese von CED. NOX1 und DUOX2 als NADPH-Oxidasen des Gastrointestinaltraktes werden beide durch Bakterien induziert und sind vermehrt bei CED zu finden (99). NOX1 wird vor allem in Epithelzellen von Kolon und Rektum exprimiert, wohingegen DUOX2 im gesamten Darm aber am stärksten im Ileum exprimiert wird (1). Die Genexpression scheint

kompensatorisch zu sein. Wenn eine der beiden NADPH-Oxidasen ausfällt, wird mehr von der anderen produziert. Sowohl NOX1 wie auch DUOX2 könnten demnach als zukünftige Targets für Therapien fungieren (99). ROS wurden lange als schädlich und ursächlich für die Aufrechterhaltung der Entzündung in CED gesehen. Neue Zell- und Tierstudien zeigen hingegen eine protektive Rolle von ROS produzierenden Enzymen in der intestinalen Homöostase (1). Im Gegensatz zu DChu FF et al., gibt es andere Studien, die einen Mangel an ROS bei Patienten mit CED fanden. Demnach sind inaktivierte NOX1 und DUOX2 Varianten mit VEOIBD assoziiert (1). Dies zeigt noch einmal, dass die bisherige Annahme, NADPH-Oxidasen hätten lediglich einen zellschädigenden Effekt, in Frage gestellt und die protektive Rolle von ROS produzierenden Enzymen näher untersucht werden sollte. Folglich könnte eine kontrollierte Stimulation der physiologischen ROS Produktion für bestimmte Patienten mit nachgewiesenen Mutationen vorteilhaft sein und sollte Thema zukünftiger Studien sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sehr viele Gene im Verdacht stehen, an der Pathogenese von CED beteiligt zu sein. Die meisten Studien zeigen eine Beteiligung von NADPH-Oxidasen, zu denen auch das in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte DUOX2 zählt. Zu den am stärksten hochregulierten Genen in Patienten mit CED gehören Duox2 und DuoxA2, wohingegen das antiinflammatorische Lipoprotein APOA1 eines der am stärksten runterregulierten Gene darstellt und als Target für zukünftige Therapien dienen könnte (2). Studien wiesen nach, dass Duox2 und DuoxA2 bei viralen, bakteriellen und entzündlichen Erkrankungen hochreguliert werden (94). Grasberger H et al. zeigten 2015, dass Duox2 bei Patienten mit CED bereits vor der Entzündung induziert wird. Ob Duox allerdings die eigentliche Entzündung auslöst oder erst als Sekundärantwort aktiviert wird, ist noch ungeklärt (8).

Um die Colitis im Mausmodell näher untersuchen zu können, eignet sich die Verwendung von DSS (Dextran-Natrium-Sulfat). Dieses bildet mit im Colon vorkommenden MCFAs (medium-chain-length fatty acids) Verbindungen in Form von Vesikeln. Die gebildeten Vesikel können mit den Membranen der Colonocyten verschmelzen und so eine Entzündung induzieren (100). In dieser Arbeit wurden CONV-R Mäuse und keimfreie Mäuse über 7 Tage mit 3,5 % DSS, das über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt. Duox2 und dessen Ligand, der Aktivator DuoxA2, zeigten eine signifikante Hochregulation in DSS-behandelten CONV-R Mäusen im Vergleich zu unbehandelten CONV-R Mäusen (**Abb. 4.1. B, D**). Eine

Induktion von Duox2 und DuoxA2 bei CONV-R Mäusen durch eine Behandlung mit DSS ist in der Literatur bereits beschrieben. Sommer F und Bäckhed F. zeigten, dass Duox2 bei DSS-behandelten Mäusen bereits nach einem Tag induziert wird und während der gesamten Infektion hochreguliert bleibt. Da diese Induktion bei Mäusen vor der entzündlich bedingten Gewebeerstörung auftrat, folgerten sie, dass Duox2 die Entzündung auslösen könnte und nicht erst im Verlauf aktiviert wird. Die Tatsache, dass Duox2-defiziente Mäuse eine verringerte inflammatorische Antwort und eine veränderte ileale mukosale Genexpression aufweisen, die derer von Patienten mit CED im nicht entzündlichen Ileum gleicht, scheinen diese These zu bestärken (8). Dennoch müssen in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden, um den genauen Einfluss von Duox2 auf die Entstehung und Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündung zu klären. Tatsache ist, dass Duox-defiziente Mäuse eine höhere epitheliale intestinale Translokation von Bakterien aufweisen, eine stärkere Kolonisation mit Bakterien haben und zu einer erhöhten Infektanfälligkeit neigen (1, 10, 98). Alle diese Erkenntnisse zeigen die wichtige Rolle von Duox2 in der Aufrechterhaltung einer normalen mukosalen Immunhomöostase und die Dringlichkeit weiterer Untersuchungen, um die genaue Rolle in der Pathogenese von CED zu klären.

Um die in den Mausversuchen bestätigte Induktion von Duox2 und DuoxA2 bei Entzündung auf den Menschen zu übertragen, wurden Proben aus dem terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn und von Kontrollen auf die Expression der Zielgene untersucht. In den Versuchen zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA Expression von Duox2 und DuoxA2 in Proben des terminalen Ileums von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Kontrollprobanden (**Abb. 4.4 A, B**). Dies bestätigt die bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, dass Duox2 und DuoxA2 bei Patienten mit CED hochreguliert sind und sich das DSS-Modell der Maus in diesem Fall sehr gut auf den Menschen übertragen lässt (2, 8, 11). Neu, und noch nicht in der Literatur beschrieben, ist die Duox2-Expression nach DSS-Gabe bei keimfreien Mäusen. Die keimfreien Mäuse wiesen im Gegensatz zu den CONV-R Mäusen eine signifikant verminderte Expression von Duox2 sowie eine deutlich geringere mRNA Expression von DuoxA2 nach DSS-Behandlung auf (**Abb. 4.1 A, C**). Dies könnte daran liegen, dass die Duox-Expression Mikrobiota-abhängig reguliert ist. Folglich könnte es sein, dass die Gabe von DSS zunächst Veränderungen an der Mikrobiota hervorruft, die dann über die Induktion von Duox2 zu einer Entzündung führen. Wenn man davon ausgeht, dass Duox2 für die Entstehung der Entzündung verantwortlich ist, müsste bei den keimfreien DSS-

behandelten Mäusen auch die Entzündung weniger stark ausgeprägt sein, was durch weiterführende Versuche an Hand histologischer Auswertungen näher untersucht werden sollte.

Zusammenfassend bestätigen die Versuche dieser Arbeit zunächst die bekannte These, dass Duox2 und DuoxA2 bei Entzündung im Mausmodell, aber auch bei Patienten mit Morbus Crohn signifikant erhöht exprimiert werden. Neu ist, dass eine DSS-Gabe bei keimfreien Mäusen zu einer verminderten Expression von Duox2 und DuoxA2 zu führen scheint.

5.3 Die Verbindung zwischen epithelialer Duox2-Aktivität und Hedgehog- bzw. BMP-Expression im entzündeten Dünndarm

Die Tatsache, dass NADPH-Oxidasen ROS produzieren und damit der Abwehr von pathogenen Erregern dienen, ist schon länger bekannt. Die genauen Signalwege, über welche die Mikrobiota Duox induziert, waren sehr lange unbekannt. Um einen eventuellen Einfluss von Duox2 auf den Hh- und BMP-Signaltransduktionsweg zu untersuchen, wurden Duox2-defiziente Mäuse auf die mRNA Expression von Zielgenen des Hh- und BMP-Signaltransduktionsweges untersucht. Duox2-defiziente Mäuse wiesen eine deutlich verminderte Ihh mRNA Expression auf. Bei der Expression von Shh zeigte sich ein Trend zu einer Herunterregulation in Duox2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (**Abb. 4.5 A, B**), was zeigt, dass Duox2 die Expression epithelial exprimierter Hh-Liganden beeinflusst. In der Folge würde man ebenfalls eine Veränderung in der Expression des Hh Zielgens Gli1 sowie von BMPs erwarten. Die mRNA Spiegel von Gli1 und BMP7 wiesen allerdings keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf. Lediglich BMP4 war in Duox2-defizienten Mäusen signifikant hochreguliert (**Abb. 4.5 C, D, E**). Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss von Duox2 auf die Expression von Zielgenen des Hh und BMP-Signaltransduktionsweges. Man kann also schlussfolgern, dass über den Duox2-Rezeptor die Expression von Hh-Liganden beeinflusst werden könnte. Bisher ist über diesen Zusammenhang nur wenig bekannt. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass Duox2-defiziente Mäuse weniger ROS produzieren und damit weniger Zellschaden verursacht wird. Somit

wäre weniger Zellteilung und Differenzierung nötig, was auch zum erhöhten mRNA Spiegel von BMP4 passen würde.

