

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

Rolle von Toll-like Rezeptor-4 und Dual Oxidase-2  
im adaptiven Remodelling der Dünndarmmukosa

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

Vorgelegt von

Florentina Sophie Melzow  
aus Berlin

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.07.2021

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung und Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1.1 Anatomie.....	3
2.1.2 Histologie .....	4
2.1.3 Stammzellnische.....	7
2.1.4 Der Hedgehog-Signalweg.....	8
2.2 Immunsystem.....	10
2.2.1 Toll-like Rezeptoren .....	10
2.2.2 MyD88-abhängiger Signalweg.....	12
2.2.3 MyD88-unabhängiger Signalweg.....	13
2.3 Mikrobiota .....	13
2.3.1 Aufbau und Funktion des Mikrobioms.....	14
2.3.2 Mikrobiom und Krankheit .....	15
2.3.3 Reaktive Sauerstoffspezies .....	15
2.3.4 NADPH-Oxidasen .....	16
2.3.5 Veränderungen am Mikrobiom der Maus.....	18
2.4 Vaskularisierung.....	19
2.4.1 Angiogenese.....	19
2.4.2 Angiogenese der Dünndarmmukosa.....	21
2.4.3 Protease-aktivierter Rezeptor 1 .....	22
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Material .....	24
3.2 Methoden .....	29
3.2.1 Tierhaltung.....	29
3.2.2 Gewebeentnahme.....	30
3.2.3 Epithelzellenisolation .....	31
3.2.4 RNA-Isolation.....	31
3.2.5 cDNA Synthese.....	32
3.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR .....	33
3.2.7 Herstellung der Paraffinschnitte.....	33
3.2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	34

3.2.9 Histologische Analyse .....	34
3.2.10 Zellkultur .....	37
3.2.11 ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay .....	37
4 Ergebnisse .....	39
4.1 Dünndarmmorphologie der <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup> -defizienten Mäuse (CONV-R vs. GF) .....	39
4.2 <i>Tlr4</i> -abhängige Regulation der Expression von Hedgehog Liganden .....	43
4.3 LPS-Stimulation verstärkt DUOXA2 mRNA Expression und epitheliale H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Bildung .....	44
4.4 PAR1-Defizienz ist mit verminderter DUOX2 Expression im Dünndarm assoziiert .....	46
4.5 <i>F2r</i> <sup>-/-</sup> Mäuse und <i>Duox2</i> <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen verminderte mRNA Expression des vaskulären Markers PECAM-1 .....	47
4.6 Dünndarmmorphologie von <i>Duox2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	47
5 Diskussion .....	50
5.1 Dünndarmmorphologie der <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup> -defizienten Mäuse (CONV-R vs. GF) .....	50
5.2 <i>Tlr4</i> -abhängige Regulation der Expression von Hedgehog Liganden .....	55
5.3 LPS-Stimulation verstärkt DUOXA2 mRNA Expression und epitheliale H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Bildung .....	57
5.4 PAR1-Defizienz ist mit verminderter DUOX2 Expression im Dünndarm assoziiert .....	59
5.5 <i>F2r</i> <sup>-/-</sup> Mäuse und <i>Duox2</i> <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen verminderte mRNA Expression des vaskulären Markers PECAM-1 .....	60
5.6 Dünndarmmorphologie von <i>Duox2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	61
6 Zusammenfassung .....	65
7 Literaturverzeichnis .....	67
8 Anhang .....	77
8.1 Details der Versuche .....	77
8.1.1 Histologie .....	77
8.1.2 MODE-K Zellkultur .....	77
8.2 Anwendungsprotokolle .....	77
8.2.1 RNeasy Mini Kit Protokoll .....	77
8.2.2 ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay Protokoll .....	77
9 Danksagung .....	78

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
Ang-1	Angiopoetin-1
APC	Aktiviertes Protein C
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
c	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CBC	<i>Crypt base columnar</i> Zellen
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD31	siehe PECAM-1
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
CTR	<i>Controls</i> , Kontrollgruppe
Dhh	<i>Desert Hedgehog</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DUOX2	Duale Oxidase-2
DUOXA2	<i>Dual oxidase maturation factor 2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	EF-Hand
ENS	Enterisches Nervensystem
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , Fötale Kälberserum
fl	<i>floxed</i>
for	<i>forward</i>
FXa	Aktivierter Faktor X
GF	<i>Germ-free</i> , keimfrei
Gli1	Glioblastoma Transkriptionsfaktor 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hh	Hedgehog
HIP	<i>Hedgehog interacting protein</i>
IFN-γ	Interferon-gamma
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IL	Interleukin
IRAK	<i>interleukin receptor associated kinase</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor</i>
kDa	Kilodalton
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LPB	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein

LPS	Lipopolysaccharid, TLR4-Antagonist
LRP	<i>low-density-lipoprotein-related protein</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
MD-2	<i>Myeloid Differentiation factor 2</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mL	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	Messenger RNA
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> , Tlr- Adaptermolekül
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-Cells</i>
ng	Nanogramm
NOX	NADPH Oxidase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid-Anion
O <sub>3</sub>	Ozon
P	Signifikanzwert
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1 (CD31)	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> , Thrombozyten- Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
Perox	Peroxidase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
Ptch	<i>Patched</i>
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rel.	Relative
rev	<i>reverse</i>
RLR	RIG-I-ähnliche Proteine
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
Si	<i>Small intestine</i> -Segment, Dünndarm-Segment
Smo	<i>Smoothed</i>
SPF	<i>Specific-pathogen free</i> , spezifisch keimfrei
Tab.	Tabelle
TARC	Translational Animal Research Center
TCF	<i>T-cell factor</i>
TIRAP	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein</i>
TIR-Domäne	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain</i>
TLR	Toll-like Rezeptor

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
u.a.	Unter anderem
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Anatomie des menschlichen Verdauungstraktes. ....	3
Abbildung 2: Histologisches Bild des Dünndarms einer Maus.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stammzellnische.....	7
Abbildung 4: Hedgehog-Signalweg. ....	9
Abbildung 5: Downstream Signalwege von TLR4. ....	12
Abbildung 6: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion durch DUOX2.....	18
Abbildung 7: Funktionen von PAR1.....	23
Abbildung 8: Auswertungsschema der Dünndarmmorphologie.....	35
Abbildung 9: Auswertungsschema der Dünndarmmorphologie.....	36
Abbildung 10: Morphologie des distalen Dünndarms konventionell-aufgezogener und keimfreier <i>Tlr4</i> -defizienter Mäuse. ....	39
Abbildung 11: Veränderungen der Villusmorphologie konventionell-aufgezogener (CONV-R) und keimfreier (GF) <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup> -defizienter Mäuse. ....	40
Abbildung 12: <i>Tlr4</i> beeinflusst die PECAM-1 Expression.....	42
Abbildung 13: <i>Tlr4</i> beeinflusst die Expression von Hedgehog-Liganden.....	43
Abbildung 14: DUOX2 und DUOXA2 Expression unter LPS-Behandlung.....	44
Abbildung 15: LPS-induzierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion von MODE-K Zellen.....	45
Abbildung 16: DUOX2 und DUOXA2 bei <i>F2r</i> -Defizienz. ....	46
Abbildung 17: PECAM-1 Expression bei <i>F2r</i> - und vollständiger <i>Duox2</i> -Defizienz. ...	47
Abbildung 18: Morphologie des distalen Dünndarms, <i>Duox2</i> -defiziente Mäuse.....	48
Abbildung 19: Veränderungen der Villusmorphologie im Dünndarm <i>Duox2</i> <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	48

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte Liganden von TLR4. ....	11
Tabelle 2: Malignome und ihre Assoziation mit einem entzündlichen Stimulus. ....	16
Tabelle 3: NADPH-Oxidasen und ihre Lokalisationen. ....	17
Tabelle 4: qPCR Primer .....	24
Tabelle 5: Primer Genotypisierung Duox2.....	24
Tabelle 6: Chemikalien.....	24
Tabelle 7: Geräte.....	25
Tabelle 8: Verbrauchsmaterial.....	27
Tabelle 9: Kits.....	28
Tabelle 10: Mauslinien .....	28
Tabelle 11: Software .....	28
Tabelle 12: Zelllinie .....	29
Tabelle 13: Pipettierschema Genotypisierung .....	29
Tabelle 14: Programm Thermocycler Genotypisierung .....	29
Tabelle 15: Pipettierschema cDNA Synthese.....	32
Tabelle 16: Programm Thermocycler cDNA-Synthese.....	32
Tabelle 17: Pipettierschema qPCR .....	33
Tabelle 18: Programm qPCR .....	33
Tabelle 19: Medium für die MODE-K Zellkultur .....	37
Tabelle 20: Medium für das H2O2-Glo Kit.....	38
Tabelle 21: Villuslängen-Kernanzahl-Relation, Tlr4-defiziente Mäuse. ....	41
Tabelle 22: Veränderte Villuslängen-Kernanzahl-Relation in Duox2-defizienten Mäusen. ....	49
Tabelle 23: Anzahl der untersuchten Mäuse in histologischen Versuchen.....	77
Tabelle 24: Anzahl der untersuchen Wells im ROS-Glo™ H2O2 Assay .....	77

## 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) und Malignome des Darms treten in Industrienationen in den vergangenen 50 Jahren mit steigenden Inzidenzen auf.(1) Die wichtigsten Vertreter der CED sind Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. In Deutschland liegt die Inzidenz für Morbus Crohn bei ca. 6,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Das führt zu einer aktuellen Prävalenz von etwa 100-200 Erkrankten pro 100.000 Einwohner.(2) Rund ein Fünftel erkrankt vor dem zwanzigsten Lebensjahr, ein weiterer Gipfel findet sich im dritten Lebensjahrzehnt. Etwa 150.000 weitere Personen sind an Colitis ulcerosa erkrankt.(3) Die Prävalenz von CED wird ebenfalls weiter ansteigen, da die Erkrankten unter erfolgreicher Therapie eine normale Lebenserwartung aufweisen.(4) Global betrachtet steigen die Inzidenzen für CED vor allem in Ländern, die sich einen westlichen Lebensstil aneignen, wie beispielsweise China und Indien.(5) Dies lässt auf einen Einfluss von Umweltfaktoren schließen. Zwillingsstudien konnten jedoch auch genetische Faktoren als begünstigend für die Entwicklung einer CED identifizieren, insbesondere bei Morbus Crohn.(5) Dies deutet auf eine multifaktorielle Ätiologie hin.

Aufgrund dieser weiterhin ungeklärten Ursache der Erkrankungen sind die Therapiemöglichkeiten eingeschränkt. Bestehende Therapieansätze zielen auf die Behandlung der Symptomatik ab. Die einzige vorhandene kurative Therapieoption gibt es für Colitis ulcerosa durch eine Proktokolektomie.(3) Spezifische Keime als Verursacher konnten bislang nicht identifiziert werden, die Hinweise auf eine Störung der Gesamtheit des Mikrobioms in Form einer Dysbiose des Darms steigen jedoch an.(6) Couturier-Maillard et al. konnten 2013 eine Übertragbarkeit von Colitis und Colitis-assoziierte Karzinomen im Mausmodell mittels Mikrobiomtransplantation zeigen.(7) Die Erforschung des Mikrobioms gewinnt seit Jahren zunehmend an Interesse.(8)

Das Mikrobiom des Darms ist wesentlich an der Entwicklung und Reifung der Kapillargefäße des Dünndarms beteiligt.(9) Die Signalwege, die diese Angiogenese beeinflussen, sind weitgehend ungeklärt.(10) In Vorarbeiten identifizierte das Labor von Dr. Reinhardt den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) als Mustererkennungsrezeptor, der die Bildung von Kapillaren in der Dünndarmschleimhaut unterstützt.(11) CED stehen ebenfalls im Zusammenhang mit einer gesteigerten Vaskularisierung des Dünndarms.(12) Veränderungen in Form von pathologischer Angiogenese und

Dysbiosen sind auch in Darmmalignomen nachgewiesen worden.(13,14) Ebenso steigern CED die Wahrscheinlichkeit, an kolorektalen Malignomen zu erkranken.(15)

Die Reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) haben eine etablierte Rolle beim Schutz vor gastrointestinalen bakteriellen Infektionen.(16,17) Insbesondere Duale Oxidase-2 (DUOX2) ist wesentlich für die Produktion von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Dünn- und Dickdarm verantwortlich.(18) Es gehört zu den Genen, die nach der Kolonisation von keimfreien Mäusen mit einer Darmmikrobiota auf mRNA-Ebene am stärksten hochreguliert werden.(20) Genetische Mutationen von *Duox2* wurden ebenfalls bei früh einsetzenden Formen von CED nachgewiesen.(20) Obwohl Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) die *Duox2*-Expression in intestinalen Epithelzellen hochreguliert, sind die angeborenen Immunrezeptorsignale, die die vermehrte *Duox2*-Regulation als Reaktion auf die Kolonisation mit einer Darmmikrobiota fördern, unbekannt.(17) Eine Stimulation der Angiogenese durch *Duox2* und weitere Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-(NADPH-)Oxidasen konnte ebenfalls gezeigt werden.(21) Die Hochregulation dieser Gene könnte zur gesteigerten Angiogenese in entzündlichen Prozessen beitragen.

Mit Hilfe der keimfreien Maus-Isolatortechnologie soll die mögliche Beteiligung des TLR4-Signalwegs in der Regulation der DUOX2-Expression untersucht werden. Dies könnte zum besseren Verständnis von entzündlichen und malignen Prozessen des Dünndarms beitragen und neue Ansätze für eine pharmakologische Intervention schaffen.

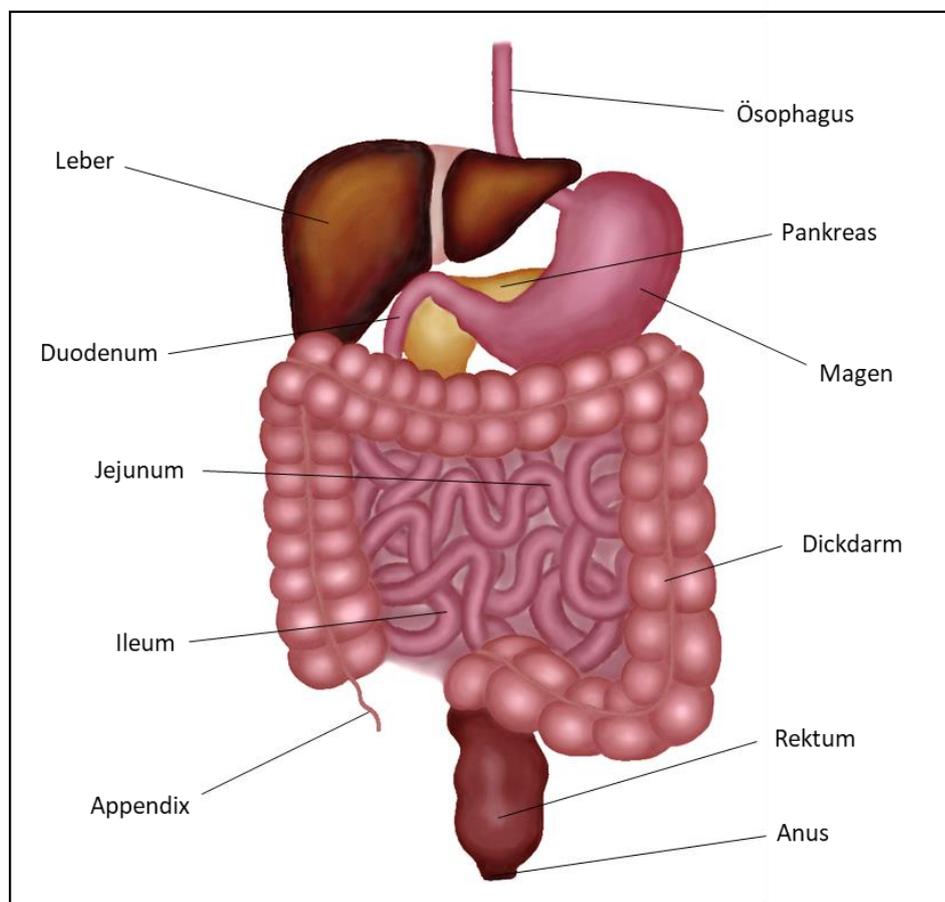
## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Theoretische Grundlagen

„Jede Krankheit beginnt im Darm.“

ist ein Zitat, welches Hippokrates (\*460-†370 v. Chr.) zugeschrieben wird, dem Vater der westlichen Medizin.(22)

#### 2.1.1 Anatomie



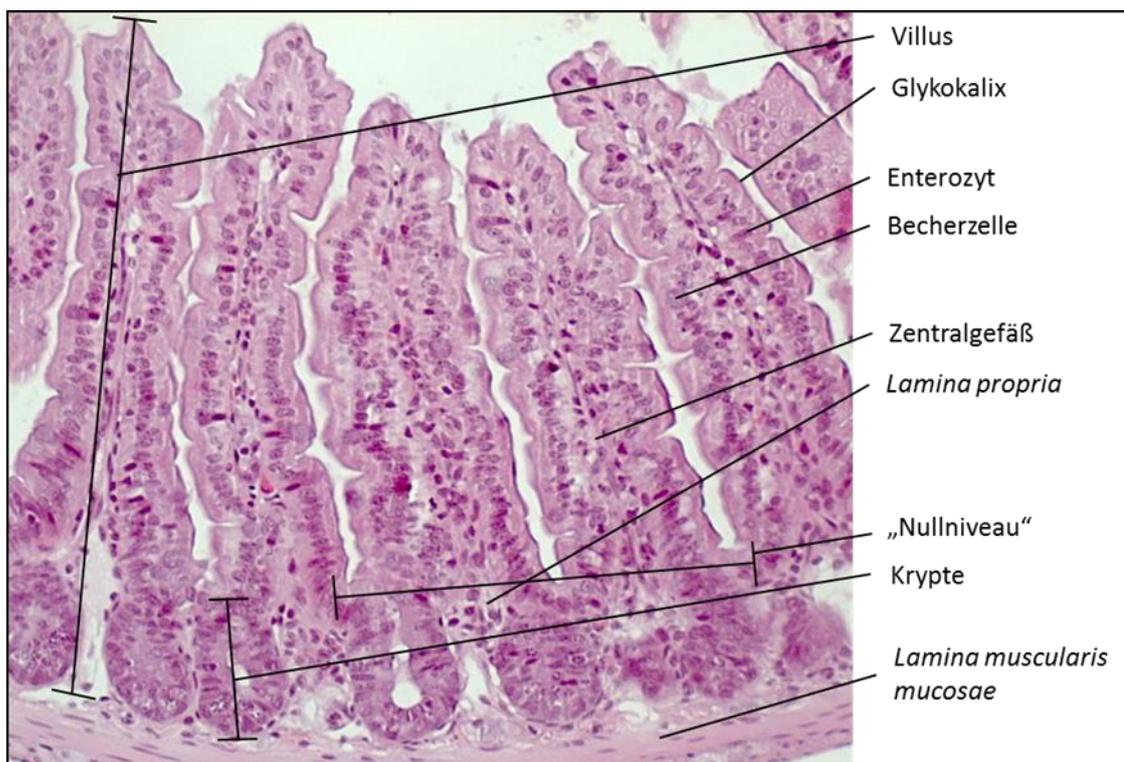
**Abbildung 1: Die Anatomie des menschlichen Verdauungstraktes.** Eigene Darstellung.

Der Gastrointestinaltrakt besteht aus verschiedenen Abschnitten (siehe Abb. 1). Er reicht von der Mundhöhle bis zum Anus. Der menschliche Dünndarm beginnt am *Pylorus* des Magens und reicht auf einer Länge von 4-7 Metern bis zur Bauhin-Klappe (*Valvula ileocaecalis*). Durch hoch spezialisierte Eigenschaften zur Oberflächenvergrößerung beträgt die endgültige Größe seiner lumennahen Fläche

ca. 200 m<sup>2</sup>.(23) Das *Duodenum* ist der erste Abschnitt des Dünndarms und geht in das *Jejunum* über. Den größten Anteil des Dünndarms macht das *Ileum* aus. Dieses mündet in das *Caecum*, den ersten Abschnitt des Dickdarms. Die *Appendix vermiformis* ist dem *Caecum* anhängig. Es folgt das *Colon* mit seinen verschiedenen Abschnitten.(4,24)

Die Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes von *Mus musculus* unterscheidet sich kaum von der des Menschen.(25) Auch die histologische Anatomie ähnelt in ihrer Entwicklung und Aufbau der des menschlichen Dünndarms.(26) Das Mikrobiom zeigt gewisse Gemeinsamkeiten, jedoch auch wesentliche Unterschiede aufgrund verschiedener Stoffwechseleigenarten und Ernährungsbedürfnisse.(27) Mäuse stellen durch die Möglichkeiten der gnotobiotischen Tierhaltung und von Mikrobiomtransplantationen via Faeces von Mensch auf Maus ein effektives Forschungsmodell dar.(28)

### 2.1.2 Histologie



**Abbildung 2: Histologisches Bild des Dünndarms einer Maus.** HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Konventionell-aufgezogener Wildtyp, distales Segment. Eigene Darstellung.

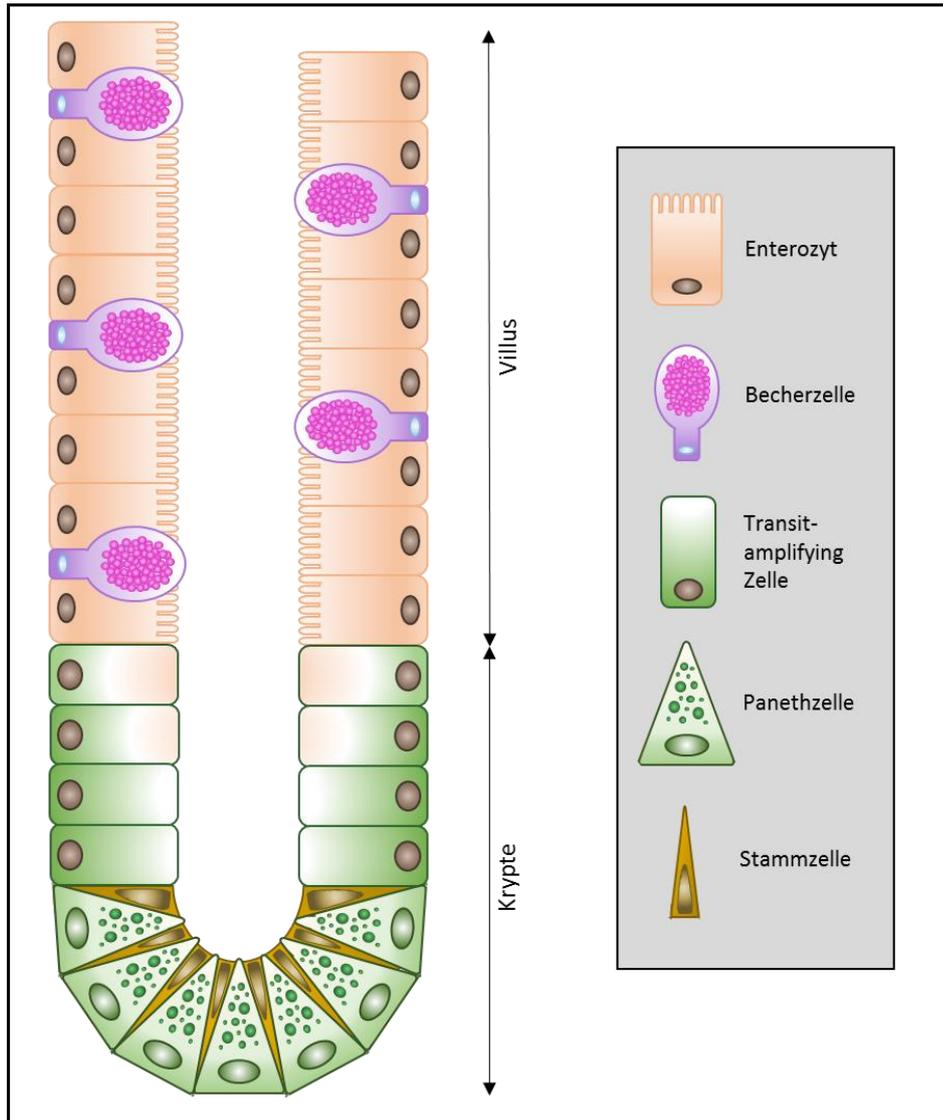
Die Dünndarmwand setzt sich histologisch aus vier Schichten zusammen. Die äußerste Schicht (lumenfern) stellt die *Tunica serosa* dar. Sie ist vom Peritonealepithel bedeckt. Darauf folgt die *Tunica muscularis*, welche aus zwei orthogonal zueinander verlaufenden Muskelschichten besteht. Sie enthält außerdem den Auerbach-Plexus, welcher Teil des enterischen Nervensystems (ENS) ist. In der *Tela submucosa* findet man einen weiteren Teil des ENS, den Meissnerschen Plexus (*Plexus submucosus*). Gemeinsam sind sie verantwortlich für die Darmmotilität. Beeinflusst wird das ENS durch Sympathikus und Parasympathikus, um die Motilität und Sekretion zu steigern (Sympathikus) oder zu hemmen (Parasympathikus). Zudem befinden sich in der *Tela submucosa* Blut- und Lymphgefäße, welche wichtig für den Transport von Nährstoffen aus der Nahrung sind. Die *Tela submucosa* bildet gemeinsam mit der *Tunica mucosa* die sogenannten „Kerckring-Falten“. Diese lassen den Dünndarm makroskopisch gefaltet erscheinen. Diese Faltung ist nach aboral abnehmend. Die *Tunica mucosa* ist die Barriere zum Darmlumen. Basal wird sie durch die *Lamina muscularis mucosae*, eine Schicht glatter Muskulatur, abgegrenzt. Die *Tunica mucosa* bildet das typische histologische Bild des Dünndarms: die Formierung in Zotten und Krypten (siehe Abb. 2). Diese bestehen aus der bindegewebigen *Lamina propria* und dem Epithel des Darms, der *Lamina epithelialis*. Zotten, auch *Villi intestinales* genannt, sind ein wichtiges histologisches Merkmal des Dünndarms. Krypten hingegen finden sich sowohl in Dünn-, als auch im Dickdarm. Im Dünndarm werden sie nach ihrem Entdecker als „Lieberkühn-Krypten“ bezeichnet. Das Niveau, von dem aus sich die Krypten in die *Lamina propria* einstülpen und die Zotten herauswachsen, wird auch Nullniveau genannt. Zentral in jeder Villusstruktur innerhalb der *Lamina propria* finden sich Blut- und Lymphgefäße. Diese sind die zu- und abführenden Transportwege zu den größeren Gefäßen der *Tela submucosa*. Zudem finden sich in der *Lamina propria* viele Zellen des Immunsystems, unter anderem Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten. Sie bilden eine erste immunologische Barriere gegen eindringende Pathogene.