Was in der Literatur bereits beschrieben ist, ist der Einfluss von Hh- und BMP-Signaltransduktion auf die Expression von Duox. Lee KA et al. konnten zeigen, dass bakterielles Uracil, welches nur von Pathogenen, nicht aber von Symbionten synthetisiert wird, über den Hh-Signalweg im Darmepithel Duox induziert und in der Folge zur vermehrten Synthese von ROS führt (**Abb. 5.3**). Der Hh-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Entwicklung und ist essentiell für die intestinale Homöostase. Des Weiteren reguliert er den epithelialen Zellumsatz und ist assoziiert mit Gewebereparatur und Entzündung (12). Lee KA et al. konnten zeigen, dass die Induktion des Hh-Signalweges über bakterielles Uracil zur Hochregulation von Ca²⁺-abhängigem Zelladhäsionsmolekül Cadherin 99C (Cad99C) führt, welches wiederum zusammen mit Phospholipase C β (PLC β) und Proteinkinase C (PKC) die Formation von Signalendosomen induziert. Diese ermöglichen die für die enzymatische Aktivität von Duox nötige Ca²⁺ Mobilisation. In Folge werden vermehrt ROS produziert und dadurch die Uracil-produzierenden Pathogene abgewehrt. Für die Ca²⁺-Amplifikation und damit die volle Duox-Aktivität ist wiederum die Calmodulin-abhängige Kinase II (CAMKII) nötig. Da der Hh-Signalweg essentiell für die Induktion von Duox ist, sind Mäuse mit beeinträchtigtem Hh-Signalweg anfälliger für Infektionen (92, 101).

Diese Arbeit zeigt damit erstmals, dass eine Duox2-Defizienz zu einer verminderten Expression von Ihh und einer vermehrten Expression von BMP4 führt, welches zentrale Regulatoren in der epithelialen Linie im Darmgewebe sind.

Um weiterhin den Einfluss von Duox2 auf den Hh- und BMP-Signaltransduktionsweg bei Entzündung zu untersuchen, wurden CONV-R Wildtyp- und CONV-R *Duox2*^{-/-} Mäuse über 5 Tage mit 3,5% DSS, welches über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt und untersucht. Auch im Entzündungsfall zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Duox2-Rezeptors auf den Hh- und BMP-Signaltransduktionsweg. Ähnlich wie im nicht entzündeten Modell, zeigte sich eine Herunterregulation der intestinalen mRNA Spiegel des Hh-Liganden Ihh in Duox2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (**Abb. 4.6 A**). Zusätzlich waren Shh und das Zielgen Gli1 in DSS-behandelten Duox2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen vermindert exprimiert (**Abb. 4.6 B, C**). Auch die Bone Morphogenetic Proteine BMP4 und

BMP7 zeigte eine Herunterregulation in DSS-behandelten Duox2-defizienten Mäusen (**Abb. 4.6 D, E**).

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein Duox2-Knockout bei Entzündung zu einer Hemmung des Hh- und BMP-Signaltransduktionsweges führt, was in Folge eine stärkere Epithelzellproliferation und Differenzierung bedeutet. Dies könnte den bei Entzündung entstehenden Zellschaden ausgleichen und zu einer Reduktion der eigentlichen Entzündung führen. Auch bei Patienten mit CED findet man genetische Varianten im Hh-Signalweg und eine Herunterregulation der betroffenen Gene (12-14, 16), was bedeutet, dass Duox2-defiziente Mäuse die gleichen Expressionslevel von Hh-Proteinen aufweisen wie Patienten mit CED. Dies wiederum zeigt erneut die wichtige Rolle von Duox2 bei CED und den Bedarf an weiteren Studien, um die Möglichkeit von Duox2 als therapeutisches Target weiter zu untersuchen.

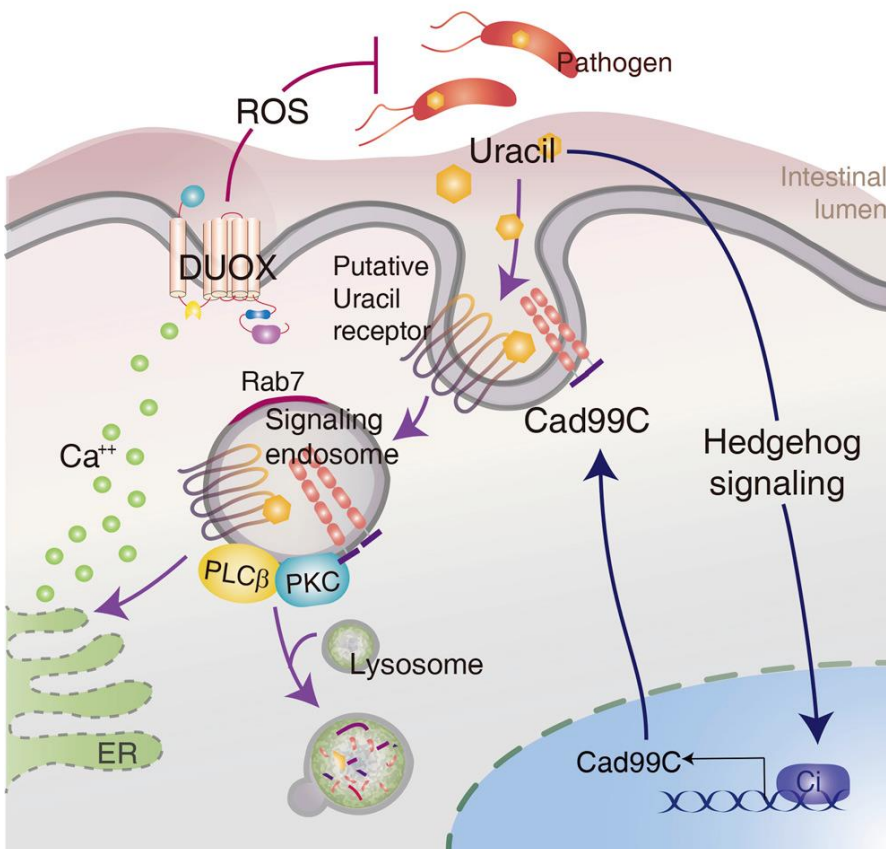


Abb. 5.3 Verbindung zwischen Hedgehog-Signalweg und Duox-Aktivität (Abbildung aus Lee KA, Kim B, Bhin J, Kim DH, You H, Kim EK, et al. Bacterial uracil modulates Drosophila DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes. Cell host & microbe. 2015;17(2):191-204.)

5.4 Veränderung von Hedgehog- und BMP-Signalweg im terminalen Ileum von Morbus Crohn Patienten

Die bereits oben beschriebenen Versuche zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen epithelialer Duox2-Aktivität und dem Hh-, bzw. BMP-Signalweg. Da Duox2 wiederum mit CED assoziiert ist, wurden als nächstes die Expression von Hh-Liganden und BMPs bei Entzündung im Mausmodell und bei Patienten mit Morbus Crohn untersucht. Hierzu existieren in der Literatur diverse, teils kontroverse Daten. Einige Studien zeigten eine Herunterregulation (12-14, 16), andere eine Hochregulation (17-20) des Hh-Signalweges bei Entzündung. Um diesen wichtigen Zusammenhang nochmals zu untersuchen, wurden CONV-R Mäuse über 7 Tage mit 3,5% DSS, das über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt. In den Versuchen zeigte sich eine signifikante Herunterregulation des Hh-Liganden Ihh sowie dessen Zielgens Gli1 in DSS-behandelten CONV-R Mäusen, wohingegen die Shh Expression unverändert zwischen den Gruppen war (**Abb. 4.2 A, B, C**). Die DSS-Behandlung von CONV-R Mäusen induzierte die Bildung von BMP4 und BMP7 (**Abb. 4.2 D, E**). Somit scheint zwar der Hh-Signalweg nach DSS-Gabe unterdrückt, der BMP-Signalweg aber induziert zu sein.

Die Ergebnisse unterstützen zum Teil die bereits in der Literatur bekannten Daten. Lee JJ et al. konnten 2016 ebenfalls eine Unterdrückung des Hh-Signalweges bei Mäusen nach DSS-Gabe nachweisen und eine Inhibition des Hh-Signalweges wiederum verschlimmerte die Kolitis in Mäusen. Folglich könnte eine genetische Verstärkung der Hh-Antwort die Kolitis verbessern und sogar die Entwicklung von Kolitis-induzierten Adenokarzinomen verhindern. Bei genetischen Studien zeigten sich loss of function-Mutationen von IL-10 und dem IL-10 Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt des Hh-Signalweges über das antiinflammatorische IL-10 wirkt, welches den entzündlich bedingten Zellschaden unterdrücken kann. Ein IL-10-Knockout führt zu spontaner Kolitis und zu einer schwereren Kolitis nach DSS-Gabe. Somit könnte eine pharmakologische Manipulation am IL-10 Rezeptor ein potenzielles Mittel zur Behandlung einer Kolitis darstellen (16). Van Dop WA et al. konnten zeigen, dass eine Defizienz von Ihh in Mäusen zu den typischen Charakteristika einer Wundheilungsantwort führt. Es kam zum Verlust von glatten Muskelzellen sowie zur Rekrutierung von Makrophagen und Fibroblasten in die Lamina propria. Ein anhaltender Verlust führte zu einer progressiven Entzündung, mukosalen Zellschäden und intestinaler

Fibrose (14). Dies zeigt nochmals die protektive Wirkung des Hh-Signalweges und die wichtige Rolle von Ihh bei der Entstehung einer chronischen Entzündung bei CED. Lees CW et al. wiederum konnten bei Patienten mit CED Keimbahnmutationen im Gli-1 Protein mit reduzierter Funktion nachweisen und es zeigten sich eine verminderte Expression von Gli-1 in der entzündeten Darmmukosa von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, was die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse unterstützt. Eine reduzierte Gli-1 Funktion prädisponiert zu einer höheren Antwort auf inflammatorische Stimuli. So reagieren genetisch veränderte Mäuse mit auf die Hälfte reduzierter Gli-1-Synthese mit einer schwereren und schnelleren Entzündung als Wildtyp-Mäuse und man findet eine stärkere Expression proinflammatorischer Zytokine. Eine reduzierte Gli-1 Funktion könnte somit ein Auslöser für die Entwicklung von CED sein und Medikamente, die den Hh-Signalweg modulieren, könnten in der Therapie eingesetzt werden (13). Buongusto F et al. zeigten 2017 ebenfalls eine starke Reduktion von Hh-Proteinen bei Entzündung, sowie verminderte Spiegel von Gli-1 in Biopsiematerial von Patienten mit Morbus Crohn. Eine Stimulation des Hh-Signalweges führte zur Reduktion proinflammatorischer Zytokine, eine Blockade wiederum erhöhte die Expression von TNF α und IL-17 und führte zu einer intestinalen Entzündung. Außerdem zeigten die mRNA-Spiegel von Gli-1 eine negative Korrelation mit der Caspase-3-Aktivität. Eine Blockade des Hh-Signalweges führt somit zu einer erhöhten Apoptoserate, während eine Aktivierung die epitheliale Zelldifferenzierung erhöht. Des Weiteren fanden Buongusto F et al. eine erhöhte Immigration von Monozyten und eine verminderte Migration von Fibroblasten bei einer Blockade des Hedgehog-Signalweges. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Hedgehog-Signalweg proinflammatorische Zytokine hemmt und Einfluss auf den Entzündungsphänotyp hat. Zudem schützt er vor apoptotischem Zelltod.

Diese Arbeit unterstützt die bereits bekannten Ergebnisse, dass der Hh-Signalweg bei Entzündung im Mausmodell vermindert exprimiert ist. Eine Herunterregulation des Hh-Signalweges bei CED fördert die Aufrechterhaltung der Entzündung. Folglich könnte sich der Hedgehog-Signalweg als neues therapeutisches Target bei CED eignen (12).

Im Gegensatz zu Ihh, welches sich in vielen Studien bei Entzündung herunterreguliert zeigt, scheint Shh hochreguliert zu sein. In dieser Arbeit zeigte sich kein Unterschied in der Expression von Shh zwischen CONV-R Mäusen und DSS-behandelten CONV-R Mäusen. In der

Literatur hingegen finden sich Studien, bei denen Shh bei Entzündung hochreguliert ist (17-19). Eine erhöhte Expression von Shh wiederum stimuliert die Proliferation von Stammzellen, um den Ersatz von durch die Entzündung zerstörtem Gewebe zu sichern. Gleichzeitig erhöht sich so das Risiko für die Entstehung von gastrointestinalen Tumoren durch eine abnorme Stammzellhyperplasie und neoplastische Transformation (18, 19). Dies erklärt das erhöhte Risiko von Patienten mit CED an gastrointestinalen Tumoren zu erkranken. Ghorpade DS et al. konnten 2013 einen interessanten Zusammenhang zwischen dem NOD2-Rezeptor und der Induktion von Shh zeigen. Bakterielle Zellwandbestandteile aktivieren den intrazellulären NOD2-Rezeptor und führen in der Folge zu einer verstärkten Expression von Shh über NO, das von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) synthetisiert wird. Shh wiederum induziert die Synthese verschiedener Zytokine als Entzündungsantwort. Mäuse mit defizienter iNOS zeigen nach DSS-Gabe keine inflammatorische Antwort. Folglich könnten pharmakologische Inhibitoren von iNOS zukünftig als Ansatz zur effizienten Reduktion der Entzündung bei CED dienen (20).

BMP4 und BMP7 zeigten sich in dieser Arbeit nach DSS-Gabe hochreguliert. Auch hier existieren gegensätzliche Ergebnisse in der Literatur. BMPs, die zur TGF- β Superfamilie gehören, spielen eine wichtige Rolle in allen Organsystemen. Sie sind essentiell für die Embryogenese, Entwicklung, sowie Aufrechterhaltung der adulten Gewebemöostase. Viele Prozesse, wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose sind von der BMP-Signalwirkung abhängig. Bisher sind mehr als 15 verschiedene BMPs bekannt, aber nur BMP2, 4, 7 werden im Gastrointestinaltrakt exprimiert (22). Einige Studien zeigen eine Hochregulation von Shh bei Entzündung, was wiederum zur Induktion von BMP4 führt. So soll der epitheliale Zellschaden bei Entzündung durch Stammzellproliferation ausgeglichen werden. Eine Antagonisierung von BMP4 wiederum verringert die Zahl der Stammzellen (17). Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Induktion von BMP4 und eine deutliche Hochregulation von BMP7. Andere Studien wiederum zeigten eine reduzierte BMP4-Expression bei Mäusen nach DSS-Gabe. Dies führte zu einem verstärkten Zellschaden und Entzündung. Es konnte gezeigt werden, dass BMP4 und BMP7 die Schwere einer Entzündung abschwächen und die Heilung beschleunigen. Zytokine, wie TNF α inhibieren wiederum die Expression von BMP4. Eine Erklärung für die schützende Wirkung von BMP könnte sein, dass diese die Integrität des Darmepithels aufrechterhalten. Demnach führt ein

Verlust zu mehr Zellschaden und Entzündung (12, 21). Somit könnten auch die BMPs als zukünftige Targets in der Therapie von CED dienen.

Um die Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen zu übertragen, wurden Proben aus dem terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn entnommen und auf die Expression von Hh- und BMPs untersucht. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA Expression des Hh Liganden Shh sowie eine verminderte Expression von Ihh in Patienten mit Morbus Crohn (**Abb. 4.3 A, B**). Die mRNA Spiegel von Gli1 wiesen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf (**Abb. 4.3 C**). Bei den Crohn-Patienten zeigte sich ein Trend zu einer verminderten mRNA Expression von BMP4 und einer vermehrten Expression von BMP7 (**Abb. 4.3 D, E**). Die Ergebnisse ähneln zum Teil denen im DSS-Mausmodell. Auch hier zeigte sich die Expression von Ihh bei Entzündung vermindert. Dies unterstützt die bereits bekannten Daten von Buongusto F et al., die ebenfalls eine starke Reduktion von Hh-Proteinen bei Patienten mit Morbus Crohn fanden (12). Andere Studien zeigen auch in Patienten mit Colitis Ulcerosa eine Herunterregulation von Ihh. Im Gegensatz zu den Versuchen im Mausmodell zeigten die Patienten mit Morbus Crohn eine erhöhte Expression von Shh. Dies wurde auch bereits in der Literatur beschrieben und stimmt mit den bereits gefundenen Ergebnissen überein (17, 18). Im Mausmodell zeigte sich die Expression von Gli1 nach DSS-Gabe vermindert, wohingegen sich bei den Patienten mit Morbus Crohn keine Veränderung zwischen den Gruppen zeigte. Dies widerspricht den Angaben in der Literatur, bei denen eine reduzierte Gli1 Funktion bei Patienten mit CED gefunden wurde (12-14). Auch die Expression der BMPs unterschied sich deutlich zwischen Mausmodell und Patienten mit Morbus Crohn. Im Mausmodell zeigten sich BMP4 und BMP7 hochreguliert. In dieser Arbeit zeigte sich bei Patienten mit Morbus Crohn ein Trend zu einer verminderten mRNA Expression von BMP4 und einer vermehrten Expression von BMP7. Die verminderte Expression von BMP4 bei CED wurde bereits beschrieben. Die erhöhte Expression von BMP7 widerspricht den Daten in der Literatur (12).