Die *Lamina epithelialis* besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel, in welchem sich sechs bedeutende Zelltypen unterscheiden lassen: Enterozyten, Becherzellen, Enteroendokrine Zellen, Tuftzellen, M-Zellen und Paneth-Körnerzellen.(29) Den größten Anteil stellen die Enterozyten dar. Diese sind spezialisiert auf die Absorption von Nährstoffen und Wasser. Zu diesem Zweck besitzen sie apikal eine Oberflächenvergrößerung in Form von Mikrovilli. Diese werden

in ihrer Gesamtheit auch als „Bürstensaum“ bezeichnet. Ihm aufliegend ist die Glykokalix, eine Schicht aus Polysacchariden. Diese dient dem Epithel als Schutz vor Bakterien und den körpereigenen Enzymen, und unterstützt zugleich die Resorption von Nährstoffen. Außerdem stellen die Enterozyten durch ihre große Anzahl die Hauptbarriere zwischen dem Darmlumen mit seinem Inhalt und dem Körperinneren dar. Diese Barrierefunktion wird durch Vernetzung der einzelnen Zellen untereinander gewährleistet, die *Tight junctions* oder *Zona occludens* genannt werden. Sie bestehen aus verschiedenen Transmembranproteinen, unter anderem Claudinen und Occludin. Insgesamt stellt die *Lamina epithelialis* also eine selektiv-permeable Diffusionsbarriere dar.(30)

Becherzellen sind schleimsezernierende Zellen. Der durch sie hergestellte Mucus bildet eine Schutzschicht für die *Lamina epithelialis*. Sie sind zwischen den Enterozyten zu finden und ihre Anzahl steigt zum *Canalis analis* hin deutlich an. Ebenso steigt die Bakteriendichte in dieser Richtung. Zudem wurden bei histologischen Untersuchungen an keimfreien Mäusen verschmälerte Becherzellen in niedrigerer Anzahl gefunden. Dies weist auf eine Beteiligung des Mikrobioms an der Bildung und Reifung von Becherzellen hin.(31) Becherzellen und Enteroendokrine Zellen sind Schleim- und Hormon-sezernierende Zellen. Weitere Zelltypen sind Tuftzellen, welche vermutlich eine chemosensorische Aufgabe haben, und M-Zellen, welche Bestandteil des Immunsystems sind.(29) Die Paneth-Körnerzellen befinden sich in räumlicher Nähe zu den Stammzellen, am Boden der Krypten, in der Stammzellnische.

### 2.1.3 Stammzellnische



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stammzellnische.** Eigene Darstellung.

In der Basis der Krypten findet man die sogenannte Stammzellnische (siehe Abb. 3). Die Regulation der Erneuerung des Darmepithels wird von hier gesteuert. Einer dieser Stammzelltypen sind *crypt base columnar (CBC)* Zellen. Diese findet man ausschließlich in der Nachbarschaft zu Panethzellen. Durch eine radioaktive Markierung dieser Stammzellen konnte nachgewiesen werden, dass alle vier der im Darm am häufigsten aufzufindenden Zelltypen aus diesen Stammzellen hervorgehen. Dies zeigt zudem auch, dass die vollständige Erneuerung des Epithels der Krypten und Zotten aus der Tiefe der Krypten heraus geschieht. Die Zellen reifen auf dem Weg zur Spitze der Zotten. Im Folgenden entwickelt sich ein Kompartiment stark proliferierender Zellen, der Transit-amplifying Zellen. Deren weitere

Ausdifferenzierung beginnt, sobald der direkte Kontakt zu den Panethzellen verloren geht.(29)

Die Erneuerung des Epithels wird über verschiedene Signalwege gesteuert. Einen wesentlichen stellt der Wnt-Signalweg dar. Das Wnt-Signalprotein bindet zunächst an den Rezeptorkomplex *Frizzled/low-density-lipoprotein-related protein* (LRP). Durch diesen wird ein weiteres Protein, *Dishevelled*, aktiviert. Dieses hat eine direkte inhibierende Wirkung auf den Proteinkomplex, der für den Abbau des  $\beta$ -Catenins zuständig ist. Entfällt dieser Abbau von  $\beta$ -Catenin, sammelt sich dieses im Zellkern an, bindet an den Proteinkomplex aus *T-cell factor* (TCF) und *Lymphoid enhancer-binding factor* (LEF), und aktiviert die Transkription von bestimmten Zielgenen. Diese führen zu einem veränderten Zellverhalten in Bezug auf Apoptose, Proliferation und Differenzierung.(32) Weitere relevante Signalwege für korrekte Entwicklung und Erhaltung der Stammzellnische und der Villus-Struktur sind der Hedgehog-(Hh-) und der Bone morphogenetic-(BMP-)Signalweg.(33,34)

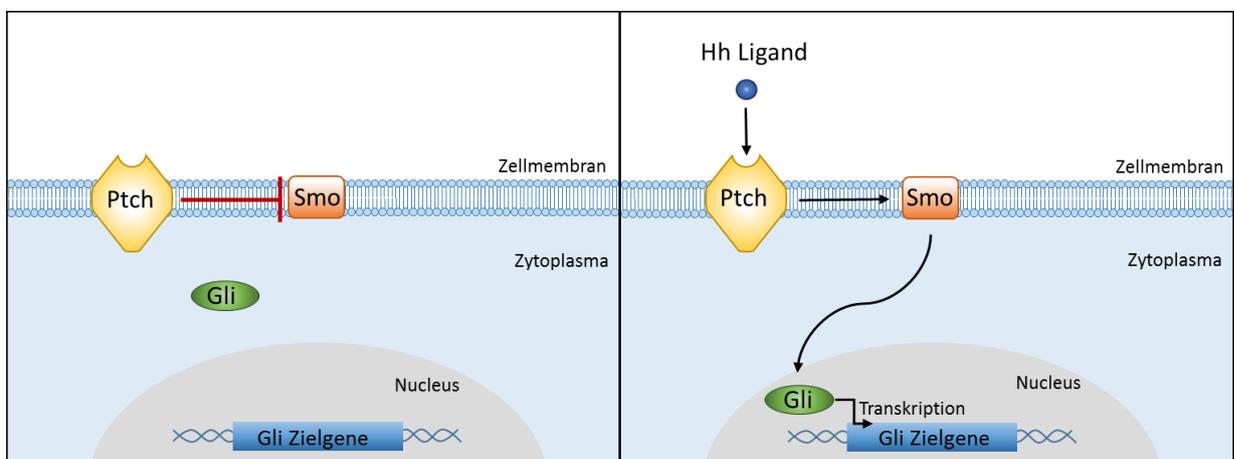
#### **2.1.4 Der Hedgehog-Signalweg**

Der Hh-Signalweg wurde zuerst in der Gattung *Drosophila melanogaster* beschrieben. Hier kontrolliert er die korrekte Flügel- und Segmentbildung. Bei Wirbeltieren ist er beteiligt an der Bildung der Gliedmaßen und der Rechts-Links-Asymmetrie. Der Ligand des Signalweges ist das Signalprotein Hedgehog. Es sind aktuell drei paraloge Formen im Säugetier bekannt: *Sonic*, *Indian* und *Desert Hedgehog* (Shh, Ihh, Dhh).

Hedgehog wird als 45 kDa großes Vorläufermolekül synthetisiert, welches autoproteolytisch gespalten und posttranslational lipid-modifiziert wird. Die Spaltung führt zu einem 26 kDa großen Fragment und dem aktiven, 19 kDa großen Fragment. Dieses bindet an den Rezeptor *Patched* (Ptch) (siehe Abb. 4). Durch die Bindung ändert sich die Konformation von Ptch und die vermittelte Inhibition des Transmembranrezeptors *Smoothed* (Smo) wird aufgehoben. Smo aktiviert nun den Signalweg durch das Prozessieren von Glioblastoma Proteinen 1 und 2 (Gli1, Gli2), welche in den Zellkern diffundieren und die Transkription ihrer Zielgene starten.(35) Diese Zielgene steuern sowohl im Sinne einer Feedback-Schleife die Expression von Proteinen für den Signalweg selbst (Gli1, Ptch1) als auch Proteine, welche für die Zelldifferenzierung und Apoptose zuständig sind (*B-cell lymphoma 2*, *Bcl-2*; *Hedgehog interacting protein*, *Hip*). (36) Der Hh-Signalweg findet im adulten Dünndarm

ausschließlich parakrin statt, das Epithel sendet Signale an das darunter befindliche Mesenchym.(35)

Der Hh-Signalweg ist beteiligt an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, unter anderem ist er mitentscheidend für den Aufbau des Darmepithels. Er reguliert sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch im adulten Körper Vorgänge der Zellproliferation, Differenzierung und Erneuerung.(37) Die Expression von Ihh ist entscheidend für die Erneuerung des Dünndarmepithels.(38) Bei Ihh-defizienten Mausembryonen wurden wesentliche strukturelle Unterschiede zu gesunden Mäusen gefunden. Die Darmwand dieser Mäuse besteht nicht aus einer einfachen Schicht Zellen, sondern einem mehrschichtigen Gebilde, welches zudem keinerlei Krypten aufweist. Ihh wird von ausdifferenzierten Enterozyten produziert und reguliert zugleich die Reifung neuer Enterozyten aus der Basis der Krypten.(39) Es findet sich ein Konzentrationsgradient in den Villusstrukturen. Die höchste Konzentration von Ihh findet sich im Bereich der Krypten am Übergang zum Villus, die geringste an den Spitzen der Villusstrukturen.(37) Die Expression von BMP2 und BMP4 durch Epithelzellen (BMP2) und Mesenchymzellen (BMP4) entlang des Villus wird zudem direkt durch das Hedgehog Protein gesteuert.(34,40) Die Expression dieser Proteine ist ebenfalls entscheidend für die regelgerechte Bildung der Villusstrukturen.(41)



**Abbildung 4: Hedgehog-Signalweg.** Links wird die Inhibition von Smo durch Ptch dargestellt. Es kommt zu keiner Transkription von Gli. Rechts ist abgebildet, wie durch die Bindung des Hh-Liganden an Ptch die Inhibition von Smo entfällt. Es kommt zu einer Transkription der Gli-Zielgene. Eigene Darstellung.

## 2.2 Immunsystem

Das menschliche Immunsystem setzt sich aus einer angeborenen, unspezifischen und einer erworbenen, spezifischen Immunabwehr zusammen. Den zellulären Anteil der spezifischen Immunabwehr stellen B- und T-Lymphozyten dar. T-Lymphozyten lassen sich in T-Helferzellen, T-Gedächtniszellen und zytotoxische T-Zellen unterscheiden. B-Lymphozyten sind B-Gedächtniszellen und Plasmazellen. Der humorale Anteil sind die Antikörper, welche von den B-Lymphozyten produziert werden. Das erworbene Immunsystem reagiert mit seinen Antikörpern auf körperfremde Antigene. Da jeder Antikörper spezifisch für ein bestimmtes Antigen ist, wird es als spezifisches Immunsystem bezeichnet. Durch Bildung von Gedächtniszellen kann der Körper auch noch Jahre nach dem erstmaligen Erkennen eines fremden Antigens spezifisch und schneller auf dieses reagieren. Die Differenzierung in körpereigenes und -fremdes Material erfolgt durch die Haupthistokompatibilitätskomplexe I und II (MHC I, MHC II). Das Fehlen dieser Komplexe oder eine veränderte Struktur wird von verschiedenen zellulären Anteilen des Immunsystems erkannt, sodass diese Zelle zerstört werden kann. Den zellulären Anteil der unspezifischen Immunabwehr stellen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen und Natürliche Killerzellen dar. Der humorale Anteil besteht aus dem Komplementsystem und Zytokinen.

### 2.2.1 Toll-like Rezeptoren

Wichtig für die unspezifische Abwehr von Krankheitserregern sind die *Pattern Recognition Receptors* (PRR, Mustererkennungsrezeptoren). Diese sind in der Lage körperfremde Bestandteile anhand ihrer Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP) zu erkennen. Die PAMPs sind pathogenspezifische Muster, deren Struktur nahezu unveränderlich ist. Sie kommen im Menschen und anderen Säugetieren nicht vor. Die PRRs sitzen häufig ortsgebunden an vielen körpereigenen Zellen, können jedoch auch frei löslich im Blutkreislauf zirkulieren. Ein Beispiel für einen löslichen PRR ist das im Plasma zirkulierende Mannose-bindende Lektin. Die ortständigen PRRs kommen intrazellulär oder auf Zelloberflächen vor. Intrazellulär kommen zum Beispiel die RIG-I-ähnlichen Proteine (RLR) im Cytoplasma vor. Wenn ein Pathogen erkannt wurde, können die zellulären Anteile der unspezifischen Immunabwehr sofort darauf reagieren.

Eine große Rolle spielen dabei die Toll-like Rezeptoren. Es sind zehn humane Formen des Toll-like Rezeptors bekannt, welche unter anderem Proteine, Lipide, Kohlehydrate

und Nukleinsäuren fremder Spezies erkennen.(42) Die Familie der TLR wurden zunächst in der Spezies *Drosophila melanogaster* entdeckt. Zunächst enthüllte man ihre entscheidende Rolle bei der Bildung der dorsoventralen Symmetrie in der Embryogenese.(43) Die Expression von TLR ist ein dynamischer Prozess, mit welchem der Körper auf wechselnde Situationen beispielsweise das Eindringen von Pathogenen reagieren kann. Die ausgelöste Immunantwort wird von der Art des Pathogens und der Art des TLR sowie seiner Lokalisation beeinflusst, und aktiviert unterschiedliche Signaltransduktionswege.

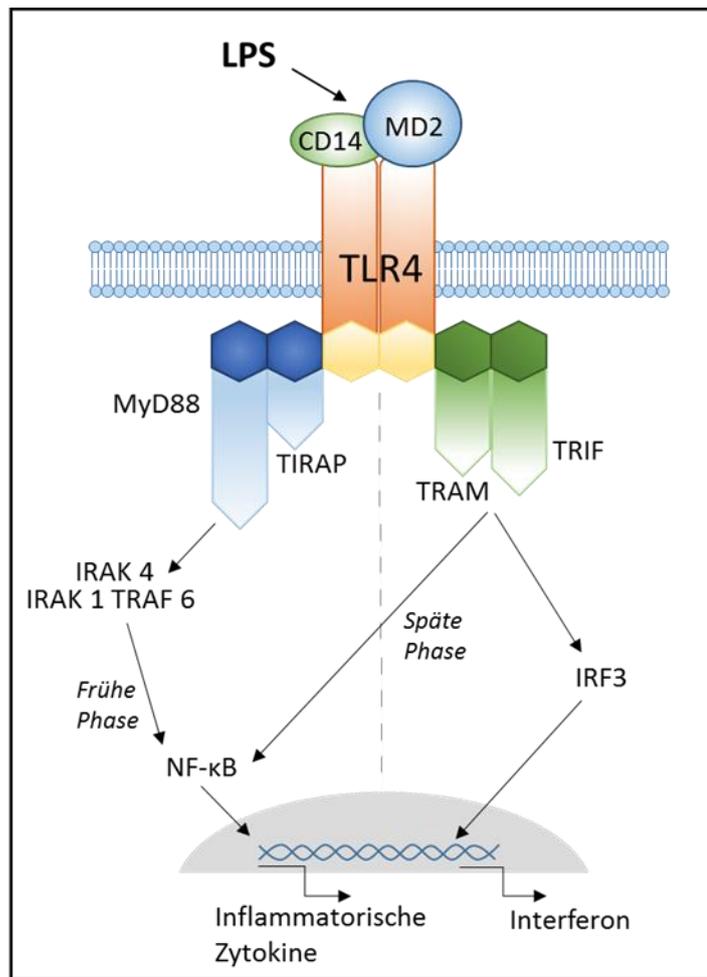
Der Toll-like Rezeptor 4 ist ein Transmembranrezeptor, welcher verschiedene Substanzen erkennt (siehe Tabelle 1). Hervorzuheben sind die Lipopolysaccharide (LPS), welche in der Außenmembran gramnegativer Bakterien vorkommen und den wesentlichen Liganden für TLR4 darstellen.

**Tabelle 1: Bekannte Liganden von TLR4.**

Lipopolysaccharide	Gram-negative Bakterien
Taxol	Pflanzen
Fusionsprotein	Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus
<i>Envelope protein</i>	<i>Mouse mammary-tumour virus</i>
Hitzeschock-Protein 60*	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Hitzeschock-Protein 70*	Wirt
<i>Type III repeat extra domain A of fibronectin*</i>	Wirt
<i>Oligosaccharides of hyaluronic acid*</i>	Wirt
<i>Polysaccharide fragments of heparan sulphate*</i>	Wirt
Fibrinogen*	Wirt

Aufgrund der Versuchsbedingungen ist nicht auszuschließen, dass bei mit \* gekennzeichneten Substanzen eine Kontamination mit LPS stattgefunden hat. Verändert übernommen nach Akira et al.(43)

Zur Detektion von LPS durch TLR4 ist die Bildung eines Komplexes notwendig. Entscheidend hierfür ist das Vorliegen von CD14 und MD-2. LPS bindet durch das im Serum vorliegende LPS-bindende Protein (LPB) an CD14. Das Protein MD-2 kann an den extrazellulären Teil von TLR4 binden und vermittelt die Bindung zwischen CD14 und TLR4.(42) Folgend nutzt TLR4 zwei relevante, intrazelluläre Signalwege, den *Myeloid differentiation primary response gene 88*-(MyD88-)abhängigen und den MyD88-unabhängigen Signalweg (siehe Abb. 5).



**Abbildung 5: Downstream Signalwege von TLR4.** In der linken Bildseite wird der MyD88-abhängige Signalweg über Frühe Phase NF-κB-Aktivierung und der Produktion inflammatorischer Zytokine dargestellt. Auf der rechten Bildseite ist die Aktivierung über TRIF/TRAM mit der Produktion von Interferon und Späte Phase NF-κB-Aktivierung dargestellt. Eigene Darstellung.

### 2.2.2 MyD88-abhängiger Signalweg

Das Adapterprotein MyD88 hat eine N-terminale „Todesdomäne“ und eine C-terminale TIR-Domäne. Diese kann mit der TIR-Domäne von TLR4 in Kontakt treten. Die folgende Aktivierung der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase 4 (IRAK 4) geschieht über die N-terminale Domäne von MyD88. Dies führt zur Phosphorylierung von IRAK1 und einer Komplexbildung von IRAK 1 und IRAK 4 mit TRAF 6 (Tumor Nekrose Faktor assoziierter Faktor 6). Im Folgenden werden unterschiedliche Komplexe gebildet. Diese stimulieren den in den Zellen ruhenden Transkriptionsfaktor *Nuclear factor, kappa light chain enhancer' of activated B-Cells* (NF-κB), welcher nun in den Zellkern wandert. Hier führt er zur Transkription inflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF-α und Interleukin-6 (IL-6). (42–44)

### 2.2.3 MyD88-unabhängiger Signalweg

Über die Adapterproteine TRIF und TRAM erfolgt eine Aktivierung von *Interferon regulatory factor 3* (IRF3). Diese führt zur Produktion von Interferon Typ I, welcher ein wichtiger Regulator des Immunsystems ist. Zugleich werden jedoch Signale weitergeleitet, welche zur verzögerten Aktivierung von NF-κB führen.(45)

Zusammengefasst stimuliert TLR4 entzündliche Prozesse.(46) Kommt es zu einer dauerhaften Stimulation durch TLR4, können chronische Entzündungen ausgelöst werden.(47)

## 2.3 Mikrobiota

Der Mensch teilt sich seinen Körper mit einer Vielzahl von weiteren Spezies. Dazu zählen Bakterien, Viren, Eukaryoten und Archaeen. Ein relativ neuer Blickwinkel ist daher die Betrachtung des Menschen als „Metaorganismus“. Dieses Konzept stellt Organismen artenübergreifend als multiorganismische Einheit mit ihrem Mikrobiom dar.(48)

Die Bakterien sind den anderen Spezies unserer Mikrobiota zahlenmäßig weit überlegen und gelten daher als bislang wichtigster Vertreter im menschlichen Darmmikrobiom.(49) In der Zukunft könnte diese Annahme jedoch widerlegt werden, da unsere aktuell verfügbaren Techniken zur Detektion von Bakterien denen anderer Spezies weit voraus sind.