Insgesamt zeigt sich bei vielen Targets kein signifikantes Ergebnis oder die Ergebnisse widersprechen den Angaben in der Literatur. Als Ursache für die in der Literatur existierenden und zum Teil widersprüchlichen Angaben könnten unterschiedliche Antikörper, die Patientenselektion, bereits durchgeführte pharmakologische Therapien bei den Patienten und die Entnahme der Gewebe verantwortlich sein (12). Des Weiteren muss

man beachten, dass in dieser Arbeit die Patientenauswahl sehr klein war (hier $n=9$). Außerdem unterliegen die menschlichen Proben einer Vielzahl von Einflüssen, die nicht kontrolliert werden können. Dazu gehören Umwelteinflüsse wie Ernährung, aber auch die Einnahme von Medikamenten sowie das Alter der Patienten. Diese Einflüsse könnten zu Veränderungen der Mikrobiota und auch der Darmschleimhaut führen, was wiederum Einfluss auf das Immunsystem und die Expression von Hh- und BMPs haben könnte. Aufgrund der wenigen Patienten, die für diese Arbeit eingeschlossen wurden, konnte auch keine weitere Differenzierung und Einteilung der Patienten in verschiedene Schweregrade der Entzündung vorgenommen werden. Es wurden alle Patienten mit einer zumindest leichtgradig nachgewiesenen Entzündung im histologischen Präparat eingeschlossen. Dadurch könnten die teilweise der Literatur widersprechenden Ergebnisse zustande gekommen sein. Die Ergebnisse der Kontrollen in dieser Arbeit könnten ebenfalls durch verschiedene Faktoren beeinflusst worden sein. So nahmen einige von ihnen Medikamente ein oder wiesen Polypen in der Anamnese auf. Für genaue Informationen zu den eingeschlossenen Patienten und Kontrollen, siehe **Tabelle 3.2.5 und Tabelle 3.2.6** im Anhang. Diese Arbeit zeigte außerdem Unterschiede zwischen den Ergebnissen bei den Mausversuchen und den Versuchen mit den humanen Proben. Hierbei muss ebenfalls die geringe Anzahl der untersuchten Tiere beachtet werden (hier $n=7$). Ein weiterer Nachteil dieser Studie ist die Verwendung des DSS-Modells. DSS induziert bei Mäusen vorwiegend eine Entzündung im Kolon. Untersucht wurde aber das terminale Ileum. Somit lassen sich die Ergebnisse in den Mausversuchen, im Falle von Morbus Crohn, nur bedingt auf den Menschen übertragen. Des Weiteren wurden die Mäuse nur 7 Tage lang mit DSS behandelt. Es könnte sein, dass diese Zeitspanne nicht ausreicht, um eine Veränderung in der Genexpression der untersuchten Proteine zu erzielen. Generell eignen sich Mäuse aufgrund der hohen genetischen Übereinstimmung mit dem menschlichen Genom sehr gut als Versuchstiere. Dennoch weisen sie ein anderes Mikrobiom auf als Menschen, sodass auch die Expression der untersuchten Zielgene verändert sein könnte. Deshalb müssen alle in den Mausversuchen erhobenen Ergebnisse kritisch hinterfragt werden und deren Übertragbarkeit auf den Menschen überprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl im Mausmodell wie auch bei den Patienten der Hh-Ligand Ihh bei Entzündung vermindert exprimiert wurde, was auch in vielen anderen Arbeiten bestätigt werden konnte. Dass Shh bei Patienten mit Morbus Crohn induziert

wurde, wurde auch bereits in der Literatur beschrieben. Dies ist interessant und zeigt auf, dass Ihh und Shh über verschiedene Signalwege reguliert werden. Da Ihh und Shh in verschiedenen Geweben exprimiert werden, könnte man daraus schließen, dass der Hh-Signalweg bei Entzündung gewebeabhängig induziert oder gehemmt wird. BMP4 zeigte sich in dieser Arbeit im Mausmodell signifikant induziert, wohingegen bei den Patienten mit Morbus Crohn ein Trend zu einer verminderten Expression von BMP4 zu sehen war. Dies und auch die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur zeigen den Bedarf an weiteren Studien. Diese sollten mehr Patienten einschließen und multizentrisch durchgeführt werden, um eine allgemein gültige Aussage treffen zu können. Eine größere Auswahl an Patienten könnte es zudem ermöglichen, die Patienten in verschiedene Gruppen, wie beispielsweise Alter oder Schwere der Entzündung, einzuteilen und diese zu vergleichen.

5.5 Ausblick

Bei CED handelt es sich um eine Erkrankung mit steigender Inzidenz (1). Die Tatsache, dass es sich um eine polygenetische Erkrankung mit bisher ungeklärter Pathogenese handelt, macht eine gezielte Therapie sehr schwierig. Das komplexe Zusammenspiel aus Genetik, mikrobiellen Veränderungen und Umweltfaktoren könnte dafür verantwortlich sein, dass nicht für alle Patienten eine effiziente Therapie gefunden werden kann und nur wenige eine dauerhafte Remission erreichen (1, 2). Es gibt viele Mutationen, die mit CED in Verbindung gebracht werden, aber nicht bei allen Patienten finden sich Mutationen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, neue Marker zu finden und Umweltfaktoren, wie beispielsweise das Darmmikrobiom, mit einzubeziehen. Das Ziel wäre eine Einteilung von Patienten in ein neues Klassifikationssystem, um eine individuelle und effiziente Therapie zu ermöglichen.

Einer dieser möglichen Marker könnte die in dieser Arbeit untersuchte NADPH-Oxidase Duox2 sein. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Duox2 Mikrobiota-abhängig induziert wird. Bekannt ist ebenfalls, dass Duox2 zu den am stärksten hochregulierten Genen bei Patienten mit Morbus Crohn gehört (8). In den durchgeführten Versuchen konnte eine Hochregulation bei Entzündung sowohl im Mausmodell, wie auch bei Patienten mit Morbus Crohn bestätigt werden. Dennoch bleiben viele Fragen offen: Wie kommt es, dass Duox2 bei

den Patienten bereits vor der Entzündung induziert ist und ist Duox2 wirklich verantwortlich für die Entstehung der Entzündung? Wenn eine Dysbiose die Ursache für die Duox2-Induktion ist, wie genau kommt diese zustande und welche Bakterien sind der Hauptauslöser? Welche therapeutischen Möglichkeiten würden sich daraus ergeben? Ist eine gezielte antibakterielle Therapie gegen diese Bakterien möglich? Eine erhöhte Expression von Duox2 wiederum bedeutet mehr ROS. Da es aber auch Studien gibt, die einen Mangel an ROS bei CED zeigen (1), stellt sich die Frage, ob Duox2 zwar hochreguliert aber funktionslos ist oder ob durch die Duox2-Induktion wiederum andere ROS-produzierenden Enzyme gehemmt werden und dadurch die Gesamtmenge an ROS vermindert ist. Wenn man diesbezüglich genauere Erkenntnisse gewinnen könnte, wäre es möglich, dies therapeutisch zu nutzen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Duox2 den Hh-Signalweg beeinflusst. Duox-defiziente Mäuse zeigten verminderte Spiegel von Ihh auch nach DSS-Gabe im Vergleich zu Wildtypen. Der Zusammenhang zwischen Duox2 und Hh-Signalweg wiederum lässt vermuten, dass auch Patienten mit Morbus Crohn veränderte Spiegel von Hh-Proteinen aufweisen könnten. Die Versuche in dieser Arbeit konnten diese Vermutung bestätigen und zeigten verminderte Spiegel von Ihh sowohl im DSS-Mausmodell wie auch bei Patienten mit Morbus Crohn. Da weitere Studien eine antiinflammatorische und protektive Wirkung des Hh-Signalweges nachweisen konnten (12) und eine Inhibition in Mäusen eine Kolitis verschlimmerte (16), müssten weitere humane Studien durchgeführt werden, um zu prüfen, ob sich eine Induktion des Hh-Signalweges als therapeutische Möglichkeit eignen würde. Dann stellt sich wiederum die Frage, ob dies für alle Patienten eine mögliche Therapie sein könnte oder ob nur Patienten mit nachgewiesenen Mutationen in Hh-Proteinen, wie Gli1, von einer Therapie profitieren würden.

Alles in allem gibt es viele zukünftige Ansätze und neue Targets, die als Therapie für CED in Betracht kommen. Ein Ziel sollte sein, die Krankheit neu zu klassifizieren und damit die patientenindividuelle Ursache der chronischen Entzündung zu berücksichtigen. Wenn dies kostengünstig gelingen würde, könnte man die Therapie völlig neu gestalten und effizienter machen und so die Rate an Remissionen deutlich anheben. Um dies zu erreichen, müssen weitere Studien durchgeführt werden, die den klinischen Nutzen von Hh-Induktion nachweisen und damit die Entwicklung eines neuen Medikaments in die Wege leiten. Mit

Hilfe von Duox2 als Marker könnten in Zukunft Patienten mit Morbus Crohn früher diagnostiziert werden, noch vor einer invasiven Biopsie. Diese Patienten wiederum könnten von der früheren Diagnose in Form einer sofortigen Therapie profitieren. Es müsste weiterhin geprüft werden, ob sich Duox2 auch als Verlaufsparemeter zur Kontrolle einer Therapie eignen könnte. So könnte der Erfolg einer Therapie direkt geprüft werden. Die Frage ist, ob die Expression von Duox2 sich im Verlauf einer Therapie von CED verändert und eine Remission anzeigen könnte oder ob Duox2 genetisch bedingt immer vermehrt exprimiert ist. Dann wiederum könnte Duox2 sich auch als Screening Marker eignen, um eine eventuelle Prädisposition für die Entwicklung von CED anzuzeigen. Es existieren also noch viele ungeklärte Fragen und der dringende Bedarf an weiterer Forschung, um die Diagnostik, Therapie und Prognose von Patienten mit CED weiter zu verbessern.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Duox2, sowie von Hh- Liganden und BMPs bei akuter Dünndarmmukositis zu untersuchen und so mögliche neue therapeutische Ansätze in der Therapie von CED zu finden.

Die vorliegende Arbeit konnte die in der Literatur bereits beschriebene Tatsache bestätigen, dass die Expression von Duox2 und DuoxA2 durch die Mikrobiota induziert wird und Duox2 somit mikrobiomabhängig reguliert wird (8). Ebenso konnte durch die vorliegende Untersuchung bestätigt werden, dass Duox2 und DuoxA2 bei Entzündung im DSS-Modell der Maus, aber auch bei Patienten mit Morbus Crohn signifikant erhöht exprimiert werden (2, 8, 11). Da Duox2 bei Patienten mit Morbus Crohn vermehrt exprimiert wird und gleichzeitig durch die Mikrobiota induziert wird, kann in dieser Arbeit somit die These unterstützt werden, dass eine Dysbiose mitverantwortlich für die Entstehung von CED ist.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass eine DSS-Gabe bei keimfreien Mäusen zu einer verminderten Expression von Duox2 und DuoxA2 führt. Dies könnte wiederum daran liegen, dass Duox2 über die Mikrobiota reguliert wird. Hierbei bleibt die Frage offen, welche Signalwege genau in diese Regulation involviert sind und ob es eine bestimmte Bakterienspezies gibt, die Duox2 induziert und bei CED gezielt bekämpft werden könnte.

In den Untersuchungen der Duox2-defizienten Mäuse zeigte sich eine verminderte Expression von Ihh und eine vermehrte Expression von BMP4, welche zentrale Regulatoren in der epithelialen Linie im Darmgewebe sind. Somit konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression von Duox2 und dem Hh- bzw. BMP-Signalweg gibt. Im DSS-Modell zeigte sich eine Hemmung des Hh- und BMP-Signaltransduktionsweges bei Duox2-defizienten Mäusen. Daraus kann man ableiten, dass es ein komplexes Zusammenspiel zwischen Entzündung, Duox2 und Hh- bzw.- BMP-Signalweg gibt. Für genauere Kenntnisse über die Regulation sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Des Weiteren zeigte sich eine verminderte Expression des Hh-Liganden Ihh sowohl im DSS-Mausmodell, wie auch bei Patienten mit Morbus Crohn, was auch in vielen anderen Arbeiten bestätigt werden konnte (12, 16). Shh hingegen zeigte sich in dieser Arbeit bei Patienten mit Morbus Crohn vermehrt exprimiert, was ebenfalls schon in der Literatur beschrieben ist (18). BMP4 zeigte sich in dieser Arbeit im Mausmodell signifikant induziert, wohingegen bei den Patienten mit Morbus Crohn ein Trend zu einer verminderten Expression von BMP4 zu sehen war.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit wichtige Erkenntnisse über Signalwege, die eine Rolle in der Pathogenese von CED spielen und somit als zukünftige Ansätze für neue Therapien dienen könnten. Es zeigte sich die bedeutende Rolle von Duox2 sowohl im DSS-Mausmodell, wie auch bei Patienten mit Morbus Crohn. Somit könnte Duox2 als zukünftiger Marker in der Diagnostik von CED dienen. Aber auch Hh-Liganden und BMPs beeinflussen maßgeblich den Entzündungsprozess, sodass deren Rolle als neue therapeutische Targets weiter untersucht werden sollte.

7. Literaturverzeichnis

1. Stenke E, Bourke B, Knaus UG. NADPH Oxidases in Inflammatory Bowel Disease. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2019;1982:695-713.
2. Haberman Y, Tickle TL, Dexheimer PJ, Kim MO, Tang D, Karns R, et al. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(8):3617-33.
3. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology*. 2007;132(1):52-65.
4. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* (London, England). 2002;359(9317):1541-9.
5. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Aadland E, Schulz T, Vatn MH, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a five-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2007;42(5):602-10.
6. Duricova D, Pedersen N, Elkjaer M, Gamborg M, Munkholm P, Jess T. Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(2):347-53.
7. Mirkov MU, Verstockt B, Cleynen I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2017;2(3):224-34.
8. Grasberger H, Gao J, Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Zhang M, Kamada N, et al. Increased Expression of DUOX2 Is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1849-59.
9. Hamm CM, Reimers MA, McCullough CK, Gorbe EB, Lu J, Gu CC, et al. NOD2 status and human ileal gene expression. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(10):1649-57.
10. Rigoni A, Poulosom R, Jeffery R, Mehta S, Lewis A, Yau C, et al. Separation of Dual Oxidase 2 and Lactoperoxidase Expression in Intestinal Crypts and Species Differences May Limit Hydrogen Peroxide Scavenging During Mucosal Healing in Mice and Humans. *Inflammatory bowel diseases*. 2017;24(1):136-48.
11. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal immunology*. 2015;8(2):372-9.
12. Buongusto F, Bernardazzi C, Yoshimoto AN, Nanini HF, Coutinho RL, Carneiro AJV, et al. Disruption of the Hedgehog signaling pathway in inflammatory bowel disease fosters chronic intestinal inflammation. *Clinical and experimental medicine*. 2017;17(3):351-69.
13. Lees CW, Zacharias WJ, Tremelling M, Noble CL, Nimmo ER, Tenesa A, et al. Analysis of germline GLI1 variation implicates hedgehog signalling in the regulation of intestinal inflammatory pathways. *PLoS medicine*. 2008;5(12):e239.
14. van Dop WA, Heijmans J, Buller NV, Snoek SA, Rosekrans SL, Wassenberg EA, et al. Loss of Indian Hedgehog activates multiple aspects of a wound healing response in the mouse intestine. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1665-76, 76.e1-10.
15. Buller NV, Rosekrans SL, Westerlund J, van den Brink GR. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology* (Bethesda, Md). 2012;27(3):148-55.

16. Lee JJ, Rothenberg ME, Seeley ES, Zimdahl B, Kawano S, Lu WJ, et al. Control of inflammation by stromal Hedgehog pathway activation restrains colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(47):E7545-e53.
17. 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*. 2008;77 Suppl 1:42-7.
18. Kangwan N, Kim YJ, Han YM, Jeong M, Park JM, Go EJ, et al. Sonic hedgehog inhibitors prevent colitis-associated cancer via orchestrated mechanisms of IL-6/gp130 inhibition, 15-PGDH induction, Bcl-2 abrogation, and tumorsphere inhibition. *Oncotarget*. 2016;7(7):7667-82.
19. Nielsen CM, Williams J, van den Brink GR, Lauwers GY, Roberts DJ. Hh pathway expression in human gut tissues and in inflammatory gut diseases. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(12):1631-42.
20. Ghorpade DS, Sinha AY, Holla S, Singh V, Balaji KN. NOD2-nitric oxide-responsive microRNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(46):33037-48.
21. Ji T, Takabayashi H, Mao M, Han X, Xue X, Brazil JC, et al. Regulation and function of bone morphogenetic protein signaling in colonic injury and inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2017;312(1):G24-g33.
22. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & diseases*. 2014;1(1):87-105.
23. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M. *Innere Organe : 122 Tabellen*. Prometheus : *LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke ; Erik Schulte ; Udo Schumacher III von Markus Voll* 4. Aufl. ed. Stuttgart u.a.2015.
24. Kirsch J. *Taschenlehrbuch Anatomie : 80 Tabellen*. Stuttgart2011.
25. Klinke R, Pape H, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 6. Auflage ed. New York: Georg Thieme Verlag; 2010.
26. Zilles K, Tillmann BN. *Anatomie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg2010.
27. Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell stem cell*. 2010;7(6):656-70.
28. Meran L, Baulies A, Li VSW. Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem cells international*. 2017;2017:7970385.
29. Miron N, Cristea V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical and experimental immunology*. 2012;167(3):405-12.
30. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and infection*. 2005;7(7-8):997-1004.
31. Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science (New York, NY)*. 2013;342(6157):447-53.
32. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology*. 2008;1(1):11-22.
33. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(9):710-20.
34. Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, Bravo DM, Callaghan B. The gut as a sensory organ. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(12):729-40.
35. Kali A. Human Microbiome Engineering: The Future and Beyond. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2015;9(9):De01-4.