Die seit langem verbreitete Annahme, dass die Anzahl der im Menschen beherbergten Bakterien die der körpereigenen Zellen um ein Zehnfaches übersteige, wurde 2016 durch neuere Berechnungen widerlegt. Diesen Berechnungen zufolge liegen die Werte ungefähr bei einem Verhältnis von 1:1 von Bakterien zu Körperzellen bei einem durchschnittlichen Mann.(50) Die Kombination aus Anzahl und Artenvielfalt führt zu der Annahme, dass das Mikrobiom etwa die 500-fache Anzahl von Genen kodiert als das menschliche Genom alleine.(51) Bislang können nur Vermutungen angestellt werden, wie weit der Einfluss dieser an Gene im menschlichen Körper reicht. Einflüsse auf Entwicklung, Erkrankungen und das Gehirn werden vermutet.(51,52)

### 2.3.1 Aufbau und Funktion des Mikrobioms

Die höchsten Bakterienkonzentrationen des Körpers finden sich im *Colon* und in dentaler Plaque, wobei das Volumen des Mikrobioms im *Colon* um ein Vielfaches höher ist.(50) Den größten Ort der Besiedlung stellt somit der Darm dar. Das Gesamtgewicht des Darmmikrobioms wird auf etwa 2 kg geschätzt.(53) Die Bakterien helfen die Nahrung zu verwerten und unterstützen so unter anderem die Gewinnung von lebenswichtigen Vitaminen und Fettsäuren. Manche dieser Nährstoffe würden dem Körper ohne die vorherige Verwertung durch die Bakterien nicht zur Verfügung stehen. So können bestimmte Polysaccharide nur durch das intestinale Mikrobiom gespalten und anschließend durch den Wirt resorbiert werden.(54)

Die wesentlichen bakteriellen Vertreter der menschlichen Darmflora sind vier Stämmen zuzuordnen: Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria und Firmicutes.(55) Die Artenvielfalt in der physiologischen Darmflora wird auf durchschnittlich 160 Arten in jedem Individuum und einer Gesamtzahl von ca. 1000-1150 identifizierten Arten geschätzt.(56) Der Darm zeigt einen Gradienten für die bakterielle Besiedlung, mit einem Anstieg in Richtung *Colon*.(57) Der Einfluss des oralen Mikrobioms auf das Mikrobiom des Dünndarms kann bislang nur vermutet werden. Eine Literaturanalyse durch Maki et al. 2020 konnte Hinweise auf diesen Einfluss zeigen. Im Vergleich zeigt sich das Mikrobiom der Mundhöhle mit größerer Artenvielfalt und Dynamik.(58)

Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass das menschliche Mikrobiom vermutlich ursprünglich noch wesentlich artenreicher war. Proben eines bislang isoliert lebenden Stammes von Ureinwohnern im Amazonasdschungel weisen deutlich mehr Spezies auf als die Vergleichsproben von US-Amerikanern.(59) Wesentliche Einflüsse auf die Zusammensetzung des Mikrobioms stellen z.B. Ernährung, Lebensumfeld, Hygienepraktiken und Medikationen, insbesondere Antibiotikatherapien dar.(55,57,59–61) Wesentlicher als die Unterscheidung in Arten, ist für unseren Körper die Entscheidung, ob die Bakterien pathogen oder apathogen sind, also der kommensalen Flora, angehören. Um beispielsweise von den Nährstoff-verwertenden Bakterien zu profitieren, muss der Körper Apathogene tolerieren und zugleich die Vermehrung von Pathogenen unterbinden.

### **2.3.2 Mikrobiom und Krankheit**

Die Komplexität des Ökosystems unseres Körpers zu verstehen, stellt die Wissenschaft vor eine große Herausforderung. Hypothesen, welche verschiedene Krankheitsbilder mit einer Dysbalance des Mikrobioms, beispielsweise auf der Haut oder im Darm, in Verbindung brachten, konnten inzwischen bewiesen werden. Viele der in Industrienationen mit steigenden Inzidenzen auftretenden Krankheiten, wie z.B. Adipositas, Asthma, Diabetes und Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, sind mit einem gestörten Mikrobiom, einer Dysbiose, assoziiert.(6,60–62) Bei der Erforschung von Malignomen, unter anderem Darmkrebs, Lungenkrebs und Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, wurden deutliche Veränderungen des Mikrobioms gefunden.(14,22,63,64) Auch wenn Zusammenhänge klar nachweisbar sind, bleiben die zu Grunde liegenden Prozesse mehrheitlich noch unverstanden. Eine der bedeutendsten Fragen bleibt bislang häufig unbeantwortet: Führt das gestörte Mikrobiom zur Krankheit, oder stört die Krankheit das physiologische Mikrobiom?(60) Beispielsweise konnte im Speichel von Rauchern eine Veränderung durch Selektionsdruck des Mikrobioms nachgewiesen werden, welche vermutlich begünstigend auf die Entstehung von Parodontitis wirkt.(65) Eine veränderte Flora der Mundhöhle durch entzündliche Prozesse scheint wiederum zu einer gestörten Flora des Darms beizutragen und bestehende CED zu verschlechtern.(66) Durch die Analyse des individuellen Mikrobioms mittels Metagenomik können zukünftig Therapien für Krankheiten, die auf einem gestörten Mikrobiom beruhen, möglicherweise maßgeschneidert entwickelt werden. Auch eine verbesserte Prognose durch frühere Diagnosen ist im Bereich des Möglichen.(49)

### **2.3.3 Reaktive Sauerstoffspezies**

Im Falle einer übermäßigen Vermehrung von Pathogenen in unserem Körper gibt es verschiedene antimikrobielle Abwehrmechanismen. Eine der ersten Barrieren des angeborenen Immunsystems stellen die ROS dar.(18) Hierbei handelt es sich um Sauerstoffradikale, wie z.B.  $H_2O_2$ , Hyperoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) oder Ozon ( $O_3$ ). Diese unspezifische Pathogen-Abwehr hat für den Körper jedoch nicht nur positive Aspekte. Eine übermäßige Ausschüttung führt zu oxidativem Stress. Dieser schädigt die Zellen in der Umgebung und steht im Verdacht, begünstigend auf viele Krankheiten, unter anderem Malignome, zu wirken (siehe Tabelle 2).(19,67) Der Zusammenhang zwischen entzündlichen Prozessen und Krebs wurde bereits durch

Rudolf Virchow (\*1821-†1902) beschrieben, nachdem er Leukozyten in Tumorgewebe isolieren konnte.(68)

**Tabelle 2: Malignome und ihre Assoziation mit einem entzündlichen Stimulus.**

Ort des Malignoms	Entzündlicher Stimulus
Blase	Schistosomiasis
Zervix, Rachen, Penis, Vulva, Anus	Humane Papillomaviren
Magen	<i>H. pylori</i> -induzierte Gastritis
Oesophagus	Reflux-induzierter Barrett-Oesophagus
Colorectal	CED
Leber	Hepatitis B und C

Übersichtstabelle von Organen mit Malignomen, welche durch einen entzündlichen Stimulus ausgelöst werden können. Tabelle verändert nach Balkwill et al. 2001.(68)

Steigende ROS Werte führen ebenfalls zu einer gesteigerten Angiogenese, welche in Wechselwirkung mit entzündlichen Prozessen und kanzerösen Geschehen steht.(12,69) Es konnten erhöhte Werte von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und weitere proangiogene Faktoren nachgewiesen werden, die die Gefäßneubildung stimulieren.(67) Unter anderem beeinflussen ROS als Botenstoffe die Angiogenese der Wundheilung.(70)

### 2.3.4 NADPH-Oxidasen

ROS werden hauptsächlich von der Familie der NADPH-Oxidasen produziert, entstehen jedoch auch als ein Nebenprodukt der Zellatmung der Mitochondrien. Im Moment gibt es sieben bekannte Unterformen (siehe Tabelle 3). Die produzierten Enzyme sind relevant für viele verschiedene Organe, so zum Beispiel das Gehirn, Pankreas, Nieren, die Phagozyten der Immunabwehr und die Schilddrüse.(71) Unter anderem in den Thyreozyten der Schilddrüse findet sich die Unterform DUOX2.(72) Diese stellt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bereit, welches von der Thyreoperoxidase bei Synthese der Schilddrüsenhormone verstoffwechselt wird (siehe Abb. 6).(73) Zur vollständigen Funktion von DUOX2 wird *Dual oxidase maturation factor 2* (DUOXA2) als Reifungsfaktor benötigt. Gemeinsam bilden sie einen membranständigen Komplex, welcher, initiiert durch Calcium (Ca<sup>2+</sup>), O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umwandelt.(74)

**Tabelle 3: NADPH-Oxidasen und ihre Lokalisationen.**

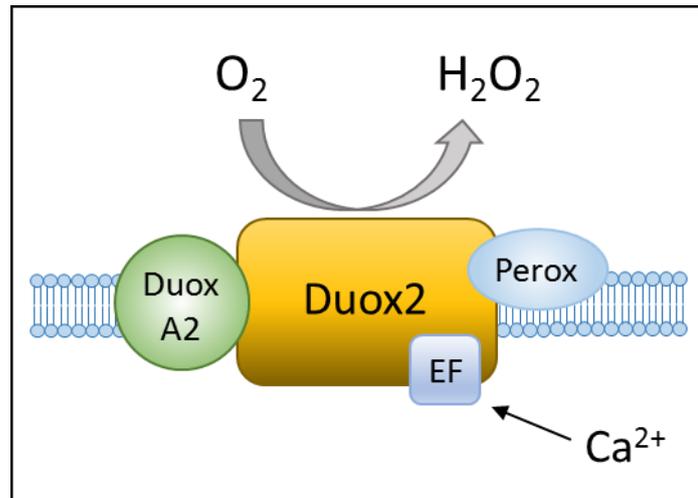
<b>NADPH-Oxidase</b>	<b>Lokalisation</b>
NOX1	<i>Colon</i>
NOX2	Phagozyten
NOX3	Innenohr
NOX4	Nieren
NOX5	Hoden
DUOX1	Schilddrüse, Epithelzellen des Respirationstrakts
DUOX2	Schilddrüse, Speicheldrüsen, Magen, Dünndarm, Dickdarm(73)

Aufgeführt sind die bekannten sieben Unterformen der NADPH-Oxidasen und ihre Lokalisationen im Körper. Verändert übernommen nach Sirokmány et al.(71)

DUOX2 konnte auf der gesamten Länge des menschlichen Darms nachgewiesen werden.(75) Das hier produzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist essenziell für die Abwehr von Pathogenen. So konnte z.B. anhand von Knock-out-Mäusen ohne *Duox1* und *Duox2* dessen protektive Funktion gegenüber einer Besiedlung des Magens mit *Helicobacter felis* gezeigt werden.(16) Die Signalwege im Zusammenhang mit *Duox2* in Säugetieren außerhalb der Schilddrüse sind bislang größtenteils unverstanden. Ein kürzlich entdeckter Signalweg beschreibt die Aktivierung von *Duox2* durch Mikrobiota im Darm. Im Dünndarm wird das Signal vermutlich durch einen bislang unbekanntem Rezeptor über TRIF und p50/p65 geleitet, und führt so zu einer gesteigerten Expression. Im *Colon* wird das Signal über TLR3 und TLR4 und p38/Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) weitergeleitet und führt, über den Zwischenschritt eines unbekanntem Proteins, auch hier zu einer gesteigerten Expression.(18) Burgueño et al. zeigten, dass das *Duox2* Signal im Dünndarm von *Tlr4* abhängig ist. Sowohl in Patienten mit CED, als auch mit kolorektalen Malignomen wurde eine Hochregulation von *Duox2* und *Tlr4* gefunden.(76)

Die Deletion von *Duox2* führt zu schwerem Hypothyreoidismus, insbesondere, wenn beide Genallele betroffen sind.(75) In einem 2017 veröffentlichten Patientenfall konnte erstmals bei einem Patienten mit sehr früh einsetzender CED eine *Duox2*-Deletion auf beiden Allelen nachgewiesen werden.(20) Möglicherweise kommt es durch die niedrigen ROS-Werte zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp.(77) Zugleich wurden bei Patienten vor Einsetzen eines akuten Entzündungsschubs höhere Werte der DUOX2-Expression gefunden. Diese Hochregulation konnte auch bei vormals keimfreien Mäusen, welche mit einer dysbiotischen menschlichen Flora besiedelt wurden, gezeigt werden.(19) *Duox2* scheint also ein wesentlicher Modulator der

intestinalen Homöostase zu sein und empfindlich auf Änderungen des intestinalen Mikrobioms zu reagieren.



**Abbildung 6: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch DUOX2.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generation aus O<sub>2</sub> durch membranständigen DUOX2/DUOXA2-Komplex. Abbildung modifiziert nach Lambeth et al.(74)

### 2.3.5 Veränderungen am Mikrobiom der Maus

Um die Einflüsse des Mikrobioms auf unseren Körper besser verstehen zu können, muss man Vergleiche zwischen normal aufgewachsenen und keimfreien Organismen anstellen. Diese Überlegung hatte bereits Louis Pasteur (\*1822-†1895), welcher vermutete, dass das Leben unter keimfreien Bedingungen unmöglich sei.(78) In den 1940er Jahren wurden die ersten erfolgreichen Versuche unternommen, keimfreie Versuchstiere zu züchten.(79) Es gibt Tierhaltung, die frei von spezifischen Pathogenen ist (*specific pathogen-free*, SPF), Tiere die durch Antibiotikatherapien einen annähernd keimfreien Status erreichen, und komplett sterile Tiere (*germ-free*, GF). Diese Tierhaltungsformen, bei denen das Mikrobiom des Versuchstieres bekannt ist, werden als Gnotobiotik bezeichnet. Aus der Literatur und durch vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhardt ist bekannt, dass sich die Morphologie des Dünndarms keimfreier Tiere deutlich von der konventionell-aufgewachsener Tiere unterscheidet.(80–82) Keimfreie Tiere zeigen im Gesamtbild bei vergleichbarer Größe einen niedrigeren Körperfettanteil, obwohl sie einen höheren Kalorienverbrauch haben. Der Gastrointestinaltrakt weist wesentliche Veränderungen auf: Während die Leber in der Größe abnimmt, zeigt das *Caecum* eine deutliche Größenzunahme. Histologisch zeigen sich im Darm längere und schmalere Villusstrukturen, eine verschmälerte Lamina propria und verringerte

Vaskularisierung.(10,51,83) Diese durch die Mikrobiota ausgelösten morphologischen Veränderungen, sind zum jetzigen Zeitpunkt unzureichend erforscht.

## **2.4 Vaskularisierung**

Die Bildung von Blutgefäßen spielt eine zentrale Rolle im menschlichen Organismus. Beinahe jedes Gewebe ist auf das Transportmittel Blut angewiesen, um Nährstoffe und Sauerstoff zugeführt zu bekommen und Abfallprodukte abzutransportieren.

Die ersten Vorläufer des Blutkreislaufes beginnen sich im menschlichen Embryo in der dritten Entwicklungswoche zu bilden, ca. am 18. Tag, bei Mäusen an Entwicklungstag 6,5.(84) Endotheliale Vorläuferzellen (Hämangioblasten) sammeln sich, angezogen durch Botenstoffe, wie z.B. VEGF, an bestimmten Punkten. Hier lagern sie sich zusammen und bilden sogenannte „Blutinseln“. Innerhalb dieser Inseln differenzieren sich die Zellen durch verschiedene Wachstumsfaktoren zu Zellen des gefäßbildenden Systems (Angioblasten) und des hämatopoetischen Systems (Hämozytoblasten). Es kommt zur Bildung von randständigen Angioblasten und zentral vorkommenden hämatopoetischen Stammzellen. Die Angioblasten entwickeln sich weiter und werden so zu Endothelzellen. Diese bilden das Grundgerüst des menschlichen Blutkreislaufes. Dieser Prozess wird als Vaskulogenese bezeichnet.(85) Durch Umbau, Rückbau und Verstärkung bestimmter Gefäße, bildet sich ein „reifes“ Gefäßsystem. Die Vaskulogenese stellt im adulten Körper die Ausnahme in der Gefäßbildung dar. Physiologischerweise tritt sie nur bei der Wundheilung, im Menstruationszyklus und bei der Plazentaentwicklung auf. Gleichzeitig spielt die Vaskulogenese jedoch eine zentrale Rolle bei pathologischen Prozessen.(86,87)

### **2.4.1 Angiogenese**

Die Angiogenese beschreibt den im adulten Körper schwerpunktmäßig stattfindenden Prozess der Gefäßneubildung. Hier bilden sich neue Gefäße auf der Grundlage bereits bestehender Gefäße. Es werden verschiedene Formen unterschieden.

Zum einen gibt es das so genannte *sprouting*, das Aussprossen neuer Gefäßarme. Durch die Anlagerung von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren an die Endothelwand kommt es zum „angiogenen Switch“. Durch das Überwiegen von pro-angiogenen Faktoren beginnen die Endothelzellen mit der Produktion von Proteasen.

Diese Proteasen führen zu einer Schwächung und letztlich Perforation der Basalmembran. Dies führt zu einer Endothelzellproliferation und -migration. Die Endothelzellen formieren sich schließlich zu einem neuen Gefäßast. Das Lumen des neuen Gefäßes wird durch verschiedene Unterformen von VEGF in seinem Durchmesser beeinflusst.(86)

Der andere zentrale Prozess wird als intussuszeptive Gefäßneubildung bezeichnet. Hier entstehen zwei Gefäße durch die Teilung eines Ursprungsgefäßes. Es wird ein mehrstufiger Prozess durchlaufen, bei dem es zur Fusion von zwei bereits bestehenden Gefäßwänden kommt. Nach einer Restrukturierung des Endothels bildet sich ein Lumen zwischen den verbundenen Gefäßwänden. Durch Anlagerung von stabilisierenden Zellen (u.a. Perizyten) um die neuen Gefäße wird der Prozess abgeschlossen. Molekularbiologisch ist dieser Prozess noch nicht vollständig verstanden.(86)

Wiederum wird in physiologische und pathologische Angiogenese unterschieden. Die physiologische Angiogenese findet zum Beispiel während der Wundheilung statt. Durch verschiedene Wachstums- und Gewebefaktoren initiiert kommt es lediglich zu geringen Änderungen in der vaskulären Permeabilität. Auch eine Entzündung und proteolytische Prozesse finden nur in geringem Ausmaße statt.(12)

Dem gegenüber steht der Prozess der pathologischen Angiogenese, zum Beispiel im Rahmen einer CED. Die bei chronischen Entzündungsprozessen ausgeschütteten Mediatoren stellen Stimuli für die Angiogenese dar. Durch die Bindung an Gewebsrezeptoren kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade. Diese resultiert in der Dilatation der Gefäße, einer gesteigerten Permeabilität, ausgelöst durch den Endothelwachstumsfaktor A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*, VEGF-A) und der Zerstörung der Basalmembran. Die folgende Endothelzellproliferation und -migration ähnelt der physiologischen Angiogenese. Auch hier spielen MMP, Integrine und weitere Mediatoren eine Rolle beim Umbau der Extrazellulären Matrix. Während dieses Umbaus werden Endothelzellen in die Extrazelluläre Matrix integriert und beginnen mit der Formierung neuer Gefäße. Vollendet wird dieser Prozess durch Anastomosierung mit weiteren Gefäßen und der Anlagerung von glatten Muskelzellen und Perizyten, als stabilisierendes Gerüst.(12) Diese pathologische Angiogenese scheint unter anderem auf fehlender Reifung der entstandenen Gefäße zu beruhen. VEGF-A gilt als wichtigster Faktor der physiologischen und pathologischen

Angiogenese(88). Zwar ist die Konzentration von VEGF unter den Bedingungen einer experimentellen Colitis erhöht, dennoch scheinen die Endothelzellen vermindert darauf zu reagieren.(89) Vermutet wird, dass das durch MMP produzierte Angiostatin die Reifung des entstandenen Gefäßnetzwerkes verhindert.(90) Auch bakterielle Abbauprodukte scheinen eine Angiogenese induzieren zu können. Das Darmmikrobiom scheint, unter anderem vermittelt durch TLR, zur Angiogenese während einer Darmentzündung beizutragen.(91) Diese Vorgänge führen zu einer deutlichen Veränderung der vaskulären Strukturen innerhalb des Darmgewebes, woraus eine Funktionseinschränkung verglichen mit gesundem Darmgewebe resultiert.

Während des Tumorwachstums werden Prozesse der Vaskulogenese und der Angiogenese kombiniert. Durch die Produktion von Tumor-Angiogenese-Faktoren werden die Wände von lokalen Kapillargefäßen abgebaut und deren Endothelzellen aus dem Verband herausgelöst. Diese gelösten Endothelzellen wandern und proliferieren nun in Richtung des angiogenen Stimulus des Tumors. Diese Gefäßsprossung durchläuft nun Reifungsprozesse und bildet schließlich ein Netzwerk zur Versorgung des Tumors.(92)

#### **2.4.2 Angiogenese der Dünndarmmukosa**

In Tierexperimenten mit Mäusen konnten wesentliche Entwicklungsschritte des Darms gezeigt werden. Der endgültige Aufbau mit einem funktionierenden Stammzellkompartiment scheint sich erst in der Phase des Säugens zu bilden. Zu diesem Zeitpunkt ist auch das Gefäßnetzwerk in den Zotten nicht vollständig ausgebildet, sondern besteht nur aus einzelnen Gefäßen.(9) Zur Zeit des Entwöhnens wurden wesentliche Änderungen des intestinalen Mikrobioms gefunden.(93) Dieser Zeitpunkt korreliert mit der Reife des Gefäßnetzwerkes in den Zotten.

Mittels verschiedene Versuche konnte der Einfluss des Mikrobioms auf die Vaskularisierung des Darms bewiesen werden. Der Darm keimfreier Mäuse befindet sich in einem Stadium der funktionellen Unreife. Durch die Besiedlung mit kommensaler Mikrobiota konnte das bei den keimfreien Mäusen unreife Gefäßnetzwerk innerhalb von 10 Tagen in ein reifes Gefäßsystem überführt werden.(9) Dieser Mechanismus ist abhängig von der Detektion der Mikrobiota durch die Panethzellen und der folgend ausgelösten Signalwege. Die Besiedlung durch

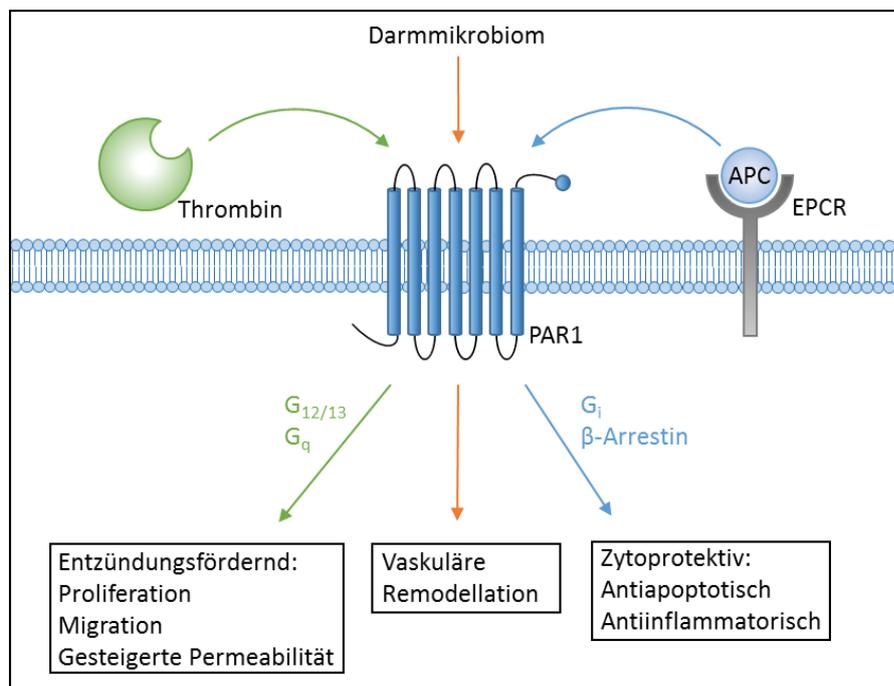
Mikrobiota verändert nicht ausschließlich die zentralen Gefäßstrukturen, sondern scheint Einfluss auf die gesamte Architektur der Villi zu haben. So zeigen konventionell-aufgezozene (*Conventionally-raised*, CONV-R) Mäuse im Vergleich zu keimfreien Mäusen in ihren Villusstrukturen zentral eine größere Gefäßdichte und kürzere, breitere Villi. Diese anatomischen Veränderungen beeinflussen letztlich auch die Gesamtoberfläche des Darms und folglich die darüber stattfindende Resorption von Nahrung und Wasser.(24) Die gesamte Aktivität der Gefäßneu- und -umbildung scheint sich sowohl bei CONV-R, als auch kolonisierten keimfreien (*Conventionally-derived*, CONV-D) Mäusen auf einem höheren Aktivitätsniveau zu befinden. Verschiedene Marker, welche als Indikator für eine solche Aktivität genutzt werden können, sind bei Mäusen mit mikrobieller Besiedelung erhöht.(10) Auch die pathologische Angiogenese wird von der bakteriellen Besiedelung beeinflusst. In Versuchen von Fiocchi et al. konnten angiogenetische Prozesse durch bakterielle Liganden, ähnlich denen bei CED, induziert werden.(94) Ebenso wird die Reifung der zentralen Lymphgefäße, welche für den Transport von Nährstoffen verantwortlich sind, wesentlich durch das Mikrobiom bewirkt. Suh et al. konnten zeigen, dass die Veränderungen der lymphatischen Gefäße hauptsächlich auf den Mangel an VEGF-C zurück zu führen sind. Als wesentliches Signal für die Produktion von VEGF-C konnten sie das Erkennen mikrobieller Bestandteile über den TLR-MyD88-Signalweg identifizieren.(95)