36. Haller D, Hörmannspurger G. Darmgesundheit und Mikrobiota : Ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit. essentials. Wiesbaden2015.
37. Reifenberg DK. Hygiene in Versuchstierhaltungen [Available from: www.ag-wolfrum.bio.uni-mainz.de/Dateien/Vorl7-Hygiene.pdf].
38. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41.
39. Schroeder BO, Backhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature medicine*. 2016;22(10):1079-89.
40. Costea PI. Stratification and Variation of the Human Gut Microbiota: Julius-Maximilians- Universität Würzburg; 2016.
41. Reinhardt C, Reigstad CS, Backhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;48(3):249-56.
42. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific reports*. 2016;6:23129.
43. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2017;15(10):630-8.
44. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(6):341-52.
45. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in microbiology*. 1996;4(11):430-5.
46. Grover M, Kashyap PC. 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*. 2014;26(6):745-8.
47. Boulange CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*. 2016;8(1):42.
48. Belinson H, Savage AK, Fadrosch D, Kuo YM, Lin D, Valladares R, et al. Dual epithelial and immune cell function of Dvl1 regulates gut microbiota composition and intestinal homeostasis. *JCI insight*. 2016;1(10).
49. Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in health and disease*. 2016;15:108.
50. Isolauri E. Microbiota and Obesity. Nestle Nutrition Institute workshop series. 2017;88:95-105.
51. Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC. Microbes and mental health: A review. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;66:9-17.
52. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circulation research*. 2017;120(7):1183-96.
53. Gordon HA, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological reviews*. 1971;35(4):390-429.
54. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (New York, NY)*. 2016;352(6285):539-44.
55. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annual review of nutrition*. 1981;1:257-79.

56. Inzunza J, Midtvedt T, Fartoo M, Norin E, Osterlund E, Persson AK, et al. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. *Laboratory animals*. 2005;39(4):421-7.
57. Abrams GD, Bauer 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; a journal of technical methods and pathology*. 1963;12:355-64.
58. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lunden G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*. 2012;483(7391):627-31.
59. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015;50(8):942-51.
60. Girardelli M, Basaldella F, Paolera SD, Vuch J, Tommasini A, Martellosi S, et al. Genetic profile of patients with early onset inflammatory bowel disease. *Gene*. 2018;645:18-29.
61. Kennedy NA, Lamb CA, Berry SH, Walker AW, Mansfield J, Parkes M, et al. The Impact of NOD2 Variants on Fecal Microbiota in Crohn's Disease and Controls Without Gastrointestinal Disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2018;24(3):583-92.
62. Xu S, Zou H, Zhang H, Zhu S, Zhou R, Li J. Investigation of inflammatory bowel disease risk factors in 4 families in central China. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(2):1367-75.
63. Dominguez MA, Landi V, Morera L, Martinez A, Jimenez-Marin A, Garrido JJ. Identification and functional characterization of polymorphisms in promoter sequences of porcine NOD1 and NOD2 genes. *Research in veterinary science*. 2019;124:310-6.
64. Werner M, Riede U-N. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Springer-Lehrbuch. 2., überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg 2017.
65. *Innere Medizin 2016 : eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und im Stichwortverzeichnis*. Herold G, editor. Köln 2016.
66. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-month : DM*. 2018;64(2):20-57.
67. Courth LF, Ostaff MJ, Mailander-Sanchez D, Malek NP, Stange EF, Wehkamp J. Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(45):14000-5.
68. Parian AM, Lazarev MG. Serrated Colorectal Lesions in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2018;14(1):19-25.
69. Waszczuk E, Waszczuk K, Bohdanowicz-Pawlak A, Florjanski J. Women with inflammatory bowel diseases have a suboptimal cervical cancer screening rate and are not aware of the recommended human papilloma virus vaccine. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2018:1-3.
70. Zhu Z, Mei Z, Guo Y, Wang G, Wu T, Cui X, et al. Reduced Risk of Inflammatory Bowel Disease-associated Colorectal Neoplasia with Use of Thiopurines: a Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2018.
71. Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(10):2607-19.
72. Pacquelet S, Lehmann M, Luxen S, Regazzoni K, Frausto M, Noack D, et al. Inhibitory action of NoxA1 on dual oxidase activity in airway cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(36):24649-58.

73. Corcionivoschi N, Alvarez LA, Sharp TH, Strengert M, Alemka A, Mantell J, et al. Mucosal reactive oxygen species decrease virulence by disrupting *Campylobacter jejuni* phosphotyrosine signaling. *Cell host & microbe*. 2012;12(1):47-59.
74. Kim SH, Lee WJ. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;3:116.
75. Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Sekiyama A, Teshima-Kondo S. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9-10):1573-82.
76. Aviello G, Knaus UG. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? *British journal of pharmacology*. 2017;174(12):1704-18.
77. De Deken X, Corvilain B, Dumont JE, Miot F. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(17):2776-93.
78. Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5727):1463-5.
79. Briscoe J, Therond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(7):416-29.
80. Gorojankina T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(7):1317-32.
81. Saqui-Salces M, Merchant JL. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1803(7):786-95.
82. Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, et al. Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in *Gli2* mutant mice. *Development (Cambridge, England)*. 1998;125(14):2533-43.
83. Matisse MP, Epstein DJ, 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 (Cambridge, England)*. 1998;125(15):2759-70.
84. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates *Gli2* transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(9):3365-77.
85. Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of *Gli3* produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*. 2000;100(4):423-34.
86. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cellular signalling*. 2011;23(4):609-20.
87. Walton KD, Whidden M, Kolterud A, Shoffner SK, Czerwinski MJ, Kushwaha J, et al. Villification in the mouse: *Bmp* signals control intestinal villus patterning. *Development (Cambridge, England)*. 2016;143(3):427-36.
88. Brazil DP, Church RH, Surae S, Godson C, Martin F. BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends in cell biology*. 2015;25(5):249-64.
89. Johnson KR, Marden CC, Ward-Bailey P, Gagnon LH, Bronson RT, Donahue LR. Congenital hypothyroidism, dwarfism, and hearing impairment caused by a missense mutation in the mouse dual oxidase 2 gene, *Duox2*. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2007;21(7):1593-602.
90. Lee KA, Cho KC, Kim B, Jang IH, Nam K, Kwon YE, et al. Inflammation-Modulated Metabolic Reprogramming Is Required for DUOX-Dependent Gut Immunity in *Drosophila*. *Cell host & microbe*. 2018;23(3):338-52.e5.

91. Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, et al. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nature immunology*. 2009;10(9):949-57.
92. Lee KA, Kim B, Bhin J, Kim DH, You H, Kim EK, et al. Bacterial uracil modulates Drosophila DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell host & microbe*. 2015;17(2):191-204.
93. Lee KA, Kim SH, Kim EK, Ha EM, You H, Kim B, et al. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in Drosophila. *Cell*. 2013;153(4):797-811.
94. Pircalabioru G, Aviello G, Kubica M, Zhdanov A, Paclet MH, Brennan L, et al. Defensive Mutualism Rescues NADPH Oxidase Inactivation in Gut Infection. *Cell host & microbe*. 2016;19(5):651-63.
95. Yang HT, Yang MC, Sun JJ, Shi XZ, Zhao XF, Wang JX. Dual oxidases participate in the regulation of intestinal microbiotic homeostasis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Developmental and comparative immunology*. 2016;59:153-63.
96. Xiao X, Yang L, Pang X, Zhang R, Zhu Y, Wang P, et al. A Mesh-Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut. *Nature microbiology*. 2017;2:17020.
97. Izumi Y, Yanagihashi Y, Furuse M. A novel protein complex, Mesh-Ssk, is required for septate junction formation in the Drosophila midgut. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 20):4923-33.
98. Grasberger H, Noureldin M, Kao TD, Adler J, Lee JM, Bishu S, et al. Increased risk for inflammatory bowel disease in congenital hypothyroidism supports the existence of a shared susceptibility factor. *Scientific reports*. 2018;8(1):10158.
99. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH, Grasberger H, Donko A, Leto TL, et al. Deficiency in Duox2 activity alleviates ileitis in GPx1- and GPx2-knockout mice without affecting apoptosis incidence in the crypt epithelium. *Redox biology*. 2017;11:144-56.
100. Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, Baker MT, Ayyadurai S, Charania MA, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PloS one*. 2012;7(3):e32084.
101. Lee KA, Kim B, You H, Lee WJ. Uracil-induced signaling pathways for DUOX-dependent gut immunity. *Fly*. 2015;9(3):115-20.

8. Anhang

Tabelle 3.2.5: Charakteristika der eingeschlossenen Kontrollen

Kontrolle	Geschlecht	Geburtsjahr	Koloskopieindikation	Darm- OP	Medikation
K0	Männlich	1939	Kontrolle bei Z.n. Polypektomie 2012	Polypektomie bei low- grade- Adenom 2012	Ramilich, Amlodipin, Simvastatin
K3	Weiblich	1940	Vorsorge	Nein	/
K4	Männlich	1973	Kontrolle bei Z. n. Divertikulose	Nein	/
K5	weiblich	1956	Vorsorge	Nein	Simvastatin 30mg, Metoprolol, Citalopram, Ranitidin bei Bedarf
K6	Männlich	1947	Vorsorge	Nein	/
K8	Männlich	1971	Kontrolle bei Z. n. Polypektomie 2011	Polypektomie 2007, 2011	L-Thyoxin 75µg
K10	Weiblich	1997	Frage nach Entzündung bei Beschwerden	Nein	PPI bei Bedarf
K12	Weiblich	1952	Kontrolle bei Z. n. Polypektomie	Polypektomie	L-Thyoxin 88 µg
K13	Männlich	1996	Kontrolle bei Z. n. Colonkarzinom ED2012	Colonteilresektion 2012	/

Tabelle 3.2.6: Charakteristika eingeschlossener Crohn-Patienten

Patient	Geschlecht	Geburtsjahr	Diagnose	Remissio	Darm- OP	Medikation	Histologie
C0	Weiblich	1986	Juli 2012	Nein	Nein	50 mg/d Solu Decortir Buscupan, Novalgin bei Bedarf	Mäßig entzündliche Aktivität
C5	Weiblich	1958	1975	Nein	Nein	40mg Adalimumab/14d Bisoprolol, Pantoprazol	Geringe bis mäßige Aktivität
C10	Männlich	1974	2003	Nein	Ileozökalresektion 2008	Adalimumab Novalgin, Tramal bei Bedarf	Hochgradige Aktivität
C13	Männlich	1988	Mai 2012	Nein	Nein	Adalimumab 40mg/10d Omeprazol, Alitretinoin 30mg	Mäßiggradige Aktivität
C15	Männlich	1989	März 2010	Ja	Nein	Prednisolon 20mg/d Azathioprin 100mg/d Pantoprazol, Novalgin bei Bedarf Pantoprazol, Novalgin bei Bedarf	Geringe- bis mäßige Aktivität
C16	Männlich	1959	1990	Ja	Appendektomie Ileozökalresektion 2011	Mesalazin 1,5g, Clopidogrel, Vit. B12	Hochgradige Aktivität
C17	Männlich	1988	2009	Nein	Appendektomie abdomineller Abszess 2008	Vedalizumab/ 8 Wochen	Geringe Aktivität
C18	Männlich	1946	1979	Ja	Ileozökalresektion 1995	Adalimumab 40mg/ 14d, Ferrosanol 100mg, Carmen 10mg, Euthyrox 150mg	Geringe Entzündung
C20	Männlich	1956	1983	Nein	Ileozökal-, Sigmasegmentresektion 2012	Infliximab/ 5 Wochen	Chronisch aktive Entzündung

Abbildung 8.1: Aufklärungsbogen für Crohn Patienten

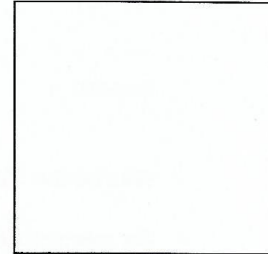


UNIVERSITÄTSmedizIn.
MAINZ
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Patienteninformation (M. Crohn)

Information V 2.0

Studie: Expression von Gewebefaktoren, Gerinnungsfaktoren und Mechanismen der Vaskularisation bei M. Crohn



Ansprechpartner: Dr. Jens Kittner, I. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz, Langenbeckstr. 1,
55131 Mainz, Tel. 06131 17-0

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Wir möchten Sie fragen, ob Sie an einer Studie zur weiteren Erforschung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen teilnehmen möchten.

Wie Sie möglicherweise wissen, kann eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung wie der M. Crohn erhebliche Folgeschäden an Darm und anderen Organen im Bauchraum hervorrufen. Der Auslöser der Erkrankung ist aber nach wie nicht bekannt. Sowohl genetische Faktoren spielen eine Rolle, aber auch Umweltfaktoren wie Darmbakterien oder Antibiotikatherapie können von Bedeutung sein. Leider sind die verfügbaren Therapieoptionen in vielen Fällen nicht ausreichend.

Es ist daher sinnvoll, weitere Forschung durchzuführen, um die Vorgänge von Entzündung und Regeneration besser zu verstehen. Dies kann zur Entwicklung neuer Medikamente führen.

Untersuchungen an Mäusen haben ergeben, dass mehrere Eiweiße und Gerinnungsproteine im entzündeten Dünndarm in anderer Konzentration als in einem gesunden Darm vorliegen. Die Menge bestimmter Proteine können mittels bestimmter Färbetechniken unter dem Mikroskop analysiert. Ebenfalls kann die Menge von Vorläufermolekülen, die für das jeweilige Protein codieren, bestimmt werden.

Seite 2/3

Was ist das Ziel der Studie?

Wir möchten herausfinden, ob Veränderungen, die wir im Dünndarm von Mäusen mit gefunden haben, auch bei Menschen mit M. Crohn vorliegen. Zur besseren Vergleichbarkeit ist es dafür erforderlich, auch gesunde Menschen zu untersuchen.

Wie läuft die Studie ab?

Bei Ihnen ist eine Coloskopie (Darmspiegelung) - unabhängig von einer Studienteilnahme - vorgesehen.

Bei der Coloskopie werden routinemäßig kleine Gewebeproben (Biopsien) entnommen, um das Gewebe auch unter dem Mikroskop beurteilen zu können. Das Risiko, dass es hierdurch zu einer Nachblutung kommt oder dass der Darm ernsthaft verletzt wird, ist sehr gering.

Im Rahmen der geplanten Studie werden vier zusätzliche Gewebeproben aus dem unteren Dünndarm (terminales Ileum) entnommen.

Ebenso werden Daten zur Erstdiagnose, der bisherigen und aktuellen Medikation sowie Voroperationen und Thrombosen erfasst und ausgewertet.

Nutzen der Studie

Als Teilnehmer der Studie haben Sie keinen Nutzen. Es werden Erkenntnisse erwartet, die möglicherweise zu zukünftigen Therapieansätzen führen. Für die Teilnahme an dieser Studie gibt es keine finanzielle Entschädigung.

Risiken der Studie

Über die allgemeinen Risiken einer Endoskopie und Probenentnahme werden Sie von ihrem behandelnden Arzt unabhängig von der Studie aufgeklärt. Durch die zusätzliche Entnahme von vier Gewebeproben verlängert sich die Untersuchungszeit um wenige Minuten. Es ist denkbar, dass es in sehr seltenen Fällen als Folge der zusätzlichen Probenentnahme zu einer Blutung oder Darmverletzung kommt, die eine erneute Coloskopie, eine Blutübertragung oder auch eine Operation erforderlich machen könnten.

Seite 3/3

Die Studienteilnahme ist selbstverständlich freiwillig, außerdem besteht jederzeit die Möglichkeit, die Bereitschaft zur Studienteilnahme zu widerrufen und eine Löschung der Daten zu verlangen. Dann werden auch die bereits gewonnen Proben vernichtet.

Was passiert mit meinen Proben und Daten?

Zwei Darmbiopsien werden eingebettet, geschnitten und spezifisch gefärbt. Die Wachsböcke werden für 10 Jahre aufbewahrt. Aus den weiteren Proben werden Vorläufermoleküle analysiert, welche für die betreffenden Proteine kodieren. Das restliche Gewebe wird nach der Untersuchung verworfen.