#### **2.4.3 Protease-aktivierter Rezeptor 1**

Der Protease-aktivierter Rezeptor 1 (PAR1) gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der kanonische Ligand für PAR1 ist Thrombin. PAR1-4 können entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden, im Dünndarm finden sich am häufigsten PAR1 und PAR2.(96) Zunächst entdeckt durch seine Rolle in der Thrombozytenaktivierung im Rahmen der primären Hämostase, sind inzwischen viele weitere Prozesse bekannt, an denen PAR1 beteiligt ist. So zum Beispiel in der Karzinogenese und Metastasierung und in pro- und antiinflammatorischen Prozessen.(97) Die Aktivierung von PAR1 durch seinen kanonischen Liganden Thrombin führt ebenfalls zu verstärktem Tumorwachstum und Metastasierung. Im Kontrast dazu steht die Aktivierung von PAR1 durch Aktivierter Faktor X (FXa). Hier konnten apoptotische Effekte in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden.(98)

Welcher Signalweg durch PAR1 aktiviert wird, ist abhängig von der Art Spaltung und des Liganden. Der extrazelluläre N-Terminus von PAR1 wird abgespalten und hierbei eine Proteindomäne freigelegt. Diese interagiert als gebundener Ligand mit der zweiten extrazellulären Domäne und kann so die Signale weiterleiten (siehe Abb. 7).(96)

PAR1 wird nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von den Enterozyten im Darm exprimiert. Keimfreie Mäuse zeigen in ihrem Darm niedrigere Expressionswerte für PAR1 im Vergleich zu CONV-R Tieren. Durch den Vergleich der Expressionen von vaskulären Markern wie Angiopoietin-1 (Ang-1) und Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1) konnte so ein Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Besiedlung im Darm, über erhöhte Werte von Tissue factor (TF) und PAR1, resultierend in einer verstärkten Vaskularisierung nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen Koagulationsgeschehnissen und einer veränderten Angiogenese konnte ebenfalls durch Experimente mit TF bewiesen werden.(99) Auch hier ist die veränderte Angiogenese abhängig von einer mikrobiellen Besiedlung.(10) Die Expression von den verschiedenen Subtypen der PAR auf Immunzellen ist bekannt.(100) Dies könnte eine Rolle bei der Entwicklung von CED spielen, welche mit einer übermäßigen Aktivierung von Immunzellen einhergehen.(96)



**Abbildung 7: Funktionen von PAR1.** Dargestellt sind der kanonische Signalweg von PAR1 über die Aktivierung durch Thrombin, und weitere Signalwege, die eine Beteiligung in der Vaskularisierung und Hämostase zeigen. Abbildung modifiziert nach Pontarollo et al.(137)

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Tabelle 4: qPCR Primer

Primer	Gen	Sequenz 5'- 3'
<i>Duox2_for</i>	Dual oxidase 2	AAGTTCAAGCAGTACAAGCGAT
<i>Duox2_rev</i>		TAGGCACGGTCTGCAAACAG
<i>DuoxA2_for</i>	Dual oxidase A2	GACGGGGTGCTACCCTTTTAC
<i>DuoxA2_rev</i>		CCCACGGATTCCAGGCAAG
<i>Ihh_for</i>	Indian Hedgehog	GACGAGGAGAACACGGGTG
<i>Ihh_rev</i>		GCGGCCCTCATAGTGTAAGA
<i>L32_for</i>	60S ribosomales Protein L32 ( <i>housekeeping gene</i> )	CCTCTGGTGAAGCCCAAGATC
<i>L32_rev</i>		TCTGGGTTTCCGCCAGTTT
<i>PECAM-1_for</i>	Platelet endothelial cell adhesion molecule	CTGCCAGTCCGAAAATGGAAC
<i>PECAM-1_rev</i>		CTTCATCCACTGGGGCTATC
<i>Shh_for</i>	Sonic Hedgehog	AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA
<i>Shh_rev</i>		TGAGTTCCTTAAATCGTTCGGAG

Tabelle 5: Primer Genotypisierung Duox2

Primer	Gen	Sequenz 5'- 3'
<i>Duox2_for</i>	Dual oxidase 2	GAATCACATGGGCTCAAAGG
<i>Duox2_rev</i>		ATGAAAACAGCCCACAGAGG

Tabelle 6: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose Standard (ROTI®Garose)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
BsuRI (Hae III) (10 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CutSmart – NEB Puffer System	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
DMSO, wasserfrei	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DNase-freies Wasser	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Eosin-Lösung 1 %, wässrig für Laborzwecke	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Ethanol, 70 %, 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Gibco™ Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Gibco™ HEPES (1 M)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ RPMI 1640 Medium GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ Sodium Pyruvat (100 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ Trypanblau-Lösung, 0.4 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Lipopolysaccharid (LPS) ultrapure – TLR4 Ligand	InvivoGen, San Diego, USA
Mayer's Hemalaun	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Neomycinsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS 10-fach Pulver	AppliChem, Chicago, USA
PBS Lösung 1 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin (10.000 units Penicillin & 10 mg Streptomycin pro mL in 0,9 % NaCl, steril filtriert)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ROTI®GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histofix pH 7,4 % Formaldehydlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TBE Puffer 10x	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Thermo Scientific™ Maxima™ Hot Start Green 2x PCR Mastermix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VAS2870	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Xylene, mixture of isomers	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 7: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Geldokumentationssystem	GelDoc EZ Imager	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Feinwaage	R180	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Inkubationshaube	CERTOMAT® H	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Inkubatoren	Thermo Scientific™ Heratherm™ Advanced Protocol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank -20 °C	Premium No Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Comfort	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank -80 °C	Hera Freeze BASIC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	Stirrer MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axio Lab.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, Radnor, USA
Multi-Mode- Detektionsplattform	SpectraMax i3x	Molecular Devices Hauptniederlassung, San Jose, USA
Paraffinstrecktisch	HI1220	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
PCR-Cycler	Mastercycler® pro	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Photometer	NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Pipet Lite XPS LTS (2, 10, 20, 200, 1000 µL)  Finnpipette F2, autoklavierbar (20, 200, 1000 µL)	RAININ über Mettler- Toledo GmbH, Columbus, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettierhilfe	S1 Pipettierhilfe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Real-Time PCR-Cycler	CFX96™ Real-Time PCR Detection System	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Rotationsmikrotom	RM2235	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Schwingkugelmühle	TissueLyser II	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Sterilbank	Herasafe KS15, KS18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermodesinfektor	Miele G 7882 CD	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Tisch-Rundschüttler	CERTOMAT® R	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Vakuumpumpensystem	FB70157	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage	VWR-1502	VWR International, Radnor, USA
Wasserbad	HI1210	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
S1-Werkbank	Herasafe KS 15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 Megafuge 16R Micro 1814	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA VWR International, Radnor, USA

**Tabelle 8: Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
CELLSTAR® 96 Well Platte, klar	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CELLSTAR® Zellkultur Flaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einbettkassetten Universal mit Deckel	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
Einweghandschuhe Nitril, powder-free	Abena GmbH, Zörbig, Deutschland
Falcons (15 mL, 30 mL)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Latexhandschuhe Semper-care	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
LUMITRAC™ 200 96 Well PS Microplates	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Light-Duty Tissue Wipers	VWR International, Radnor, USA
Menzel™ Mikroskop-Deckelgläschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Metallkugeln (7 mm)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Objektträger	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas mit offener Spitze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Reaktionsgefäße	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	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5, 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Schwämme für Einbettkassetten	Kartell Labware, Noviglio, Italien

Serologische Pipetten (5, 10, 25 mL)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Spritzen (1, 2, 10 mL)	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland BD GmbH Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Neubauer Zellzählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 9: Kits**

Kits	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay	Promega Corporation, Walldorf, Deutschland

**Tabelle 10: Mauslinien**

Stamm	Typ	Herkunft	Zucht
C57BL/6J	Inzuchtstamm, spontane Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
B6(Cg)- <i>Tlr4</i> <sup>tm1.2Karp/J</sup>	Kongener Stamm, gezielte Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
B6(129)- <i>Duox2</i> <sup>thyd/J</sup>	Kongener Stamm, gezielte Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
B6.129S4- <i>F2</i> <sup>tm1Ajc/J</sup>	Kongener Stamm, gezielte Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
B6(Cg)- <i>Tlr4</i> <sup>tm1.1Karp/J</sup>	gezielte Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung
B6(Cg)-Tg(Vil1-cre)1000Gum/J	Kongener Stamm, gezielte Mutation	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung

**Tabelle 11: Software**

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

**Tabelle 12: Zelllinie**

Zelllinie	Herkunft
MODE-K	Dominique Kaiserlian (INSERM, Frankreich)

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Tierhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden in der TARC (Translational Animal Research Center) der Universitätsmedizin Mainz gehalten. Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit unter SPF oder GF Bedingungen gehalten. In den EU Type II IVC-Käfigen gab es konstante 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklen. Die GF Mäuse wurden in flexiblen Plastikisolatoren gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und autoklaviertem Futter. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 6 und 14 Wochen alt und wurden geschlechts- und altersspezifisch abgestimmt. Es wurden Tiere beider Geschlechter verwendet. Die Genotypisierungen erfolgten durch Mitglieder unserer Arbeitsgruppe mittels Schwanzbiopsienentnahme. Exemplarisch ist hier die Genotypisierung der B6(129)-*Duox2<sup>thyd</sup>/J* Mäuse beschrieben. Zur Gewinnung der DNA wurden die Proben jeweils mit 30 µL Lysepuffer versetzt und anschließend bei 97 °C für 20 Minuten erhitzt. Anschließend folgte die Neutralisierung mittels 30 µL Neutralisationspuffer. Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren erfolgte eine Abkühlung bei Raumtemperatur. Das Pipettieren der Reaktionsansätze für die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach dem Schema aus Tabelle 13.

**Tabelle 13: Pipettierschema Genotypisierung**

12,5 µL	Hot Start Green MM
0,5 µL	<i>Duox2_for</i> (10 µM)
0,5 µL	<i>Duox2_rev</i> (10 µM)
9,5 µL	Wasser (DNAase-free)
2,0 µL	DNA
25,0 µL total	

**Tabelle 14: Programm Thermocycler Genotypisierung**

Zeit	Temperatur	Zyklen
120 s	94 °C	38x
30 s	94 °C	
60 s	58 °C	
60 s	72 °C	
600 s	72 °C	

Die Vervielfältigung dieser Proben geschah mittels Thermocycler (siehe Tabelle 14 13). Die Restriktion nach der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) erfolgte über 4 Stunden bei 37 °C. Zu jeder Probe wurden 2,5 µL CutSmart-Puffer und 1 µL Hae III Enzym gegeben. Der Abbruch der Restriktion erfolgte bei 80 °C für 30 Minuten. 5 µL der Proben wurden gemeinsam mit dem DNA-Marker auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für 45 Minuten laufen gelassen. Das Agarosegel wurde mit 1-fachem TBE-Puffer gegossen und mit Roti-Stain (8 µL auf 100 mL) vorgefärbt. Die Entwicklung des Gels geschah im GelDoc, anschließend konnte der Genotyp der Maus bestimmt werden.

Zur Untersuchung der konkreten Auswirkungen des auf Darmepithelzellen exprimierten Rezeptors TLR4, wurden Mäuse des Typs B6(Cg)-*Tlr4*<sup>tm1.1Karp</sup>/J mit denen des Typs B6(Cg)-Tg(Vil1-cre)997Gum/J verpaart. Dies führt zu einem solitären Knock-out von TLR4 ausschließlich auf den Darmepithelzellen. Die entstandenen Tiere wurden auf das Vorhandensein beider Knock-outs analysiert.

Die LPS-Behandlung erfolgte durch Mitglieder unserer Arbeitsgruppe. Die Behandlung der CONV-R Wildtypen mit LPS begann mit der Gabe einer Breitspektrumantibiose, bestehend aus Neomycin und Ampicillin zu je 1 g/L Trinkwasser. Das behandelte Trinkwasser stand den Mäusen 14 Tage zur freien Verfügung und wurde regelmäßig erneuert. Anschließend erfolgte die LPS-Behandlung mit 100 µg/mL LPS gelöst in Trinkwasser. Dies stand über eine Dauer von 7 Tagen zur freien Verfügung und wurde regelmäßig gewechselt. Nach Ablauf der 7 Tage wurden die Tiere euthanasiert.

### **3.2.2 Gewebeentnahme**

Die Entnahme der Gewebe erfolgte nach dem Töten des Tieres durch zervikale Dislokation. Nach Befeuchten des Bauches mit 70 % Ethanol (EtOH) wurde der Bauchraum mit einer Schere auf einem Präparationsbrett eröffnet. Der Magen wurde mittels Pinzette lokalisiert und der Beginn des Darms fixiert und abgetrennt. Der Dünndarm wurde zur Entfernung vorsichtig an der geöffneten Schere entlanggeführt, um das *Mesenterium* zu entfernen. Am Übergang zum *Caecum* wurde der Darm getrennt und in U-Form auf dem Präparierbrett ausgelegt. Der Darm wurde in 8 gleichlange Segmente geteilt. Die *Small intestine*-Segmente 7 und 8, (Dünndarm-Segment 7 und 8, Si7 und Si8), zuzuordnen dem distalen *Ileum*, wurden zur Isolation der Epithelzellen nicht getrennt und in eisgekühlter 1%iger phosphatgepufferter

Salzlösung (*Phosphate buffered saline*, PBS) gelagert (Weiterverarbeitung siehe Kapitel 3.2.3 Epithelzellenisolation). Das Segment Si5, zuzuordnen dem proximalen *Ileum*, wurde mittels Spritze mit eisgekühltem 1%-PBS gereinigt und anschließend in drei gleich große Abschnitte geteilt. Für die Darmhistologie wurde das mittlere Stück nur vorsichtig am Rand mit der Pinzette berührt und zwischen zwei Schwämmen in die Einbettkassette gegeben. Die Kassette wurde anschließend sofort in ein mit Roti-Histofix befülltes Gefäß gegeben (Weiterverarbeitung siehe Kapitel 3.2.7). Die anderen zwei Abschnitte wurden für die RNA Isolation je in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sofort mittels Flüssigstickstoff eingefroren (Weiterverarbeitung siehe Kapitel 3.2.4).

### **3.2.3 Epithelzellenisolation**

Die Isolation der Epithelzellen erfolgte direkt nach der Entnahme der Gewebestücke Si7 und 8 des Darms aus der Maus. Zunächst wurde der Darm mit eisgekühltem 1%-PBS mit Hilfe einer Spritze durchgespült. Anschließend wurde der Darm mittels Schere der Länge nach eröffnet. Die Probe wurde nun in 4-4,5 mL eisgekühltem 1%-PBS in einem 20 mL Falcon geschüttelt, um Rückstände von Faeces zu beseitigen. Mit Hilfe eines Papiertuches wurde möglichst viel Flüssigkeit entfernt und das Gewebestück in ein neues Falcon mit 4-4,5 mL eisgekühltem 1%-PBS gegeben. Die Proben wurden nun 30 Minuten bei 37 °C in einem Inkubator auf einer Rüttelplatte bei einer Rüttelgeschwindigkeit von 250 rpm inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben in den Falcons per Hand kräftig für etwa 30 Sekunden geschüttelt. Von der entstandenen Zellsuspension wurden 2 mL mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden nun für 5 Minuten in einer Zentrifuge bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden erneut in eisgekühltem 1%-PBS resuspendiert und gewaschen. Es erfolgte eine zweite Zentrifugation nach vorherigen Kriterien. Der Überstand wurde erneut verworfen. Die Zellen wurden jeweils in 350 µL RLT-Puffer aus dem Qiagen RNeasy Mini Kit gelöst.

### **3.2.4 RNA-Isolation**

Die RNA Isolation aus dem Gewebe erfolgte an einem ca. 30 mg schweren Stück der Probe. Vorbereitend wurde RLT-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt (10 µL

$\beta$ -Mercaptoethanol auf 1 mL RLT-Puffer). Zu jeder Probe wurden 600  $\mu$ L des Puffers und 2 Metallkugeln in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden nun im Tissue Lyser 6 Minuten bei 30 Hz vollständig lysiert. Das weitere Vorgehen zur RNA Isolierung ist dem Protokoll der Firma Qiagen im Anhang zu entnehmen.

Die anschließende Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA geschah mittels Nanodrop. Nach erfolgter Messung der Proben wurden diese auf 200 ng/ $\mu$ L verdünnt.

### 3.2.5 cDNA Synthese

Zur Synthese der cDNA wurden 10  $\mu$ L der 200 ng/ $\mu$ L gewonnenen RNA mit 10  $\mu$ L des Mastermixes (Tabelle 15) verwendet, und nach untenstehendem Schema (Tabelle 16) im Thermocycler vervielfältigt. Dies geschah nach Anwendungsprotokoll des verwendeten High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kits der Firma Thermo Fisher Scientific.

**Tabelle 15: Pipettierschema cDNA Synthese**

Reagenz	Konzentration Stammlösung	Konzentration Reaktion	Eingesetzte Volumina
RT-Puffer	10 x	1 x	2 $\mu$ L
dNTP-Mix	25 x (100 mM)	1 x	0,8 $\mu$ L
RT Random Primers	10 x	1 x	2 $\mu$ L
Reverse Transkriptase	50 U/ $\mu$ L	50 U	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O			4,2 $\mu$ L

**Tabelle 16: Programm Thermocycler cDNA-Synthese**

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

Nach erfolgter cDNA Synthese wurde diese auf eine Konzentration von 5 ng/ $\mu$ L verdünnt. Diese Proben wurden für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet.

### 3.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Untersuchung der relativen Expression der mRNA wurde die Methode der qPCR angewandt. Als Referenzgen (Housekeeping-gene) wurde das 60S ribosomale Protein L32 verwendet. Die Expression dieses Gens ist unter unseren Versuchsbedingungen nicht reguliert. In einer 96-Well Platte wurden jeweils in Triplikaten das Referenzgen und das Zielgen aufgetragen, dazu die jeweiligen cDNA Proben der verschiedenen Mäuse. Das Endvolumen pro Well betrug 20  $\mu\text{L}$ , zusammengesetzt aus 16  $\mu\text{L}$  des Ansatzes in Tabelle 17 und 4  $\mu\text{L}$  der cDNA. Das verwendete Programm des Thermocyclers ist in Tabelle 18 zu finden.

**Tabelle 17: Pipettierschema qPCR**

	<b>Stammlösung</b>	
iQ Sybr Green MM	2 x	10
Primer for	10 mM	0,5 $\mu\text{L}$
Primer rev	10 mM	0,5 $\mu\text{L}$
cDNA	5 ng/ $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
DNase-freies H <sub>2</sub> O		5 $\mu\text{L}$

**Tabelle 18: Programm qPCR**

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

Gemessen wurde die relative Expression der mRNA von Referenz- und Zielgen. Die relative mRNA Expression des Zielgens wurde auf die des Housekeeping-Genes normalisiert und durch die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet. Outlier wurden durch den Grubbs-Ausreißertest von GraphPad bestimmt, bei einem Signifikanzlevel von 0,05. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism.

### 3.2.7 Herstellung der Paraffinschnitte

Das Einbetten in Paraffin erfolgte durch die Core Facility Histologie der Universitätsmedizin Mainz.

Die Paraffinblöcke wurden bei ca. 8 °C im Kühlschrank vorgekühlt. Das Schneiden erfolgte mittels Mikrotom. Es wurden konstant Schnitte von je 7  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt, welche zur Entspannung für ca. eine Minute in ein 40 °C warmes Wasserbad gegeben

wurden. Die Schnitte wurden auf Glasobjektträgern fixiert und zur Trocknung für etwa 1 Stunde auf eine 40 °C warme Heizplatte gelegt. Anschließend erfolgte die weitere Trocknung über Nacht in einer 37 °C Wärmekammer.

### **3.2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

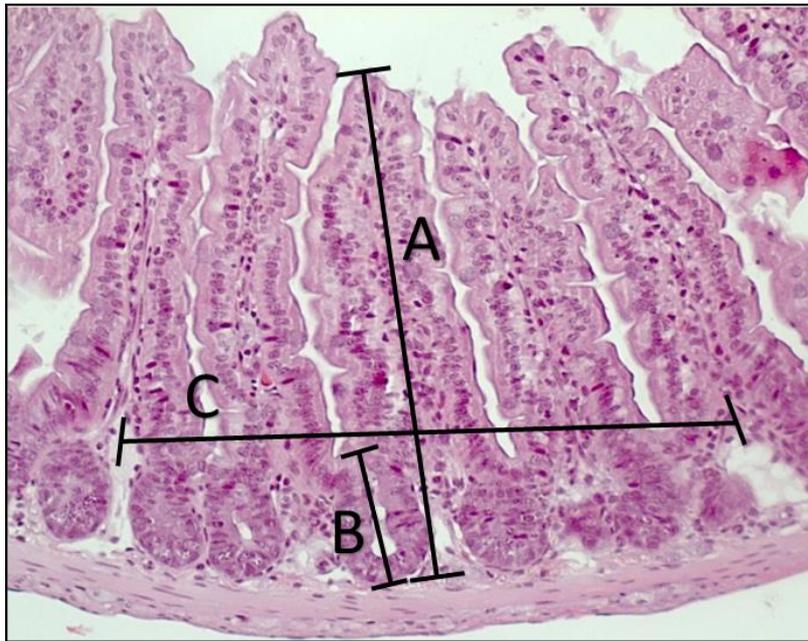
Die Schnitte wurden zweifach für je 5 Minuten in Xylol deparaffinisiert. Die Hydratisierung erfolgte durch Bäder in absteigender Alkoholkonzentration: 2x5 Min. in 100 % EtOH, 3 Min. 90 % EtOH, 3 Min. 70 % EtOH, 3 Min. 50 % EtOH, zuletzt in destilliertem Wasser für 3 Minuten.

Die Schnitte wurden zunächst für 3-5 Min. in Hämalaun gegeben, bis der gewünschte Grad der Färbung erzielt wurde. Anschließend wurden sie 3-5 Minuten unter fließendem Wasser abgespült, bis ein Farbumschlag von bräunlich zu blau erkennbar war. Die Färbung mit Eosin erfolgte für 10 Minuten. Die Schnitte wurden nun zum Spülen etwa 3-mal kurz in Wasser getaucht.

Die Dehydrierung nach erfolgtem Färben geschah in einer aufsteigenden Alkoholreihe: destilliertes Wasser 3 Min., 3 Min. 50 % EtOH, 3 Min. 70 % EtOH, 3 Min. 90 % EtOH, 2x5 Min. in 100 % EtOH, 2x5 Min. Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern und Eukitt Mounting Medium eingedeckt.

### **3.2.9 Histologische Analyse**

Die histologischen Analysen erfolgten unverblindet mittels Lichtmikroskop an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten. Zunächst wurde auf dem Schnitt eine passende Stelle ausgewählt. Kriterien waren hierfür mindestens fünf Villusstrukturen im gewählten Bildausschnitt, welche sich möglichst gerade darstellen sollten. Bei geeigneten Schnitten wurden multiple Stellen ausgewählt und vermessen (Maximal 3 Stellen pro Tier). Gearbeitet wurde mit einem 10- oder 20-fach vergrößerndem Objektiv und einem 10-fach Okular. Der gewählte Ausschnitt wurde mittels Mikroskopkamera fotografiert und die Messung am Computer mit der AxioVision Mikroskop Software durchgeführt.



**Abbildung 8: Auswertungsschema der Dünndarmmorphologie.** Mausileum, HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung. A: Villuslänge, B: Krypttiefe, C: Villusabstand über vier Villi hinweg. Eigene Darstellung.

Vermessen wurden die Villuslänge (A), die Krypttiefe (B) und der Villusabstand über vier Villi hinweg (C) (siehe Abb. 8). Zur Kontrolle wurden die ersten Bilder mehrfach zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen und verglichen. Die Messung der Villuslänge erfolgte vom tiefsten Punkt der zugehörigen Krypte bis zur Villusspitze. Die Krypttiefe wurde von der Basis der Krypte bis zum Nullniveau, dem Ende der Einstülpung in die Lamina Propria gemessen. Zudem erfolgte auf der Höhe des Nullniveaus die Messung über eine möglichst gerade Strecke von vier Villusstrukturen hinweg. Als Endpunkte dieser Strecke wurden die Zentralgefäße der Villi verwendet. Durch diese Methodik wurden fünf nebeneinanderliegende Villusstrukturen benötigt, durch die Messung bis zum Zentralgefäß ergibt sich jedoch eine Strecke über vier Villi.



**Abbildung 9: Auswertungsschema der Dünndarmmorphologie.** Mausileum, HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung. Schwarze Pfeile: Epithelzellkerne, roter Pfeil: Becherzellkern. Eigene Darstellung.

Die Zählung der Epithelzellen erfolgte über eine Zählung der Zellkerne (siehe Abb. 9). Gezählt wurden ausschließlich Kerne der Epithelzellen (schwarze Pfeile). Andere Zellarten beispielsweise Becherzellen (roter Pfeil), auffällig durch die hellen Granula, wurden nicht gezählt. Gezählt wurde auf einer Seite der Villusstruktur, ab der tiefsten Stelle der Krypte bis zur Mitte der jeweiligen Villusspitze. Die genannten Zellzahlen entsprechen also der Hälfte der Zellkerne der abgebildeten Villusstrukturen.

Die anschließende Auswertung erfolgte zunächst über Microsoft Excel. Die jeweils fünf gemessenen Werte für Villuslänge, Krypttiefe und Epithelzellen wurden zu einem Mittelwert vereint. Die Werte der Abstandsmessung wurde durch vier geteilt. Alle Werte wurden anschließend mit GraphPad weiterverarbeitet. Bei geeigneten Schnitten wurden maximal drei Stellen pro Tier ausgewertet. Für die Abstandsmessung wurden, wenn möglich, mehrere Messungen pro Schnitt durchgeführt, maximal vier (siehe Anhang).

### 3.2.10 Zellkultur

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dominique Kaiserlian (INSERM, Frankreich) bereitgestellt. Es handelt sich um eine epitheliale Linie, ursprünglich aus Duodenalzellen von Mäusen des genetischen Typs C3H/He gewonnen.(101) Die MODE-K Zellen wurden, wie in Vidal et al. 1993 beschrieben, kultiviert. Der Ansatz des Mediums ist Tabelle 19 zu entnehmen, das Medium wurde steril filtriert. Gearbeitet wurde unter einer S1-Werkbank. Die Zellen verblieben zwischen den Arbeitsschritten in einem 37 °C Brutschrank mit befeuchteter Luft und 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 19: Medium für die MODE-K Zellkultur**

<b>Stoff</b>	<b>Menge</b>
Gibco™ RPMI 1640 Medium GlutaMAX™	500 mL
Gibco™ Natrium Pyruvat (100 mM)	5 mL
Gibco™ HEPES (1 M)	5 mL
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	5 mL
2-Mercaptoethanol	0,5 mL
Gibco™ FCS	50 mL
Penicillin-Streptomycin (10.000 units Penicillin & 10 mg Streptomycin pro mL in 0,9 % NaCl, steril filtriert)	5 mL

Das Splitten der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweifach mit 5 mL vorgewärmten 1%-PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 mL vorgewärmtes Trypsin/EDTA hinzugegeben und die Zellen für 2 Minuten in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden gelöst und in ein mit 10 mL Medium gefülltes Falcon überführt. Dieses wurde bei 1500 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in 5 mL Medium gelöst. 1 mL dieser Zellsuspension wurden dann in eine mit 14 mL Medium gefüllte T75 Zellkulturflasche überführt.

### 3.2.11 ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay

Die Zellen wurden ca. 12 Stunden vor Beginn des Experiments auf eine Dichte von 10.000/Well ausgesät und im 37 °C Brutschrank inkubiert.

Es wurde erneut Medium angesetzt, die Zusammensetzung ist Tabelle 20 zu entnehmen. Dieses wurde im weiteren Versuchsverlauf und zur Verdünnung der Stimulanzen verwendet. LPS wurde auf eine Zielkonzentration von 160 ng/μL

verdünnt. VAS2870 wurde in DMSO gelöst und auf eine Zielkonzentration von 5 µmol verdünnt.

Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerprotokoll des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kits. Dieses findet sich im Anhang.

Das Auslesen der Platte erfolgte durch das SpectraMax i3x. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels Microsoft Excel. Die Werte der Wells mit Medium + Zellen wurden als Kontrollgruppe gemittelt. Die Normierung aller Werte erfolgte auf diesen Mittelwert. Diese relativen Zahlenwerte wurden anschließend in Graph Pad Prism eingegeben.

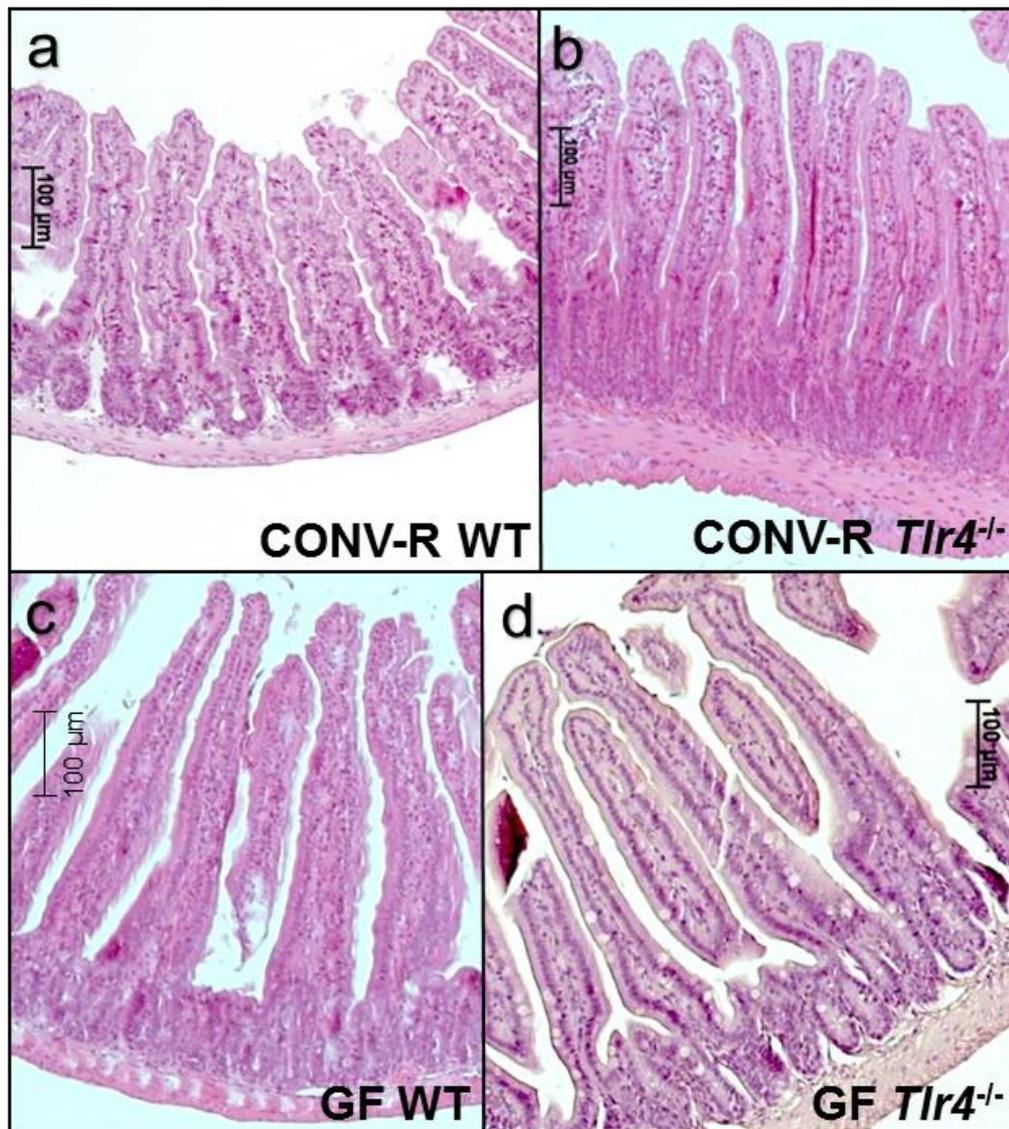
**Tabelle 20: Medium für das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Glo Kit**

<b>Stoff</b>	<b>Menge</b>
Gibco™ RPMI 1640 Medium GlutaMAX™	500 mL
Gibco™ Sodium Pyruvat (100 mM)	5 mL
Gibco™ HEPES (1 M)	5 mL
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	5 mL
2-Mercaptoethanol	0,5 mL
Penicillin-Streptomycin (10.000 units Penicillin & 10 mg Streptomycin pro mL in 0,9 % NaCl, steril filtriert)	5 mL

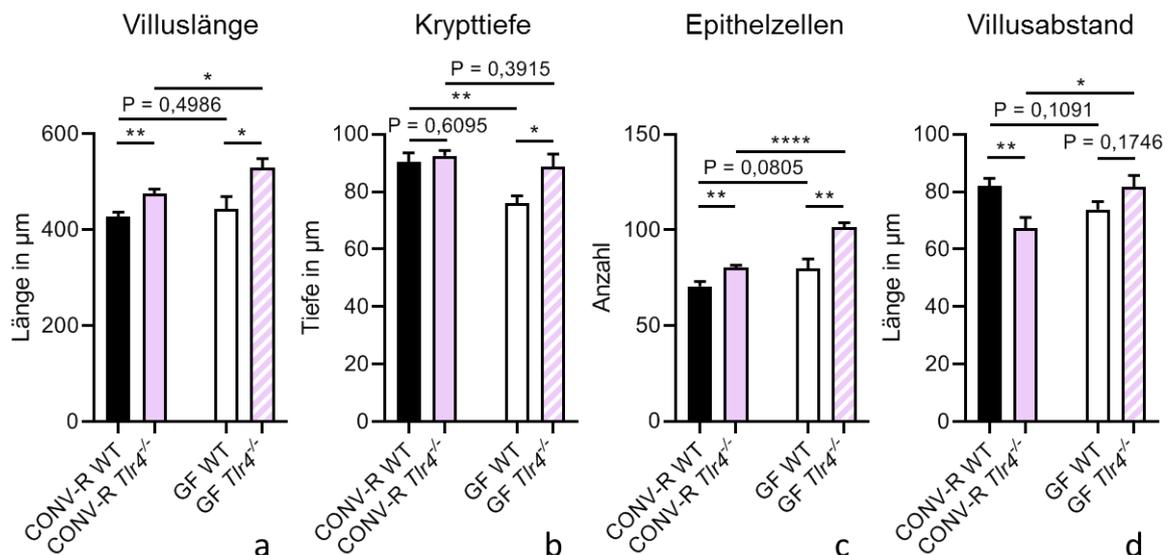
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Dünndarmmorphologie der *Tlr4*<sup>-/-</sup>-defizienten Mäuse (CONV-R vs. GF)

Um zu prüfen, ob der Immunrezeptor TLR4 für Mikrobiota-abhängige Morphologieänderungen mitverantwortlich ist, wurden Proben des distalen Dünndarms von CONV-R und GF aufgezogenen *Tlr4*-defizienten Tieren entnommen. Verglichen wurden diese mit von CONV-R und GF aufgewachsenen Wildtypen.



**Abbildung 10: Morphologie des distalen Dünndarms konventionell-aufzogener und keimfreier *Tlr4*-defizienter Mäuse.** HE-Färbungen, 100-fache Vergrößerung. Abgebildet sind Villusstrukturen von **a** konventionell-aufgezogenem Wildtyp, **b** konventionell-aufgezogene *TLR4*-defiziente Maus, **c** keimfreier Wildtyp, **d** keimfreie *Tlr4*-defiziente Maus. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen.



**Abbildung 11: Veränderungen der Villusmorphologie konventionell-aufgezogener (CONV-R) und keimfreier (GF) *Tlr4*<sup>-/-</sup>-defizienter Mäuse.** Abgebildet sind **a** Villuslänge, **b** Krypttiefe, **c** Zellkerne pro Villuslänge, **d** Villusabstand von konventionell- aufgewachsen (CONV-R) und keimfreien (GF) Wildtypen im Vergleich mit CONV-R und GF *Tlr4*-defizienten Mäusen, (n = siehe Anhang, C57BL/6J Mäuse). T-Test, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M. \* = P < 0,05, \*\* = P < 0,01, \*\*\*\* = P < 0,001.

Der Vergleich der konventionell-aufgewachsenen und keimfreien Tiere in Abbildung 11 a zeigt, dass die keimfreie Aufzucht, ebenso wie die Deletion von *Tlr4*, mit längeren Villusstrukturen einhergeht. Die niedrigsten Werte der Längenmessung mit durchschnittlich 427,14 µm finden sich bei den konventionell-aufgewachsenen Wildtypen. Die *Tlr4*-defizienten Mäuse zeigen eine signifikant gesteigerte Länge der Villi im Vergleich zu den Wildtypen. Die keimfreien Wildtypen zeigen eine größere Villuslänge als die konventionell-aufgewachsenen Tiere, jedoch kürzere Villusstrukturen als die konventionell-aufgewachsenen *Tlr4*-defizienten Mäuse. Die längsten Villusstrukturen finden sich bei den keimfreien *Tlr4*-defizienten Tieren mit durchschnittlich 529,6 µm. Verglichen zu den keimfreien Wildtypen und den CONV-R *Tlr4*-defizienten Mäusen sind diese signifikant verlängert.

Die Untersuchung der Krypttiefe (Abb. 11 b) zeigt, dass dieser Wert bei den konventionell-aufgewachsenen Tieren beider Gruppen kaum variiert. Die Defizienz von *Tlr4* scheint hier folglich die Krypttiefe nicht zu beeinflussen. Deutlich niedrigere Werte finden sich bei den keimfreien Tieren. Die keimfreien Wildtypen haben mit 76,1 µm die niedrigsten Werte dieser Gruppe. Im Vergleich dazu zeigen die keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäuse signifikant größere Werte. Diese erreichen ähnliche Werte wie die konventionell-aufgewachsenen Tiere.

Die Anzahl der Epithelzellen in den Villusstrukturen verhalten sich ähnlich wie die Längenmessungen (Abb. 11 c). Die keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäuse erreichen die höchsten Kernanzahlen. Diese sind im Vergleich zu den keimfreien Wildtypen signifikant erhöht. Auch die konventionell-aufgewachsenen *Tlr4*-defizienten Mäuse zeigen höhere Kernanzahlen als die konventionellen Wildtypen. Der Vergleich zwischen den keimfreien und den konventionellen *Tlr4*-defizienten Tieren zeigt signifikant höhere Kernanzahlen bei den keimfreien. Die Wildtypen zeigen ähnliche Kernanzahlen bei konventionell-aufgewachsenen und keimfreien Tieren.

Der Villusabstand ist bei den konventionell-aufgewachsenen Wildtypen signifikant reduziert im Vergleich zu den CONV-R *Tlr4*-defizienten Mäusen. Die keimfreien Tiere zeigen einen geringeren Abstand der Villusstrukturen zueinander (Abb. 11 d). Es zeigt sich hier bei den *Tlr4*-defizienten Mäusen ein Trend zu größeren Abständen der Villusstrukturen zueinander. Dieser Wert ist jedoch nicht signifikant verändert. Vergleicht man die Werte der Wildtypen miteinander, ist erkennbar, dass die keimfreien Tiere einen geringeren Abstand der Villi zueinander zeigen. Die Werte der konventionell-aufgewachsenen *Tlr4*-defizienten Mäuse werden jedoch nicht erreicht. Die keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäuse zeigen ähnliche Werte wie die konventionellen Wildtypen und einen signifikant erhöhten Abstand verglichen zu den CONV-R *Tlr4*-defizienten Tieren.

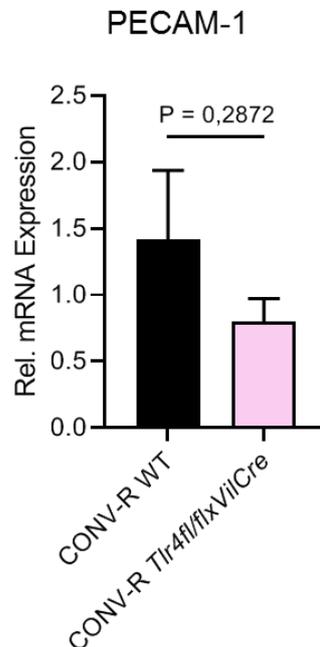
**Tabelle 21: Villuslängen-Kernanzahl-Relation, *Tlr4*-defiziente Mäuse.**

	CONV-R WT	CONV-R <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup>	GF WT	GF <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup>
Durchschnittliche Villuslänge (µm)	427,14 ±10,27	476,11 ± 9,28	443,81 ± 25,84	529,6 ± 19,29
Durchschnittliche Kernanzahl	70,55 ± 2,45	80,3 ± 1,42	79,83 ± 5,07	101,5 ± 2,26
Villuslänge geteilt durch Kernanzahl	6,05	5,93	5,56	5,22

Konventionell-aufgezogene Wildtypen (CONV-R WT), konventionell-aufgezogene *Tlr4*-defiziente Tiere (CONV-R *Tlr4*<sup>-/-</sup>), keimfreie Wildtypen (GF WT), keimfreie *Tlr4*-defiziente Tiere (GF *Tlr4*<sup>-/-</sup>). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M.

Um zu vergleichen, wie sich die durchschnittliche Zellanzahl (symbolisiert durch die Kernanzahl) aller Proben bezogen auf die durchschnittliche Villuslänge aller Proben verhält, wurde die Länge durch die Anzahl an Kernen geteilt (siehe Tabelle 21). Der niedrigste Wert findet sich bei den keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäusen. Die Gesamtanzahl der gezählten Epithelzellkerne ist zwar deutlich erhöht, bezogen auf die

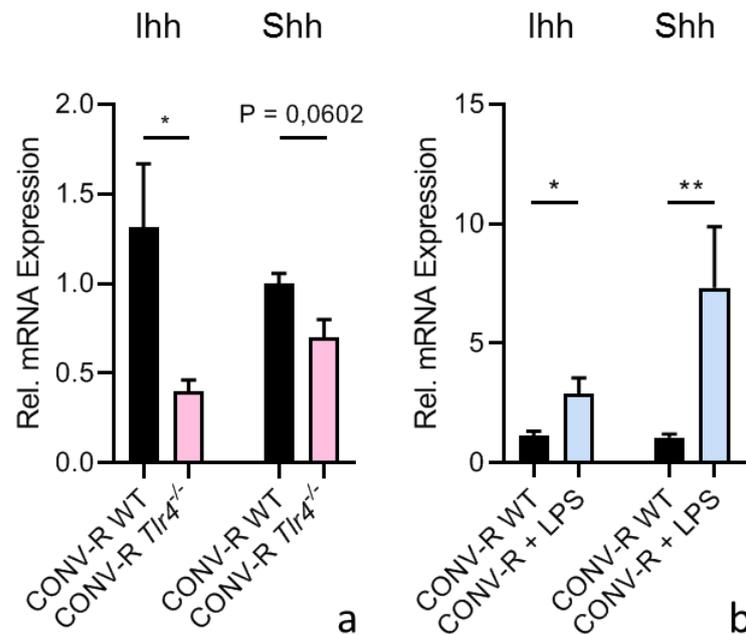
ebenfalls deutlich erhöhte Länge der Villusstrukturen, findet sich hier jedoch ein geringeres Zellbreiten-Villuslängen-Verhältnis. Dieser Trend findet sich ebenfalls bei den konventionell-aufgewachsenen Tieren. Auch hier zeigen die *Tlr4*-defizienten Mäuse erhöhte Werte bei den Villuslängen und den Kernanzahlen. In Relation gesetzt haben die *Tlr4*-defizienten Mäuse wiederum weniger Zellen.



**Abbildung 12: *Tlr4* beeinflusst die PECAM-1 Expression.** Abgebildet ist die relative mRNA Expression des vaskulären Markers PECAM-1 im Vergleich zu L32 von konventionell-aufgezogenen Wildtypen (n = 6) und konventionell-aufgezogenen *Tlr4fl/flxVillin-Cre*-Tieren (n = 6). C57BL/6J Mäuse, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M.

Es wurde die relative mRNA Expression des vaskulären Markers PECAM-1 mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Hierbei wurden Tiere mit der epithelspezifischen Variante *Tlr4fl/flxVillin-Cre* verwendet. Die *Tlr4fl/flxVillin-Cre*-Tiere zeigen einen Trend zu geringerer Expression von PECAM-1, welcher jedoch nicht signifikant ist.

## 4.2 *Tlr4*-abhängige Regulation der Expression von Hedgehog Liganden

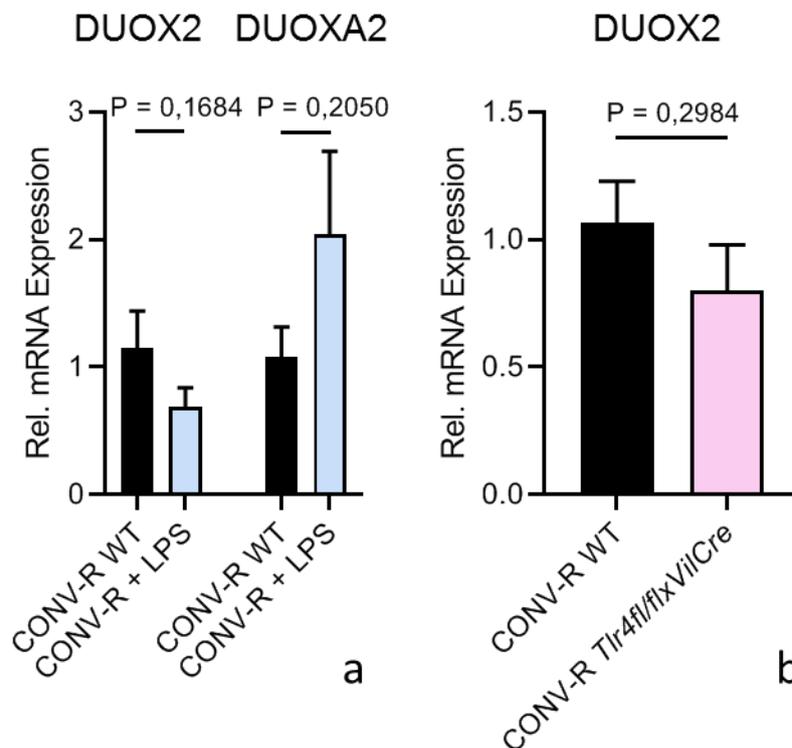


**Abbildung 13: *Tlr4* beeinflusst die Expression von Hedgehog-Liganden.** Abgebildet ist die relative mRNA Expression von *Indian Hedgehog* (*Ihh*) und *Sonic Hedgehog* (*Shh*) im Vergleich zum Housekeeping-Gen L32, cDNA gewonnen aus isolierten Epithelzellen des distalen Dünndarms. **a** konventionell-aufgezoene Wildtypen ( $n^{\text{Ihh}} = 7$ ;  $n^{\text{Shh}} = 7$ ) und *Tlr4*-defiziente Tiere ( $n^{\text{Ihh}} = 3$ ;  $n^{\text{Shh}} = 3$ ). **b** konventionell-aufgezoene Wildtypen ( $n^{\text{Ihh}} = 7$ ;  $n^{\text{Shh}} = 7$ ) und konventionell-aufgezoene Wildtypen nach LPS-Behandlung ( $n^{\text{Ihh}} = 7$ ;  $n^{\text{Shh}} = 3$ ). C57BL/6J Mäuse, T-Test, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ .

Um zu prüfen welche Einflüsse eine Defizienz von *Tlr4* auf den Hh-Signalweg hat, wurde die Expression der Liganden *Ihh* und *Shh* in isolierten Dünndarmepithelzellen von WT und *Tlr4*-defizienten Mäusen untersucht. Da *Dhh* bislang im Dünndarm nicht konsistent nachgewiesen werden konnte, wurde auf die Untersuchung verzichtet. (102) Im Vergleich zeigen die *Tlr4*-defizienten Mäusen eine geringere Expression beider Liganden. Dieser Trend ist jedoch nur für *Ihh* signifikant. Um das Kontrollexperiment durchzuführen, wurden konventionell-aufgewachsene SPF Wildtypen mit LPS behandelt. TLR4 ist der wesentliche Mustererkennungsrezeptor für LPS. Die mit LPS behandelten Tiere zeigen eine signifikant höhere Expression beider Hh-Liganden. Dieser Effekt war für *Shh* noch ausgeprägter zu beobachten.

### 4.3 LPS-Stimulation verstärkt DUOX2 mRNA Expression und epitheliale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Mikrobiota und einer durch Kolonisierung verstärkten Vaskularisierung der Villusstrukturen zu untersuchen, wurde die DUOX2 und DUOX2 Expression in verschiedenen genetischen Mausmodellen untersucht.

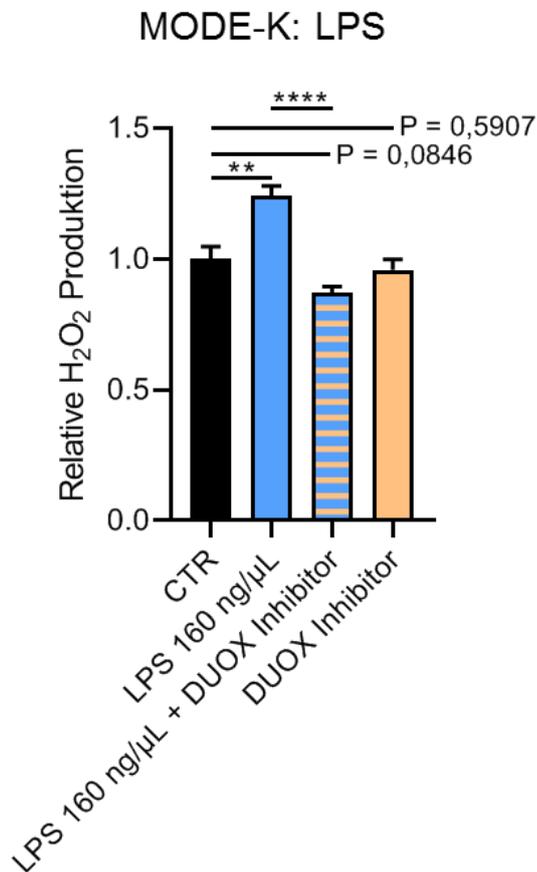


**Abbildung 14: DUOX2 und DUOX2 Expression unter LPS-Behandlung.** Abgebildet ist die relative mRNA Expression von DUOX2 und DUOX2 im Vergleich zu L32 bei **a** konventionell-aufgezogenen Wildtypen ( $n^{Duox2} = 6$ ;  $n^{DuoxA2} = 5$ ) und konventionell-aufgezogenen Wildtypen nach LPS-Behandlung ( $n^{Duox2} = 7$ ;  $n^{DuoxA2} = 5$ ). Die analysierte RNA wurde aus isolierten Epithelzellen gewonnen. **b** konventionell-aufgezogene Wildtypen (*Tlr4fl/fl x Villin-Cre*;  $n = 6$ ) und *Tlr4fl/fl x Villin-Cre*-Tieren ( $n = 5$ ). Die RNA wurde aus dem gesamten Darmgewebe gewonnen. C57BL/6J Mäuse, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert  $\pm$  S.E.M.

Die Expression von DUOX2 und DUOX2 zeigt gegenläufige, jedoch nicht signifikante Trends unter LPS-Behandlung. Die Expression von DUOX2 ist bei den mit LPS behandelten Tieren geringer, hingegen ist die Expression von DUOX2 erhöht.

Die Expression von DUOX2 wurde ebenfalls bei Tieren mit der epithelspezifischen konditionalen Knock-out Mauslinie *Tlr4fl/fl x Villin-Cre* untersucht. Es zeigt sich bei diesen ein nicht signifikanter Trend zu geringerer Expression im Vergleich zu den Wildtypen.

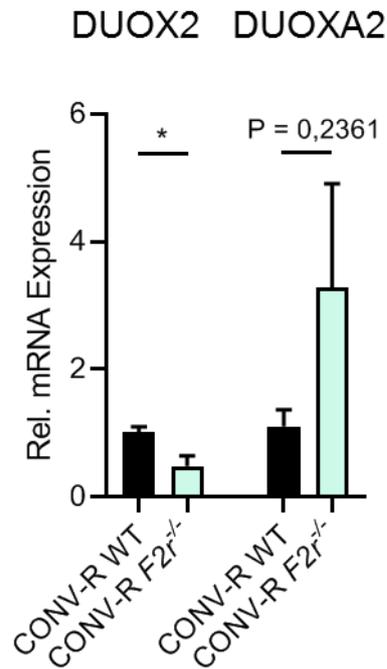
DUOX2 ist ein Enzym, das sich in verschiedenen Geweben des Körpers findet. Es ist ursächlich an der Produktion von ROS beteiligt, insbesondere der Bildung von  $H_2O_2$ . Um einen Zusammenhang der Produktion von ROS mit LPS herzustellen, wurden MODE-K Zellen mit LPS, sowie einem NADPH-Oxidasen Inhibitor (VAS2870) stimuliert.



**Abbildung 15: LPS-induzierte  $H_2O_2$ -Produktion von MODE-K Zellen.** Abgebildet ist die relative  $H_2O_2$ -Produktion von MODE-K Zellen stimuliert mit LPS ( $c = 160 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), mit LPS ( $c = 160 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) und vorbehandelt mit dem Duox-Inhibitor VAS2870 ( $c = 5 \text{ mmol}$ ) oder ausschließlich behandelt mit dem Duox-Inhibitor VAS2870 ( $c = 5 \text{ mmol}$ ) ( $n =$  siehe Anhang), normiert auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe (CTR). T-test, \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\*\* =  $P < 0,001$ .

Die mit LPS stimulierten Zellen zeigen eine signifikant gesteigerte relative Produktion von  $H_2O_2$  gegenüber der Kontrollgruppe. Die mit LPS und dem Duox-Inhibitor VAS2870 stimulierten Zellen zeigen, im Vergleich zu den ausschließlich mit LPS stimulierten Zellen, einen signifikanten Abfall der relativen  $H_2O_2$ -Produktion. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigen die mit LPS und Duox-Inhibitor behandelten Zellen und die ausschließlich mit Duox-Inhibitor behandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied in der  $H_2O_2$ -Produktion.

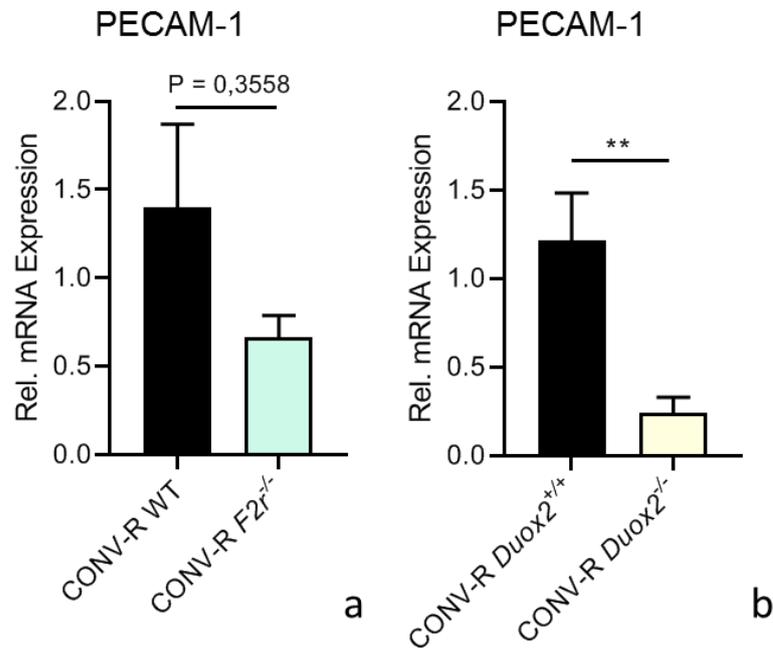
#### 4.4 PAR1-Defizienz ist mit verminderter DUOX2 Expression im Dünndarm assoziiert



**Abbildung 16: DUOX2 und DUOXA2 bei *F2r*-Defizienz.** Abgebildet ist die relative mRNA Expression von DUOX2 und DUOXA2 im Vergleich zu L32 bei konventionell-aufgezogenen Wildtypen ( $n^{Duox2} = 6$ ;  $n^{DuoxA2} = 4$ ) und PAR1-defizienten (*F2r*) Mäusen ( $n^{Duox2} = 6$ ;  $n^{DuoxA2} = 4$ ). C57BL/6J Mäuse, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. T-Test, \* =  $P < 0,05$ .

Die Untersuchungen der Expression von DUOX2 und DUOXA2 im distalen Dünndarm *F2r*-defizienter Mäuse zeigen gegenläufige Resultate. Während DUOX2 in *F2r*-defizienten Mäusen signifikant geringer exprimiert wird, ist ein nicht signifikanter Trend zur gesteigerten Expression von DUOXA2 sichtbar.

#### 4.5 *F2r*<sup>-/-</sup> Mäuse und *Duox2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen verminderte mRNA Expression des vaskulären Markers PECAM-1

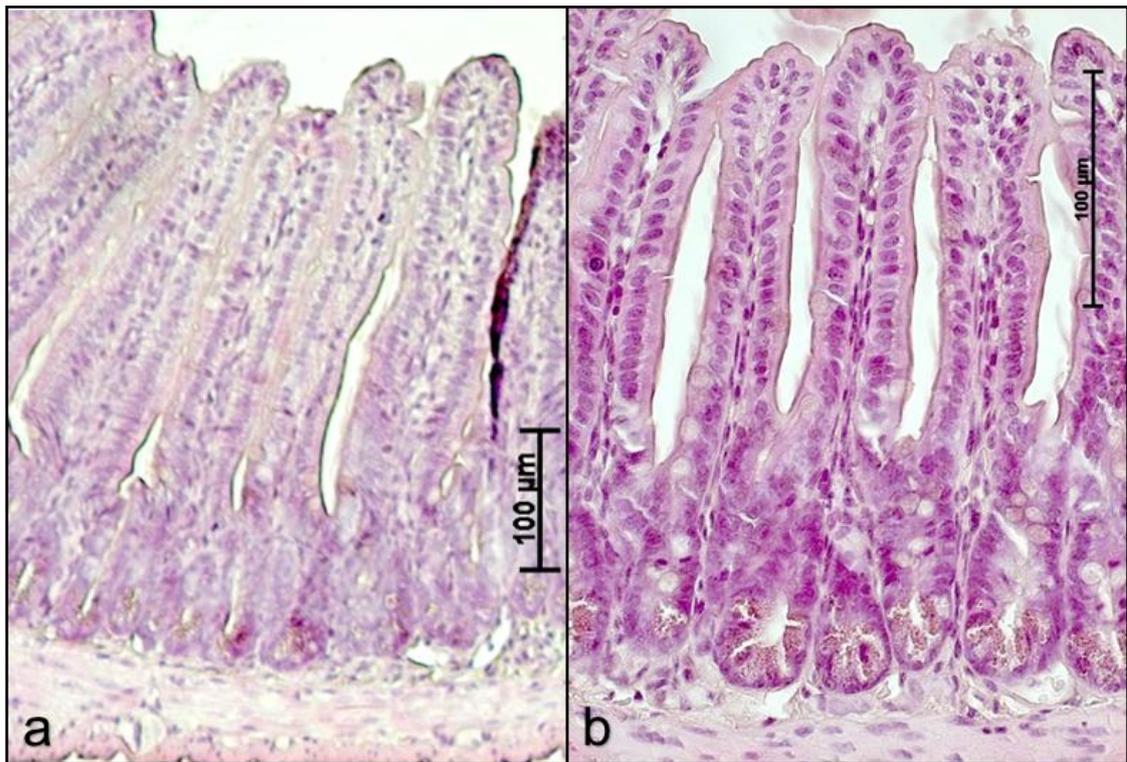


**Abbildung 17: PECAM-1 Expression bei *F2r*- und vollständiger *Duox2*-Defizienz.** Relative mRNA Expression von PECAM-1 im Vergleich zu L32 von konventionell-aufgezogenen Wildtypen (n = 7 in beiden Gruppen) und **a** *F2r*-defizienten Mäusen (n = 3) und **b** *Duox2*-defizienten Mäusen (n = 7). C57BL/6J Mäuse, Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M. \*\* = P < 0,01.

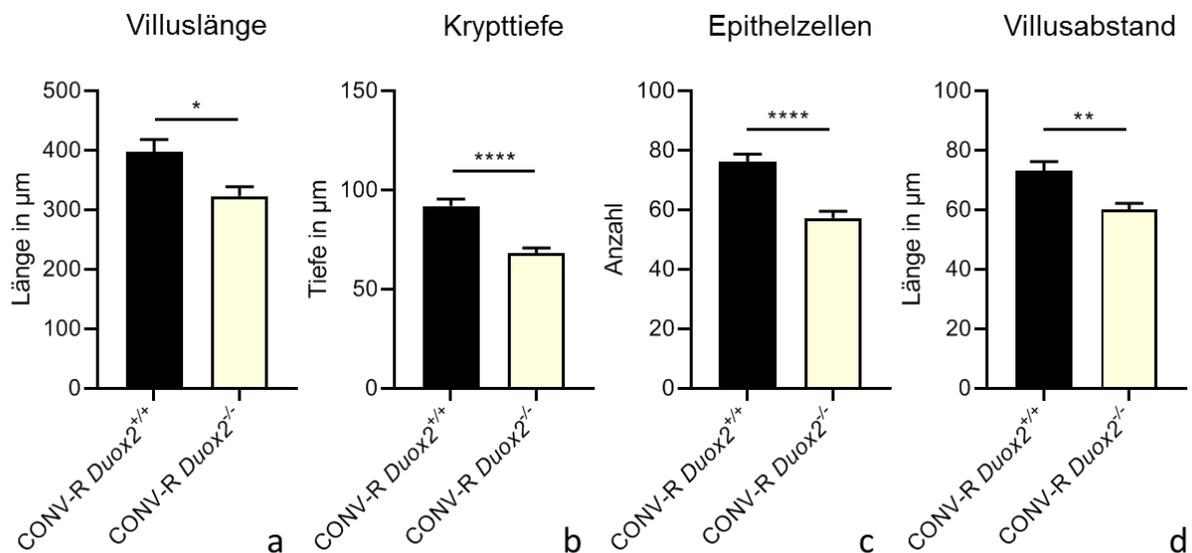
Die *F2r*-defizienten Tiere weisen einen nicht signifikanten Trend zu verminderter Expression des vaskulären Markers PECAM-1 auf. Die *Duox2*-defizienten Mäuse zeigen eine signifikant geringere Expression von PECAM-1 im Vergleich zu den Wildtypen.

#### 4.6 Dünndarmmorphologie von *Duox2*<sup>-/-</sup> Mäusen

Um die morphologischen Auswirkungen einhergehend mit der Defizienz von *Duox2* zu überprüfen, wurden Dünndarmproben von *Duox2*-defizienten Mäusen gewonnen und histologisch aufbereitet. Verglichen wurden diese mit *Duox2*<sup>+/+</sup> Geschwistertieren, welche die Wildtyp-Kontrolle darstellen.



**Abbildung 18: Morphologie des distalen Dünndarms, *Duox2*-defiziente Mäuse.** HE-Färbungen, **a** 200-fache Vergrößerung, **b** 400-fache Vergrößerung. Villusstrukturen von **a** einer konventionell-aufgewachsenen *Duox2*-homozygoter Wildtyp (*Duox2*<sup>+/+</sup>) und **b** einer konventionell-aufgewachsenen *Duox2*-defizienten (*Duox2*<sup>-/-</sup>) Maus. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen.



**Abbildung 19: Veränderungen der Villusmorphologie im Dünndarm *Duox2*<sup>-/-</sup> Mäuse.** Abgebildet sind **a** Villuslänge, **b** Krypttiefe, **c** Zellkerne pro Villuslänge, **d** Villusabstand von konventionell-aufgewachsenen homozygoten Wildtypen (*Duox2*<sup>+/+</sup>) und konventionell-aufgewachsenen *Duox2*-defizienten (*Duox2*<sup>-/-</sup>) Mäusen (n = siehe Anhang, C57BL/6J und *Duox2*<sup>thyd</sup>/J Mäuse). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M. T-test, \* = P < 0,05, \*\* = P < 0,01, \*\*\*\* = P < 0,001. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± S.E.M.

*Duox2*-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zu den Wildtypen starke morphologische Veränderungen im distalen Dünndarm auf (siehe Abb. 18). Alle Werte sind signifikant

verringert. Die Villusstrukturen und Krypten sind kürzer, die Anzahl der Epithelzellkerne ist verringert. Die Abstände der Villusstrukturen sind ebenfalls verringert, die Villi stehen demnach dichter beieinander.

**Tabelle 22: Veränderte Villuslängen-Kernanzahl-Relation in *Duox2*-defizienten Mäusen.**

	<i>Duox2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Duox2</i> <sup>-/-</sup>
Durchschnittliche Villuslänge (µm)	397,28 ± 20,78	323,24 ± 15,8
Durchschnittliche Kernanzahl	76,06 ± 2,65	57,25 ± 2,29
Villuslänge geteilt durch Kernanzahl	5,22	5,65

Konventionell-aufgezogene, homozygote Wildtypen (SPF *Duox2*<sup>+/+</sup>) im Vergleich zu konventionell-aufgezogenen homozygoten *Duox2*-defizienten Mäusen (SPF *Duox2*<sup>-/-</sup>).

Die Anzahl der Zellen in den Villusstrukturen ist bei den *Duox2*-defizienten Mäusen signifikant geringer. Um die Relation zwischen Kernanzahl und Villuslänge zu bestimmen, wurde die durchschnittliche Villuslänge aller Proben durch die durchschnittliche Kernanzahl aller Proben geteilt (siehe Tabelle 22). Die durchschnittliche Kernanzahl ist zwar bei den *Duox2*-defizienten Mäusen signifikant geringer, in Relation gesetzt, findet sich jedoch bei den Wildtypen ein geringeres Zellbreiten-Villuslängen-Verhältnis.

## 5 Diskussion

Die Mustererkennung mikrobieller Komponenten, insbesondere LPS durch TLR4, beeinflusst die Bildung vaskulärer Strukturen innerhalb der Villi des Dünndarms.(13) Über ein bislang nicht bekanntes Signal kommuniziert TLR4 mit PAR1. PAR1 gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche Phospholipasen des Typs C $\beta$  aktivieren.(103) Die Zusammenhänge zwischen Entzündung und Thrombose sind weitläufig und schon seit Jahrzehnten dokumentiert. Die kanonische Aktivierung von PAR1 mittels Thrombin ist Teil der Gerinnungskaskade.(104) Dieser kanonische Weg resultiert in einem Heterotrimer bestehend aus PAR-1 und G $\alpha_q$ , welches zur Aktivierung von MAP Kinase und einer gesteigerten Ca $^{2+}$ -Konzentration führt. Der entzündungssteigernde Effekt ebenso wie die gesteigerte Angiogenese sind bekannt.(97) Bei Verletzungen konnte eine Ausschüttung von Calcium als Trigger für DUOX nachgewiesen werden. Daraus folgt eine Produktion von H $_2$ O $_2$  als Reaktion auf die Verletzung.(105) H $_2$ O $_2$  ist als proangiogener Faktor identifiziert.(67,70) Dieser Signalweg könnte mitverantwortlich für die gesteigerte Angiogenese bei CED sein und einen Zusammenhang zwischen der Bildung vaskulärer Strukturen und der Mikrobiota des Dünndarms darstellen.

### 5.1 Dünndarmmorphologie der *Tlr4*<sup>-/-</sup>-defizienten Mäuse (CONV-R vs. GF)

Morphologieänderungen der Dünndarmhistologie, induziert durch das intestinale Mikrobiom, sind bereits in den frühen 1960er Jahren nachgewiesen worden.(106) Mittels Autoradiographie führten Abrams et al. morphologische Beobachtungen durch. Sie fanden eine verschmälerte Lamina propria mit weniger Zellen des Immunsystems, einen gleichmäßigeren Aufbau des Epitheliums mit ebenfalls weniger Immunzellen und abgeflachten Krypten. Weiterhin werden verkürzte Villusstrukturen von ihnen beschrieben. Ihr Fazit ergibt, dass das Fehlen des Mikrobioms zu kleineren anatomischen Strukturen des Dünndarms in allen Dimensionen führt. Im Vergleich der publizierten histologischen Bilder erkennt man zudem einen größeren Abstand zwischen den einzelnen Villusstrukturen, welcher jedoch nicht näher beschrieben wird.

Um einen Zusammenhang zwischen der bakteriellen Flora und der Regeneration des Dünndarmepithels herzustellen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt. Anhand dieser konnte eine deutlich langsamere Zellproliferation und -migration zur Villusspitze gezeigt werden. In ihrer Theorie wird die Umsatzrate zur

Zellerneuerung nicht durch einen Stimulus aus der Basis der Krypte gestartet, sondern durch einen von Zellverlusten ausgelösten Reiz. Dies konnte später durch das Entdecken von Feedback-Schleifen zur Zellerneuerung bestätigt werden.(29) Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass das Mikrobiom einen wichtigen Reiz für den anatomischen Aufbau, die Regeneration und den Erhalt des Dünndarmepithels darstellt. Der histologische Vergleich verschiedener Parameter der Dünndarmmorphologie von konventionell-aufgezogenen Mäusen im Rahmen dieser Arbeit zeigt Ergebnisse vergleichbar zu denen, die in der Literatur beschrieben werden (siehe Abbildung 11 a-d).(10,80,106,107)

Bislang sind keine grundlegenden Daten mit histologischen Untersuchungen des Dünndarms von konventionell-aufgezogenen oder keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäusen publiziert worden. Die konventionell-aufgezogenen *Tlr4*-defizienten Mäuse zeigen signifikant längere Villi bei ebenfalls signifikant mehr Epithelzellen. Es finden sich signifikant verringerte Villusabstände und tiefere Krypten, welche jedoch kein Signifikanzniveau erreichen, verglichen mit den konventionell-aufgezogenen Wildtypen (siehe Abb. 11b). Diese Ergebnisse ähneln den Versuchen mit konventionell-aufgezogenen oder keimfreien *Tlr2*-defizienten Mäusen der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhardt.(108)

Um ausschließen zu können, dass die höheren Epithelzellzahlen der konventionell-aufgezogenen und keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäuse nur auf den längeren Villusstrukturen beruhen, wurde die durchschnittliche Villuslänge durch die durchschnittliche Kernanzahl geteilt (Tab. 21). Die sinkenden Werte von CONV-R WT zu GF *Tlr4*<sup>-/-</sup> zeigen, dass die Zunahme der Länge nicht auf einer Verbreiterung der Zellen oder der Zell-Zell-Abstände beruht. Auch relativ gesehen nimmt die Anzahl der Zellen bei den längeren Villusstrukturen zu. Die sinkenden Werte deuten sogar auf kleiner oder schmaler werdende Zellen hin. Das Epithel des *Colons* ist beständigem osmotischem Stress ausgesetzt, welcher zur Regulation des Zellvolumens führt.(109) Die Zellen zeigen zudem eine Zellvolumenabnahme vor der Apoptose, welche durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wird. Ebenso werden ungewöhnlich hohe Werte von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Patienten mit CED gefunden.(12,110) Da das Fehlen des Mikrobioms zu geringeren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werten führt, sollten die keimfreien Tiere größere Zellvolumina aufweisen, sofern das Volumen der Dünndarmepithelzellen durch ähnliche Mechanismen wie das der Colonepithelzellen beeinflusst werden kann. Die zugrundeliegenden Prozesse der Wechselwirkungen zwischen Zellvolumenänderungen und Zellüberleben sind bislang

nur spärlich untersucht worden.(111) Daher sollten genauere Untersuchungen des Zellvolumens im Zusammenhang mit entzündlichen Reizen, wie z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werten, stattfinden. Methodische Probleme könnten zu einer Verfehlung der Signifikanz im Vergleich der Krypttiefen konventionell-aufgewachsener Wildtypen und den *Tlr4*-defizienten Mäusen beigetragen haben. Der Übergang von Krypte zu Villus (Nullniveau) ist in HE-Färbungen nicht eindeutig auszumachen und beruht daher auf Erfahrungswerten des Experimentators. Eine genauere Auswertung der Krypttiefen könnte durch die Festlegung einer klaren Grenze als Übergang zum Villus erreicht werden, anstelle der Abschätzung des Nullniveaus. Eine Möglichkeit wäre, das Kompartiment der Transit-amplifying Zellen könnte durch eine Färbung von Wdr43 zu markieren und als Grenze festzulegen.(112) Dies würde zu exakteren Ergebnissen führen.