Ihre Daten werden vom behandelnden Arzt unmittelbar pseudonymisiert, d. h. Name und Geburtsdatum werden durch einen Code ersetzt. Diese Pseudonymisierung ermöglicht, dass außer den für die Studie verantwortlichen Personen niemand eine Verbindung zwischen den Daten und Ihnen herstellen kann. Die Ergebnisse der Analysen werden pseudonymisiert mit Ihren klinischen Daten (Krankheitsdauer, aktuelle Medikation, Alter und Geschlecht) verbunden. Selbstverständlich werden die Bestimmungen der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes eingehalten. Die Daten werden für 10 Jahre gespeichert und danach gelöscht.

Ergebnisse der Studie werden in internationalen wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert, um sie auch anderen Wissenschaftlern zugänglich zu machen. Wir weisen darauf hin, dass die Veröffentlichung wissenschaftlicher Daten nur in anonymisierter Form geschieht.

Jegliche medizinische Unterlagen werden vertraulich behandelt, die Unterlagen werden gemäß rechtlichen Bestimmungen gelagert. Ihre Daten und das Ergebnis der Untersuchung werden von uns weder an eine Versicherung noch an den Arbeitgeber weitergeleitet.

Die studienbedingte Entnahme von Gewebeproben ist durch die Unfallkasse des Landes PLP, Orensteinerstr. 10, 56626 Andernach, abgesichert.

Fragen oder Bedenken

Wenn Sie weitere Fragen haben oder Bedenken äußern wollen, zögern Sie bitte nicht und fragen Ihren betreuenden Arzt.

Abbildung 8.2: Aufklärungsbogen für Probanden/Kontrollen



UNIVERSITÄTS**medizin.**

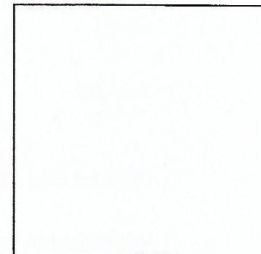
MAINZ

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Probandeninformation

Information V 2.0

Studie: Expression von Gewebefaktoren, Gerinnungsfaktoren und Mechanismen der Vaskularisation bei M. Crohn



Ansprechpartner: Dr. Jens Kittner, I. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz, Langenbeckstr. 1,
55131 Mainz, Tel. 06131 17-0

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr!

Wir möchten Sie fragen, ob Sie an einer Studie zur weiteren Erforschung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen teilnehmen möchten.

Wie Sie möglicherweise wissen, kann eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung wie der M. Crohn erhebliche Folgeschäden an Darm und anderen Organen im Bauchraum hervorrufen. Der Auslöser der Erkrankung ist aber nach wie nicht bekannt. Sowohl genetische Faktoren spielen eine Rolle, aber auch Umweltfaktoren wie Darmbakterien oder Antibiotikatherapie können von Bedeutung sein. Leider sind die verfügbaren Therapieoptionen in vielen Fällen nicht ausreichend.

Es ist daher sinnvoll, weitere Forschung durchzuführen, um die Vorgänge von Entzündung und Regeneration besser zu verstehen. Dies kann zur Entwicklung neuer Medikamente führen.

Untersuchungen an Mäusen haben ergeben, dass mehrere Eiweiße und Gerinnungsproteine im entzündeten Dünndarm in anderer Konzentration als in einem gesunden Darm vorliegen. Die Menge bestimmter Proteine können mittels bestimmter Färbetechniken unter dem Mikroskop analysiert. Ebenfalls kann die Menge von Vorläufermolekülen, die für das jeweilige Protein codieren, bestimmt werden.

Was ist das Ziel der Studie?

Wir möchten herausfinden, ob Veränderungen, die wir im Dünndarm von Mäusen mit gefunden haben, auch bei Menschen mit M. Crohn vorliegen. Zur besseren Vergleichbarkeit ist es dafür erforderlich, auch gesunde Menschen zu untersuchen.

Wie läuft die Studie ab?

Bei Ihnen ist eine Coloskopie (Darmspiegelung) - unabhängig von einer Studienteilnahme - vorgesehen. Bei dieser Untersuchung wird in Abhängigkeit von der Fragestellung der untere Teil des Dünndarms (terminales Ileum) nicht immer untersucht.

Bei der Coloskopie werden routinemäßig von auffälligem Gewebe kleine Proben (Biopsien) entnommen, um das Gewebe auch unter dem Mikroskop beurteilen zu können. Das Risiko, dass es hierdurch zu einer Nachblutung kommt oder dass der Darm ernsthaft verletzt wird, ist sehr gering.

Im Rahmen dieser Studie ist es vorgesehen, in den unteren Dünndarm (terminales Ileum) zu spiegeln und hier vier Gewebeproben zu entnehmen.

Nutzen der Studie

Als Teilnehmer der Studie haben Sie keinen Nutzen. Es werden Erkenntnisse erwartet, die möglicherweise zu zukünftigen Therapieansätzen führen. Für die Teilnahme an dieser Studie gibt es keine finanzielle Entschädigung.

Risiken der Studie

Über die allgemeinen Risiken einer Endoskopie und Probenentnahme werden Sie von ihrem behandelnden Arzt unabhängig von der Studie aufgeklärt. Durch die zusätzliche Spiegelung des unteren Dünndarms und die Entnahme von vier Gewebeproben verlängert sich die Untersuchungszeit um wenige Minuten. Es ist denkbar, dass es in sehr seltenen Fällen als Folge der zusätzlichen Probenentnahme zu einer Blutung oder Darmverletzung kommt, die eine erneute Coloskopie, eine Blutübertragung oder auch eine Operation erforderlich machen könnten.

Seite 3/3

Die Studienteilnahme ist selbstverständlich freiwillig, außerdem besteht jederzeit die Möglichkeit, die Bereitschaft zur Studienteilnahme zu widerrufen und eine Löschung der Daten zu verlangen. Dann werden auch die bereits gewonnen Proben vernichtet.

Was passiert mit meinen Proben und Daten?

Zwei Darmbiopsien werden eingebettet, geschnitten und gefärbt. Die Wachsböcke werden für 10 Jahre aufbewahrt. Aus den weiteren Proben werden Vorläufermoleküle analysiert, welche für die betreffenden Proteine kodieren. Das restliche Gewebe wird nach der Untersuchung verworfen.

Ihre Daten werden vom behandelnden Arzt unmittelbar pseudonymisiert, d. h. Name und Geburtsdatum werden durch einen Code ersetzt. Diese Pseudonymisierung ermöglicht, dass außer den für die Studie verantwortlichen Personen niemand eine Verbindung zwischen den Daten und Ihnen herstellen kann. Die Ergebnisse der Analysen werden pseudonymisiert mit Ihren klinischen Daten (Krankheitsdauer, aktuelle Medikation, Alter und Geschlecht) verbunden. Selbstverständlich werden die Bestimmungen der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes eingehalten. Die Daten werden für 10 Jahre gespeichert und danach gelöscht.

Ergebnisse der Studie werden in internationalen wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert, um sie auch anderen Wissenschaftlern zugänglich zu machen. Wir weisen darauf hin, dass die Veröffentlichung wissenschaftlicher Daten nur in anonymisierter Form geschieht.

Jegliche medizinische Unterlagen werden vertraulich behandelt, die Unterlagen werden gemäß rechtlichen Bestimmungen gelagert. Ihre Daten und das Ergebnis der Untersuchung werden von uns weder an eine Versicherung noch an den Arbeitgeber weitergeleitet.

Die studienbedingte Entnahme von Gewebeproben ist durch die Unfallkasse des Landes PLP, Orensteinerstr. 10, 56626 Andernach, abgesichert.

Fragen oder Bedenken

Wenn Sie weitere Fragen haben oder Bedenken äußern wollen, zögern Sie bitte nicht und fragen Ihren betreuenden Arzt.

Danksagungen

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, unter seiner Aufsicht meine Doktorarbeit zu schreiben. Ich danke ihm für die gute Betreuung und Unterstützung.

Mein Dank geht auch an meinen Zweitgutachter dafür, dass ich meine Experimente und Auswertungen im Centrum für Thrombose und Hämostase in seiner Abteilung durchführen durfte und für seine hervorragende fachliche Betreuung im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Betreuerin für die tolle Betreuung, die viele Geduld und Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.

Mein Dank geht auch an die Endoskopie der Inneren Medizin der Universitätsmedizin Mainz. Danke an alle Ärzte und Pfleger, die mir die Entnahme meiner Proben ermöglicht haben.

Außerdem möchte ich mich bei allen meinen Partnern im Labor bedanken für die gute Zusammenarbeit, Hilfe und Beratung während meiner Arbeit.

Zum Schluss danke ich allen, die mir bei der Fertigstellung dieser Doktorarbeit geholfen haben.