Die Schnittstelle bestimmt ebenfalls, wie bei allen abgerundeten dreidimensionalen Strukturen in der Histologie, die messbare Tiefe. Dies ist ebenfalls nur über die Menge der ausgewerteten Stellen zu korrigieren. Um eine Pathogenbesiedlung zu verhindern, expandieren bei einem Entzündungsstimulus die Stammzellen mit der Folge einer erhöhten Proliferationsrate.(35) Eine mögliche Erklärung für die längeren Strukturen wäre daher eine veränderte Programmierung der Apoptose, die infolge fehlendem Entzündungsstimulus zu einer längeren Lebensdauer der Zellen, und folglich zu verlängerten Villusstrukturen führt. Wostmann beschreibt für keimfreie Mäuse zwar kürzere Villi, stellt aber die Hypothese auf, dass aufgrund einer höheren Konzentration von Enzymen (z.B. Laktase, Maltase) im Bürstensaum, die Stammzellen weniger stark proliferieren, und die Lebensdauer der Enterozyten deutlich verlängert ist.(83)

Die Villusabstandsmessungen sind ein relativ unspezifisch zu bestimmender Parameter. Es gibt starke Schwankungen bedingt durch die Krümmungen des Darms. Dies wurde über die Anzahl der Messungen versucht auszugleichen. Da die abgebildeten Strukturen dennoch stark vom Schnitt abhängig sind, ist es nicht auszuschließen, dass dies dazu beigetragen hat, dass der Villusabstand in den konventionell-aufgezogenen Tieren bei einer Deletion von *Tlr4* sinkt, und in den keimfreien Tieren bei einer Deletion von *Tlr4* ansteigt.

Die Menge der histologischen Schnitte war aufgrund der nachfolgend beschriebenen Umstände begrenzt. Die Haltung von keimfreien Mäusen ist anspruchsvoll, platzintensiv und teuer, deswegen standen weniger Tiere zur Verfügung. Die Proben

des Dünndarms der keimfreien Tiere waren teilweise bereits durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe entnommen und in Paraffinblöcke eingebettet worden. Für die Herstellung histologischer Schnitte ist jedoch das sorgfältige und vorsichtige Entfernen der Faeces entscheidend. Der Darm muss vorsichtig gespült und darf keinesfalls gequetscht werden. Jede unsachgemäße Berührung kann zur Zerstörung der empfindlichen Villusstrukturen führen. Dies könnte zur mangelhaften Qualität der Schnitte der keimfreien Tiere beigetragen haben. Sowohl die keimfreien, als auch die *Tlr4*-defizienten Mäuse zeigen eine Verlängerung der Villusstrukturen. Bei den keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäusen ist dies am ausgeprägtesten zu beobachten. Die verlängerten Strukturen sind im Prozess der Schnittherstellung besonders anfällig für Beschädigungen. Dies führte ebenfalls zu weniger verwertbaren Schnitten. Diese Problematik ist auf den Abbildungen 10 c und d sichtbar. Da die verwendete Methodik jedoch von der Erfahrung der durchführenden Person abhängig ist und teils auf subjektiven Einschätzungen beruht, wäre eine Wiederholung sinnvoll. Insbesondere verblindete Untersuchungen durch mehrere, histologisch erfahrene Experimentatoren könnten zu einer Steigerung der Qualität beitragen.

Da TLR4 auf verschiedenen Zelltypen des Darms exprimiert wird, wäre es sinnvoll, die histologischen Untersuchungen mit Mäusen des epithelspezifischen Knock-outs von *Tlr4* zu wiederholen, um die Einflüsse des auf den Epithelzellen exprimierten TLR4 auf die morphologischen Parameter zu klären. Aufgrund eingeschränkter Relevanz für diese Arbeit, wurden verschiedene Parameter der Morphologie in dieser Arbeit nicht erhoben, z.B. Dicke der Muscularis, Anzahl der Becherzellen und Proliferationsraten. Dies könnte jedoch für zukünftige Arbeiten relevant sein und wurde durch das Labor von Dr. Reinhardt für andere genetische Mutationen bereits durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation des Toll-like Rezeptors 4 durch die kommensale Flora einen wesentlichen Einfluss auf die Morphologie der Dünndarmvillusstrukturen hat, auch unter Berücksichtigung methodischer Schwierigkeiten. Insgesamt wäre es sinnvoll, die Experimente der Villusmorphologie mit einer größeren Anzahl von Tieren zu wiederholen.

TLR4 wird von verschiedenen Zelltypen im Dünndarm exprimiert. Dazu gehören die Enterozyten, aber auch die darunterliegenden Myofibroblasten und dendritische Zellen.(113,114) Um den direkten Nachweis zu erbringen, dass die Vaskularisierung

durch das Mikrobiom über den auf Enterozyten exprimierten TLR4 weitergeleitet wird, wurde ein Mausmodell mit selektiver, epithelspezifischer *Tlr4*-Deletion verwendet.

PECAM-1 (CD31) ist ein vaskulärer Marker der Angiogenese.(115,116) Entzündungsprozesse verändern die Expression von PECAM-1 nur indirekt über die bei Entzündungen ausgelöste gesteigerte Angiogenese, ein direkter Einfluss ist bislang nicht bekannt.(12) Die Abbildung 12 zeigt die relative Expression von PECAM-1 in Relation zu L32 bei *Tlr4<sup>fl/fl</sup>Villin-Cre*-Tieren im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Wildtypen. Die Expression von PECAM-1 ist bei den Tieren mit epithelspezifischem *Tlr4*-KO verringert. Eine Signifikanz des Wertes wurde verfehlt, da zwei der untersuchten Proben deutlich abwichen, ohne statistische Outlier zu sein. Dies lässt sich am ehesten durch die große Streuung der Werte der Kontrollgruppentiere erklären. Als Kontrollgruppe dienten hier Wurfgeschwister ohne vorhandenen Knock-out. Dieses Ergebnis ist konsistent zu früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhardt.

Die postnatale Regulation der Angiogenese im Dünndarm ist abhängig von den TLR und ihren begleitenden Proteinen (MyD88, TRIF).(93) In ihrer Dissertation in der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhardt, konnte Inês Brandão 2016 zeigen, dass PECAM-1 sowohl in CONV-R *Tlr4*-defizienten Mäusen als auch in keimfreien Wildtypen gegenüber CONV-R Wildtypen herunter-reguliert ist.(11) Der auf den Enterozyten exprimierte TLR4 und seine Stimulation durch das Mikrobiom sind somit wesentlich an der Vaskularisierung der Villusstrukturen des Dünndarms beteiligt. Dies konnte durch die Verwendung einer epithelspezifischen Knock-out Mauslinie bewiesen werden.

Für zukünftige Experimente wäre es hier interessant, immunhistochemische Färbungen von Dünndarmschnitten anzufertigen, um die Expression von PECAM-1 auch auf histologischer Ebene zeigen und messen zu können. Ebenso sollte die qPCR wiederholt werden, um eine mögliche Signifikanz darzustellen.

Bei Patienten mit CED wurden im Darmepithel höhere Expressionswerte von TLR, insbesondere TLR4 und seinem Co-Rezeptor MD2, gefunden. Dies wird vermutlich durch entzündungsbedingt steigende Werte von proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise TNF oder Interferone, induziert.(52) Ebenso kommt es durch Unterbrechungen des Epithelsaumes zu vermehrtem Kontakt der Gefäße der Darmmukosa mit der intestinalen Mikrobiota. Dies stimuliert die Prozesse der

Angiogenese durch die Weiterleitung über PRRs.(13) Die verringerte Expression von PECAM-1 in den *Tlr4<sup>fl/fl</sup>Villin-Cre*-Mäusen stimmt mit diesen Erkenntnissen überein.

## 5.2 *Tlr4*-abhängige Regulation der Expression von Hedgehog Liganden

Zusätzlich zu den bekannten Veränderungen in der Morphologie des Dünndarms keimfreier Mäuse, konnten, wie in Kapitel 4.1 dargestellt, weitere morphologische Veränderungen durch die Deletion von *Tlr4* in An- und Abwesenheit des Mikrobioms gezeigt werden. Das Gleichgewicht der Regeneration des Darmepithels wird maßgeblich durch die Interaktionen der Signalwege Hedgehog, Bone morphogenetic und Wnt beeinflusst. Dieses Zusammenspiel ist bereits intensiv untersucht worden.(35,37,117) Sowohl *Tlr4* als auch die Hh-Signalwege stehen in Zusammenhang mit CED.(52,118) Fraglich ist, in welchem Zusammenhang die Morphologieänderungen durch die Deletion von *Tlr4* mit denen der Abwesenheit des Mikrobioms stehen. Aufbauend auf Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wurde TLR4 als potenzieller Rezeptor ausgemacht, der die Signale des intestinalen Mikrobioms weiterleitet und so morphologische Änderungen des Dünndarmepithels beeinflusst.

Die bisherigen Ergebnisse von Inês Brandão zeigen verminderte Expressionswerte der TLR4 Downstream-Targets Gli1 und Smo in CONV-R *Tlr4*-defizienten Mäusen im Vergleich zu CONV-R Wildtypen und GF Wildtypen im Vergleich zu CONV-R Wildtypen.(11) Insgesamt konnte durch die Arbeitsgruppe von Dr. Reinhardt gezeigt werden, dass TLR4 und TLR5 als Rezeptoren der Induktion der Morphologieänderungen über Hh in Frage kommen, die Induktion über das Mikrobiom und TLR5 jedoch unwahrscheinlich erscheint. TLR4 bleibt daher als mutmaßliche Komponente übrig.

Die untersuchten Hh-Ligand Ihh und Shh zeigen sich in *Tlr4*-defizienten Mäusen gegenüber Wildtypen vermindert exprimiert (Abb. 13 a). LPS ist ein potenter Ligand für TLR4. Im Kontrollexperiment wurde daher die Expression von Ihh und Shh bei mit LPS behandelten CONV-R Wildtypen untersucht. Die Expressionswerte beider Liganden sind signifikant gesteigert (Abb. 13 b).

Die verminderte Expression bei den *Tlr4*-defizienten Mäusen und die gesteigerte Expression bei den mit LPS behandelten Mäusen lassen auf eine Regulation dieser Faktoren durch das intestinale Mikrobiom schließen. Fehlfunktionen des

Hh-Signalweges führen zu einer gestörten Reaktion auf gastrointestinale Infektionen, und bei Tieren zu erhöhten Mortalitätsraten. Zum einen kommt es durch den gestörten Signalweg zu einer morphologischen Änderung, zum anderen jedoch auch zu einer gestörten Resilienz gegenüber Pathogenen im intestinalen Lumen durch eine insuffiziente oder fehlende ROS-Produktion.

Störungen des Hh-Signalweges treten auch bei weiteren entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes auf, beispielsweise dem Barrett-Oesophagus und chronischer Gastritis.(119) Auch Krebsarten wie Leukämie und Lungen-, Brust-, Leber- und Pankreaskrebs gehen unter anderem mit einer Störung des Hh-Signalweges einher. Entdeckt wurde dies über die Identifizierung einer genetischen Mutation bei Patienten mit dem Gorlin-Goltz-Syndrom.(36) Dieses Syndrom beschreibt Patienten mit einer Häufung von odontogenen Zysten, Skelettfehlbildungen und multipel auftretenden Basalzellnävii. Durch den Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens PTCH1 entarten diese häufiger als gewöhnlich und führen zu Basalzellkarzinomen.(120) Das Basalzellkarzinom ist einer der häufigsten malignen Tumoren.(121) Verschiedene Mutationen führen zur Reaktivierung des Hh-Signalweges, welcher die Entartung der Zellen hervorruft. Hh-Inhibitoren, wie Vismodegib, stellen seit wenigen Jahren eine Alternative zur herkömmlichen invasiven Behandlung dar.(122) Hieraus gewonnene Erkenntnisse wären für die Krebsforschung von großer Bedeutung, da der Hh-Signalweg in vielen Krebsarten eine fälschliche Aktivierung erfährt.(36,117,123) Zudem könnten diese Erkenntnisse einen weiteren Zusammenhang zwischen CED und dem erhöhtem Risiko, an kolorektalem Krebs zu erkranken herstellen.

Zusammengefasst lässt sich durch diese Ergebnisse erstmals zeigen, dass die Morphologie des Dünndarms durch das Mikrobiom (gezeigt durch den Vergleich von CONV-R vs. GF und CONV-R vs. mit LPS stimuliert) und TLR4 und seine Downstream-Targets (gezeigt durch die Vergleiche von konventionell-aufgezogenen und keimfreien *Tlr4*-defizienten Mäusen und ihre Kontrollgruppen) beeinflusst wird.

Methodische Ungenauigkeiten lassen sich bei diesen Experimenten nicht vollständig ausschließen. So zeigt beispielsweise die Vergleichsgruppe der CONV-R Wildtypen in der Untersuchung auf die Ihh-Expression eine große Streuung. Bei der Expression von Shh wurde eine Signifikanz verfehlt. Die geringen Expressionswerte von Shh im adulten Dünndarm werden zu diesen instabilen Ergebnissen beigetragen

haben.(35,102) Wünschenswert wäre es, diese Versuche zu wiederholen, um eine sichere Statistik zu gewährleisten. Ebenso wäre es sinnvoll, auch hier weitere Downstream-Targets, beispielsweise Gli1, zu überprüfen. Um eine Weiterleitung des Signals über die Enterozyten zu sichern, könnten die Experimente mit epithelspezifischen Knock-out Mäusen wiederholt werden.

### **5.3 LPS-Stimulation verstärkt DUOX2 mRNA Expression und epitheliale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung**

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Kolonisierung des Darms mit einer Mikrobiota zu einer gesteigerten DUOX2-Expression führt.(62) Dies geschieht über eine Aktivierung der Hh-Signalwege im Darmepithel. Die Besiedlung durch ein Mikrobiom führt aufgrund der bakteriellen Zerfallsprodukte zu steigenden LPS-Werten. Der im Darm vorhandene TLR4 ist wesentlich für die Erkennung von LPS. Durch Stimulation von CONV-R WT Mäusen mittels LPS sollte eine mögliche Signaltransduktion über TLR4, insbesondere den auf den Enterozyten exprimierten TLR4, untersucht werden.

Die mit LPS behandelten Mäuse zeigten eine geringere Expression von DUOX2 als die unbehandelte Vergleichsgruppe. Gegenläufig verhält sich hier die Expression von DUOX2A2, welche bei den mit LPS behandelten Tieren ansteigt, jedoch kein Signifikanzniveau erreicht (Abb. 14 a). Die Expression von DUOX2 wurde ebenfalls bei Mäusen mit dem epithelspezifischen Knock-out von *Tlr4* untersucht. Hier zeigt sich ebenfalls eine verminderte Expression im Vergleich zu den WT Mäusen (Abb. 14 b).

Zu erwarten war eine gleichmäßig gesteigerte Expression von DUOX2 und DUOX2A2, da sie als Tandem vorliegen und sich einen bidirektionalen Promotor teilen.(73) Zudem handelt es sich um Cofaktoren, welche nur gemeinsam in der Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirksam werden. In Zellkulturversuchen mit Pankreastumorzellen von Wu et al. konnten nach Stimuli durch LPS und IFN- $\gamma$  oder der Kombination aus beidem unterschiedliche starke Expressionswerte für DUOX2 und DUOX2A2 beobachtet werden. Der höhere Wert ist hier gleichermaßen bei DUOX2A2 zu beobachten.(124) Bei Grasberger et al. findet man ebenfalls in unterschiedlichem Maße gesteigerte relative Expressionswerte für DUOX2 und DUOX2A2.(19) Aufgrund der gemeinsamen Position im Genom wäre eine simultan erhöhte Expression beider Faktoren zu

erwarten. Diese in verschiedenen Experimenten beobachtete Differenz sollte in Zukunft genauer untersucht werden.

Die geringere Expression von DUOX2 der *Tlr4fl/flxVillin-Cre*-Mäuse liegt im Rahmen unserer Erwartungen. Das Fehlen des auf die luminale Seite sortierten TLR4 auf den Enterozyten kann die Signale der intestinalen Mikrobiota nicht weiterleiten. Dieses fehlende Signal führt zu einer geringeren Reaktion auf die kommensale Mikrobiota. In Experimenten für ihre Bachelor-Thesis konnte Julia Mohr aus der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhardt 2018 zeigen, dass die Gabe von Antibiotika zu einer geringeren Expression von DUOX2 und DUOXA2 führt (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese geringeren Expressionswerte deuten darauf hin, dass *Duox2* durch *Tlr4* reguliert wird. Die Regulation von *DuoxA2* bleibt unklar. Die Untersuchung der Expressionswerte von DUOXA2 mit denselben Proben erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse. Ein Vergleich der Expressionslevel von DUOX2 und DUOXA2 von antibiotikabehandelten oder keimfreien Mäusen mit denen von *Tlr4fl/flxVillin-Cre*-Mäusen könnte die These der Weiterleitung der Signale des Mikrobioms über den auf Enterozyten exprimierten TLR4 stärken.

MODE-K Zellen stellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung des Verhaltens von Enterozyten dar.(101) Durch die Stimulation mittels LPS kann die Anwesenheit von Pathogenen simuliert werden. Eine wichtige Quelle des im Dünndarm produzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist DUOX2.(18) Im Mausmodell führt eine Stimulation mit LPS zu einer gesteigerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion.(75)

Die mit LPS stimulierten MODE-K Zellen zeigen eine vermehrte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion (Abb. 15). Diese kann durch VAS2870 effektiv gehemmt werden. VAS2870 ist ein unspezifischer Hemmer der NADPH-Oxidasen.(125) Eine verminderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch die Hemmung von *Duox1* und *Duox2* durch VAS2870 im Zebrafischmodell konnte nachgewiesen werden.(126) Es scheint keinen direkten hemmenden oder stimulierenden Effekt auf die MODE-K Zellen durch VAS2870 zu geben, da die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der von unbehandelten Zellen ähnelt. Bei VAS2870 handelt es sich um ein Triazolpyrimidin, dessen genaue Zieldomäne bislang nicht ermittelt werden konnte.(125) Die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Dünndarm durch NOX1 ist nachgewiesen, scheint jedoch wesentlich von DUOX2 abhängig zu sein.(76,127) Da durch die Stimulation mit LPS und die gleichzeitige Hemmung mit VAS2870 die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen absinkt, ist eine Hemmung

weiterer NADPH-Oxidasen, wie z.B. NOX1, in den MODE-K Zellen möglich. Dieser Effekt ist jedoch nicht statistisch signifikant. Pircalabioru et al. konnten Zusammenhänge zwischen DUOX2 und NOX1 beschreiben. Die normalerweise im Falle einer Entzündung geschehende Hochregulation von *Duox2* wurde durch die Inaktivierung von *Nox1* deutlich abgeschwächt.(77)

Die Beeinflussung des Mikrobioms zum Erhalt einer stabilen, pathogenfreien Darmflora geschieht unter anderem durch die Ausschüttung von ROS. Eine Übermäßige Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu oxidativem Stress für die Enterozyten.(125,127) Zudem ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als pro-angiogener Faktor bekannt.(12,67,70) Ein aus dem Gleichgewicht geratenes System der ROS würde also zu allen bekannten Problematiken der CED beitragen; Störungen der Angiogenese, der Barrierefunktion der Enterozyten und des Darmmikrobioms. Fehlfunktionen von verschiedenen, ROS-produzierenden NADPH-Oxidasen, insbesondere DUOX2, wurden bei CED und besonders früh beginnender CED beobachtet.(110,127) Dieser Aspekt verdient daher eine gründliche Betrachtung für zukünftige Therapieoptionen der CED, mit den NADPH-Oxidasen als potenziellem Ziel.

#### **5.4 PAR1-Defizienz ist mit verminderter DUOX2 Expression im Dünndarm assoziiert**

*F2r*-defiziente Mäuse exprimieren den Transmembranrezeptor PAR1 nicht. PAR1 hat eine Vielzahl von Funktionen und ist besonders für seine Rolle in der Hämostase im Zusammenspiel mit EPCR (Endothelial Protein C Receptor) bekannt (siehe Kapitel 2.4.3). Durch verschiedene Signalwege greift PAR1 jedoch auch in Metastasierungs-, Vaskularisierungs-, und sowohl entzündungshemmende als auch -stimulierende Prozesse ein. Auch der Einfluss des Mikrobioms auf PAR1 und daraus resultierende Vaskularisierungsprozesse konnten bereits gezeigt werden.(96) Um ein mögliches Zusammenspiel von PAR1 mit dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Komplex aus DUOX2 und DUOXA2 zu prüfen, wurden *F2r*-Knock-out-Mäuse auf die relative mRNA Expression dieser Faktoren untersucht.

Die *F2r*-defizienten Tiere zeigen eine signifikant verringerte Expression von DUOX2. Die Expression von DUOXA2 hingegen ist deutlich gesteigert. Aufgrund großer Streuung innerhalb der *F2r*-Tiere verfehlt dieser Wert jedoch eine Signifikanz (Abb. 16). Dieses Ergebnis erscheint parallel zur Untersuchung der Expression von

DUOX2 und DUOXA2 bei mit LPS behandelten Mäusen (siehe Kapitel 4.3). Auch hier zeigte sich eine verringerte Expression von DUOX2 bei einer gleichzeitig gesteigerten Expression von DUOXA2.

PAR1 wird durch das Mikrobiom beeinflusst.(10) Das Mikrobiom stellt potenziell immer einen entzündlichen Reiz dar, durch welchen die Produktion von Thrombin induziert wird. Eine durch diesen Stimulus ausgelöste  $Ca^{2+}$ -Produktion konnte nachgewiesen werden.(128) Fehlt diese Stimulation, kann Calcium wiederum die Expression von DUOX2 nicht bewirken. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die geringere Expression von DUOX2 in den PAR1-negativen Mäusen. Erwartet wurde eine geringere Expression von DUOX2 und DUOXA2. Die Expression von DUOXA2 verhielt sich jedoch auch hier wieder gegenläufig und war nicht verringert, sondern erhöht (siehe 5.3). Diese gegenläufige Expression sollte durch Wiederholung der Experimente bestätigt werden und bedarf weiterer Analysen, da sie sich gegenläufig zum bekannten Muster verhält. Falls weitere Untersuchungen die gegenläufige Expression bestätigen, stellt dies eine mögliche Erklärung für das Ungleichgewicht des Darmmikrobioms dar. Eine mangelhafte  $H_2O_2$ -Produktion würde zu einer gestörten Reaktion auf Pathogene oder einer übermäßigen Vermehrung kommensaler Bakterien beitragen.

Die vermehrte Expression von NADPH-Oxidasen in Malignomen führt durch eine Überproduktion von ROS zu oxidativem Stress. Die Hemmung dieser Überexpression stellt daher ein potenzielles Target für Krebsmedikationen dar.(21,67)

### **5.5 *F2r*<sup>-/-</sup> Mäuse und *Duox2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen verminderte mRNA Expression des vaskulären Markers PECAM-1**

Um ein mögliches Downstream-Signal, welches über PAR1 zu einer verstärkten Vaskularisierung des Dünndarms führt, zu identifizieren, wurden Mäuse mit der Defizienz von PAR1 und *Duox2* auf die Expression des vaskulären Markers PECAM-1 untersucht.

Sowohl die *F2r*-Mäuse mit der Defizienz von PAR1 (Abb. 17 a) als auch die *Duox2*-defizienten Mäuse (Abb. 17 b) zeigen eine verringerte mRNA Expression von PECAM-1. Die *Duox2*-defizienten Tiere zeigen eine signifikant verringerte Expression. Als Kontrolle dienten hier die homozygoten Wildtypen-Geschwistertiere, da bereits die

Deletion von *Duox2* auf einem Allel deutliche Einflüsse zeigt.(127) Die *F2r*-defizienten Tiere zeigen eine verringerte, jedoch nicht das Signifikanz-Niveau erreichende Expression von PECAM-1. Das Verfehlen einer Signifikanz ist hier vermutlich an der großen Streuung der Vergleichsgruppe (Wildtypen) gescheitert. Als CONV-R WT Vergleichsgruppe wurden die *F2r<sup>+/+</sup>* Geschwistertiere verwendet. Die Werte dieser Proben wiesen eine starke Streuung auf. Um eine Sicherung der Verringerung der Expression von PECAM-1 zu erreichen, und möglicherweise zu einer Signifikanz zu gelangen, sollten diese Versuche mit neuen Proben wiederholt werden. Eine Wiederholung des Versuches mit denselben Proben führte zu nicht verwertbaren Ergebnissen. Dies könnte auf einer möglichen Verunreinigung oder anderweitigen Störung der sensiblen RNA-Proben beruhen. Die verringerte Vaskularisierung sollte in Zukunft auf mikroskopischer Ebene mittels Untersuchung von PECAM-1 durch immunhistochemische Methoden überprüft werden.

Beide untersuchte Rezeptoren reagieren sensibel auf die intestinale Mikrobiota und beeinflussen so die Vaskularisierung des Darms.(10,18) Versuche von Reinhardt et al. konnten für PAR1 zeigen, dass diese Einflussnahme ausschließlich auf PAR1 und nicht PAR2 in der Kombination mit Thrombin beruht und nach der Phosphorylierung von TF stattfindet. Eine verringerte Vaskularisierung passt in unsere These, dass die Weiterleitung eines pro-angiogenetischen Signals durch das Mikrobiom über PAR1 und DUOX2 erfolgt.

## 5.6 Dünndarmmorphologie von *Duox2<sup>-/-</sup>* Mäusen

Der Phänotyp von homozygoten *Duox2<sup>thyd</sup>/J* Mäusen unterscheidet sich wesentlich von dem ihrer heterozygoten Geschwister oder von Wildtyp-Mäusen, wie durch Johnson et al. 2007 beschrieben wurde. *Duox2<sup>thyd</sup>/J* Mäuse sind deutlich kleiner als Wildtypen, zeigen ein weniger mineralisiertes Skelett und ein beeinträchtigtes Hörvermögen.(129) Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass der Dünndarm von *Duox2<sup>thyd</sup>/J* Mäusen eine vergleichbare Länge zu dem von Wildtypen hat, dabei jedoch deutlich dünner und fragiler erscheint.<sup>1</sup> Vorversuche zur Auswertung der Villusmorphologie mit einer geringeren Anzahl an Tieren wurden bereits durch Julia Mohr aus unserer Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer Bachelorthesis durchgeführt.

---

<sup>1</sup> Bachelorthesis Julia Mohr

Um eine statistisch sichere Auswertung zu bekommen, und die Trends zu möglicherweise signifikanten Ergebnissen zu führen, wurden die Versuche hier mit einer größeren Anzahl von Tieren wiederholt. Die *Duox2*<sup>thyd/J</sup> Mäuse zeigen kürzere Villi mit weniger Epithelzellen, die dichter beieinanderstehen und stark abgeflachte Krypten haben (siehe Abb. 19 a-d). Diese Ergebnisse gestalteten sich entsprechend der Erwartungen.

Um ausschließen zu können, dass die geringeren Epithelzellzahlen der *Duox2*<sup>thyd/J</sup> Mäuse nur auf den verkürzten Villusstrukturen beruhen, wurde auch hier die durchschnittliche Villuslänge durch die durchschnittliche Kernanzahl geteilt (Tab. 22). Der vergrößerte Wert zeigt, dass die Abnahme der Länge nicht auf verschmälerten Zellen oder Zell-Zell-Abstände beruht. Auch relativ gesehen nimmt die Anzahl der Zellen bei den verkürzten Villusstrukturen ab.

Die Besiedlung von keimfreien Tieren mit einer Mikrobiota, ebenso wie künstlich induzierte Darmentzündungen, führen zu einer vermehrten Expression von DUOX2.(18) Die Mäuse in unserer Tierhaltung sind keinen Pathogenen, aber ihrer natürlichen Mikrobiota ausgesetzt. Auch das kommensale Mikrobiom kann bei einer übermäßigen Vermehrung zu pathologischen Veränderungen führen. Um dies zu verhindern, wird eine ständige Abwehr benötigt.(130) Gewährleistet wird diese unter anderem durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierende NADPH-Oxidase DUOX2 (siehe Kapitel 2.3.4). Eine mukosale Dysbiose führt ebenfalls zur gesteigerten Expression von DUOX2.(19) Wie in Kapitel 4.1 gezeigt und in der Literatur beschrieben, führt ein fehlender Stimulus durch das Mikrobiom zu verlängerten Villusstrukturen. Ein Ausbleiben der Abwehr auf die kommensale Mikrobiota könnte so im Umkehrschluss zur Verkürzung der Villusstrukturen führen. Die Deletion von *Duox2* könnte hier einen pro-inflammatorischen Phänotyp bewirken.(77) Konstante Entzündungsprozesse, wie z.B. im Rahmen einer Zöliakie, führen ebenfalls zum klinischen Bild der Zottenatrophie.(24) Eine Untersuchung auf erhöhte Entzündungsmarker, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , könnte diese Hypothese stützen.

Keimfreie Tiere zeigen eine verlangsamte Regenerationsrate des Darmepithels.(83) Bewiesen ist, dass durch eine erhöhte Erneuerungsrate der Zellen ein Eindringen von Pathogenen verhindert wird.(130) Möglicherweise werden andere Prozesse, wie die sonst homöostatische Regeneration des Dünndarmepithels, beschleunigt, um die

Pathogenabwehr zu verstärken. Untersuchungen bezüglich der Proliferationsraten von *Duox2*-defizienten Tieren könnten hier aufschlussreich sein.

Gleichermaßen möglich ist, dass die morphologischen Änderungen durch den Mangel an Schilddrüsenhormonen hervorgerufen werden. DUOX2 ist essenziell an der Bildung dieser Hormone beteiligt (siehe Kapitel 2.3.4). Nach ihrer Resorption aus dem Blut und der Umwandlung in ihre aktive Form lösen die Schilddrüsenhormone eine Stoffwechselsteigerung aus. Dies geschieht über einen erhöhten Lipid-, Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel, sowie eine vermehrte Expression der Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (ATPase).(131,132) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist ebenfalls als Botenstoff für die Zellproliferation und das Zellwachstum wichtig. Durch Modifikation von Signalmolekülen kann es direkten Einfluss auf die betreffenden Zellen nehmen.(133) Die durch einen Mangel ausgelöste Gedeihstörung könnte auch den Dünndarm betreffen und zu einem Minderwuchs führen. In Versuchen an Masthühnern konnte durch die Injektion von Bifidobakterien in den Dottersack eine Erhöhung der Schilddrüsenhormone beobachtet werden. Diese ging mit der Verlängerung der intestinalen Villusstrukturen einher.(134)

Die Aufzucht der *Duox2*<sup>thyd/J</sup> Mäuse gestaltete sich schwierig. Um eine Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden ausschließlich Tiere ähnlichen Alters verwendet. Vermutlich bedingt durch die kongenitale Hypothyreose überlebten weniger homozygote *Duox2*<sup>thyd/J</sup> Mäuse als ihre heterozygoten oder *Duox2*<sup>+/+</sup> Geschwister bis zu einem Alter von mindestens 6 Wochen. Zudem wurden die Tiere vom Tierpflegepersonal aufgrund ihres mangelhaften Wachstums häufig fälschlich als Kümmerer identifiziert, welche aus tierschutzgründen sofort euthanasiert wurden.

Die Hypothyreose beim Menschen ist gründlich untersucht. Die kongenitale, schwere Form der unbehandelten Hypothyreose beim Menschen wird als Kretinismus bezeichnet. Säuglinge werden daher auf das Schilddrüsenhormon TSH (Thyroidea-stimulierendes Hormon) untersucht, um ein Vollbild der Erkrankung zu vermeiden. Unbehandelte Erkrankte zeigen parallel zu den Mäusen Gedeihstörungen und schwere Hörproblematiken. Weitere Symptome sind Apathie, Hypothermie, Makroglossie und Obstipation. Die Therapie besteht in einer Substitution von Schilddrüsenhormonen.(131)

Für zukünftige Versuche wäre ein Vergleich weiterer beim Menschen beobachteter Symptome mit denen der *Duox2*<sup>thyd/J</sup> Mäusen interessant. Zudem könnte versucht werden, die Mäuse mit einer Substitution von Schilddrüsenhormonen länger am Leben zu erhalten. Bei Gelingen einer Substitution, sollten weitere Vergleiche der Anatomie und Histologie des Dünndarms erfolgen. So könnte ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der Schilddrüsenhormone zu den beobachteten morphologischen Veränderungen führt. Diese Ergebnisse könnten Patienten mit kongenitaler Hypothyreose zugutekommen, da hier bereits Fälle mit genetischen Pathologien von *Duox2* beschrieben wurden.(135,136)

## 6 Zusammenfassung

Eine Reihe von Krankheiten mit steigenden Inzidenzen in den Industrienationen sind mit wesentlichen Veränderungen der Histologie, Vaskularisierung und Zusammensetzung der Mikrobiota assoziiert. Dazu gehören die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Während Zusammenhänge zwischen Entzündung und Vaskularisierung schon lange bekannt und dokumentiert sind, ist der Einfluss des Mikrobioms auf die Gesundheit ein relativ neuartiges Thema. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren sind viele Aspekte bisher unklar. Die Induktion der Angiogenese im Dünndarm durch das Mikrobiom über PAR1 konnte bereits nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, weitere Zusammenhänge zwischen TLR4 und DUOX2 in der mukosalen Angiogenese aufzudecken.

Mittels Mausmodell und genetischer Analysen konnten verschiedene Zusammenhänge entlang unseres hypothetischen Signalweges aufgezeigt werden. Entscheidend hierfür waren histologische Analysen der untersuchten Mausmodelle und Untersuchungen genetischer Expressionsmuster mittels quantitativer PCR.

Der Mustererkennungsrezeptor TLR4 reagiert auf bakterielle Komponenten der kommensalen Flora und möglicher Pathogene. In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss des Toll-like Rezeptors 4 auf die Morphologie des distalen Dünndarms im konventionellen und keimfreien Mausmodell beschrieben. Durch die Deletion von *Tlr4* durchläuft die Dünndarmmukosa signifikante Veränderungen, beispielsweise die Verlängerung der Villusstrukturen mit relativ erhöhten Epithelzellzahlen. Diese Ergebnisse weisen Parallelen zu den Untersuchungsergebnissen keimfreier Mäuse auf. Das intestinale Mikrobiom und die Erkennung dieses durch TLR4 sind entscheidend für den regelrechten Aufbau der Dünndarmmukosa.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Inês Brandão wurde der Einfluss von *Tlr4* auf die Vaskularisierung der Mukosa untersucht. Augenmerk wurde hier insbesondere auf den durch das Epithel exprimierte TLR4 gelegt. Es konnte nicht endgültig bestätigt werden, dass ausschließlich TLR4 verantwortlich für die Veränderungen ist, jedoch zeigt sich eine starke Tendenz.

Die morphologischen Einflüsse der Hh-Liganden auf die Bildung der Dünndarmmukosa sind bereits in früheren Arbeiten untersucht worden. Durch qPCR

Analysen im *Tlr4*-defizienten Mausmodell konnten hier Zusammenhänge zwischen diesen Signalwegen dargestellt werden.

Auch morphologische Änderungen durch die Deletion von *Duox2* im Mausmodell wurden nochmals eingehender untersucht. Die Deletion von *Duox2* führte zu statistisch signifikanten Veränderungen der Dünndarmmukosa. Dies führt zu einer gestörten Abwehrreaktion auf kommensale und pathogene Mikroorganismen. Ob die morphologischen Veränderungen ausschließlich durch die Deletion ausgelöst werden, oder durch die fehlende Abwehrreaktion bedingt sind, konnte nicht abschließend geklärt werden. Ein keimfreies *Duox2*-Knock-out-Mausmodell könnte zur Aufklärung dieser These beitragen.

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der gestörten Vaskularisierungsprozesse im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen beitragen. Dies geschieht durch genauere Kenntnisse der Interaktion verschiedener Signalwege, welche an den morphologischen Veränderungen und der Vaskularisierung im Dünndarm beteiligt sind.

Die Forschung im Bereich der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist ein komplexes Feld, mit vielen unterschiedlichen Erklärungsansätzen zu Ätiologie und Pathogenese. Um die verschiedenen Theorien im Bereich der histologischen Abweichungen, gestörten Vaskularisierung und des veränderten Mikrobioms zusammen zu bringen, wird noch viel Forschung notwendig sein. Dies verspricht jedoch zukünftig bessere Therapieansätze durch eine holistische Betrachtung der Problematik.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Castiglione F, Diaferia M, Morace F, Labianca O, Meucci C, Cuomo A, et al. Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the "hygiene hypothesis": A case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *J Crohn's Colitis*. 2012;6(3):324–9.
2. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V. (DGVS). S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn." [Internet]. 09/2014 [zitiert am 15.05.2020] URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/021-004.html>
3. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V. (DGVS). Leitlinie "Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa" [Internet]. 03/2020 [zitiert am 15.06.2020] URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/021-009.html>
4. Zeuzem S. Dickdarm. In: Arastéh K, Baenkler H, Bieber C, et al., Hrsg. *Duale Reihe Innere Medizin*. 3., Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012: 534-559. DOI: 10.1055/b-002-5209
5. Siegmund B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: Suttrop N, Möckel M, Siegmund B et al., Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19., Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2016: 2807-2828
6. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*. 2016;65(2):330–9.
7. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, Arcangelis A De, Haesler R, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(2):700–11.
8. Proctor L, LoTempio J, Marquitz A, Daschner P, Xi D, Flores R, et al. A review of 10 years of human microbiome research activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007-2016. *Microbiome*. 2019;7(1):31.
9. Stappenbeck TS, Hooper L V., Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15451–5.
10. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Östergren-Lundén G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*. 2012;483(7391):627–31.
11. Brandão I. Gut microbiota activate Toll-like receptor 4 to trigger vascularization and BMP2 signalling in the murine small intestine [Dissertation]. Mainz: Fachbereich der Biologie der Johannes Gutenberg-Universität; 2016.
12. Chidlow JH, Shukla D, Grisham MB, Kevil CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: New ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1):G5–18.
13. Schirbel A, Rebert N, Sadler T, West G, Rieder F, Wagener C, et al. Mutual Regulation of TLR/NLR and CEACAM1 in the Intestinal Microvasculature:

- Implications for IBD Pathogenesis and Therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(2):294–305.
14. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One.* 2011;6(1):e16393.
  15. Lucas López R, Grande Burgos MJ, Gálvez A, Pérez Pulido R. The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review. *APMIS.* 2017;125(1):3–10.
  16. Grasberger H, El-Zaatari M, Dang DT, Merchant JL. Dual oxidases control release of hydrogen peroxide by the gastric epithelium to prevent helicobacter felis infection and inflammation in mice. *Gastroenterology.* 2013;145(5):1045–54.
  17. Lipinski S, Till A, Sina C, Arlt A, Grasberger H, Schreiber S, et al. DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J Cell Sci.* 2009;122(19):3522–30.
  18. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol.* 2015;8(2):372–9.
  19. 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.
  20. Parlato M, Charbit-Henrion F, Hayes P, Tiberti A, Aloï M, Cucchiara S, et al. First Identification of Biallelic Inherited DUOX2 Inactivating Mutations as a Cause of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2017;153(2):609-611.e3.
  21. Konaté MM, Antony S, Doroshov JH. Inhibiting the Activity of NADPH Oxidase in Cancer. *Antioxid Redox Signal.* 2020;00(00):1–20.
  22. Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, et al. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J Physiol Pharmacol.* 2015;66(4):483–91.
  23. Jensen-Jarolim E, Schöll I, Szalai K. *Gastrointestinaltrakt: Mukosale Pathophysiologie und Immunologie [E-Book].* Wien: Springer; 2006. DOI: 10.1007/3-211-31793-7
  24. Zeuzem S. Dünndarm. In: Arastéh K, Baenkler H, Bieber C, et al., Hrsg. *Duale Reihe Innere Medizin.* 3., Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012: 514-534. DOI: 10.1055/b-002-5209
  25. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech.* 2015;8(1):1–16.
  26. Walton KD, Mishkind D, Riddle MR, Tabin CJ, Gumucio DL. Blueprint for an intestinal villus: Species-specific assembly required. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018;7(4):1–19.

27. Hugenholtz F, de Vos WM. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(1):149–60.
28. Park JC, Im SH. Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Exp Mol Med.* 2020;52(9):1383–96.
29. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* 2013;154(2):274–84.
30. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Dünndarm. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, Hrsg. *Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage.* Stuttgart: Thieme; 2019. DOI: 10.1055/b-006-163361
31. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12(5):319–30.
32. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):11–26.
33. van Dop WA, Uhmman A, Wijgerde M, Sleddens-Linkels E, Heijmans J, Offerhaus GJ, et al. Depletion of the Colonic Epithelial Precursor Cell Compartment Upon Conditional Activation of the Hedgehog Pathway. *Gastroenterology.* 2009;136(7):2195–2203.
34. Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *CMGH.* 2017;4(1):33–46.
35. Büller NVJA, Rosekrans SL, Westerlund J, van den Brink GR. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology.* 2012;27(3):148–55.
36. Li C, Chi S, Xie J. Hedgehog signaling in skin cancers. *Cell Signal.* 2011;23(8):1235–43.
37. Van Den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1343–75.
38. Kosinski C, Stange DE, Xu C, Chan AS, Ho C, Yuen ST, et al. Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology.* 2010;139(3):893–903.
39. Van Den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JCH, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet.* 2004;36(3):277–82.
40. Walton KD, Whidden M, Kolterud Å, Shoffner SK, Czerwinski MJ, Kushwaha J, et al. Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. *Dev.* 2016;143(3):427–36.
41. Haramis APG, Begthel H, Van Den Born M, Van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJA, et al. De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine. *Science.* 2004;303(5664):1684–6.
42. Takeda K, Akira S. Toll-Like receptors. *Curr Protoc Immunol.*

- 2015;109(April):14.12.1-14.12.10.
43. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499–511.
  44. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33(1):257–90.
  45. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, et al. Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes. *J Immunol*. 2001;167(10):5887–94.
  46. Schwacha MG, Zhang Q, Rani M, Craig T, Oppeltz RF. Burn enhances toll-like receptor induced responses by circulating leukocytes. *Int J Clin Exp Med*. 2012;5(2):136–44.
  47. Cario E, Podolsky DK. Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infect Immun*. 2000;68(12):7010–7.
  48. Sieber M, Pita L, Weiland-Bräuer N, Dirksen P, Wang J, Mortzfeld B, et al. Neutrality in the metaorganism. *PLoS Biol*. 2019;17(6):1–21.
  49. Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, Zheng S Sen. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol*. 2015;21(3):803–14.
  50. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8):1–14.
  51. Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016;22(10):1079–89.
  52. Khandagale A, Reinhardt C. Gut microbiota – Architects of small intestinal capillaries. *Front Biosci - Landmark*. 2018;23(4):752–66.
  53. Mailing LJ, Allen JM, Buford TW, Fields CJ, Woods JA. Exercise and the Gut Microbiome: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms, and Implications for Human Health. *Exerc Sport Sci Rev*. 2019;47(2):75–85.
  54. Bäckhed F, Ley R, Sonnenburg J, Peterson D, Gordon J. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine - supplemental materials. *Science*. 2005;307(5717):1915–20.
  55. Autenrieth DM, Baumgart DC. Mikrobiom und entzündliche Darmerkrankungen Microbiome and Gut Inflammation. *Dtsch Med Wochenschr*. 2017;142(4):261–6.
  56. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59–65.
  57. Haller D, Hörmannspurger G. Darmgesundheit und Mikrobiota: Ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit [E-Book].

Wiesbaden: Springer; 2015.

58. Maki KA, Kazmi N, Barb JJ, Ames N. The Oral and Gut Bacterial Microbiomes: Similarities, Differences, and Connections. *Biol Res Nurs.* 2020;23(1):1–14.
59. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, Sandhu K, Gao Z, Wang B, et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv.* 2015;1(3):1–12.
60. Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr.* 2014;111(3):387–402.
61. Rapozo DCM, Bernardazzi C, De Souza HSP. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol.* 2017;23(12):2124–40.
62. 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.
63. Zheng Y, Fang Z, Xue Y, Zhang J, Zhu J, Gao R, et al. Specific gut microbiome signature predicts the early-stage lung cancer. *Gut Microbes.* 2020;11(4):1–13.
64. Irani S, Barati I, Badiei M. Periodontitis and oral cancer - current concepts of the etiopathogenesis. *Oncol Rev.* 2020;14(1):23–34.
65. Reinhardt C. The Microbiota: A Microbial Ecosystem Built on Mutualism Prevails. *J Innate Immun.* 2019;11(5):391–2.
66. Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Jiao Y, Gilliland MG, Hayashi A, Imai J, et al. The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell.* 2020;182(2):447–62.
67. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017;387:95–105.
68. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539–45.
69. Szasz O, Vincze G, Szigeti GP, Benyo Z, Szasz A. An allometric approach of tumor-angiogenesis. *Med Hypotheses.* 2018;116(March):74–8.
70. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J.* 2017;14(1):89–96.
71. Sirokmány G, Donkó Á, Geiszt M. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(4):318–27.
72. Fortunato RS, De Souza ECL, Ameziane-el Hassani R, Boufraquech M, Weyemi U, Talbot M, et al. Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(12):5403–11.
73. Raad H, Eskalli Z, Corvilain B, Miot F, De Deken X. Thyroid hydrogen peroxide

- production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOX2. *Free Radic Biol Med.* 2013;56:216–25.
74. Lambeth JD, Neish AS. Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014;9(1):119–45.
  75. El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, et al. Dual oxidase 2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(5):G933–42.
  76. Burgueño JF, Fritsch J, Gonzalez EE, Landau KS, Santander AM, Fernández I, et al. Epithelial TLR4 Signaling Activates DUOX2 to Induce Microbiota-Driven Tumorigenesis. *Gastroenterology.* 2020;S0016-5085:1–12.
  77. 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.
  78. Pasteur L. Observations relatives à la Note précédente de M. Duclaux. *COMPTES RENDUS DES SÉANCES L'ACADÉMIE DES Sci.* 1885;100:68.
  79. Bayer F, Ascher S, Pontarollo G, Reinhardt C. Antibiotic Treatment Protocols and Germ-Free Mouse Models in Vascular Research. *Front Immunol.* 2019;10(September):1–7.
  80. Hörmann N, Brandão I, Jäckel S, Ens N, Lillich M, Walter U, et al. Gut microbial colonization orchestrates TLR2 expression, signaling and epithelial proliferation in the small intestinal mucosa. *PLoS One.* 2014;9(11):2–12.
  81. Brandão I, Hörmann N, Jäckel S, Reinhardt C. TLR5 expression in the small intestine depends on the adaptors MyD88 and TRIF, but is independent of the enteric microbiota. *Gut Microbes.* 2015;6(3):202–6.
  82. Todorov H, Kollar B, Bayer F, Brandão I, Mann A, Mohr J, et al.  $\alpha$ -Linolenic Acid-Rich Diet Influences Microbiota Composition and Villus Morphology of the Mouse Small Intestine. *Nutrients.* 2020;12(3):1–20.
  83. Wostmann BS. The Germfree Animal in Nutritional Studies. *Annu Rev Nutr.* 1981;1:257–79.
  84. Garcia MD, Larina I V. Vascular development and hemodynamic force in the mouse yolk sac. *Front Physiol.* 2014;5(August):1–10.
  85. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. Funktionelle Embryologie: Die Entwicklung der Funktionssysteme des menschlichen Organismus. 5., überarbeitete Auflage Stuttgart: Schattauer; 2016.
  86. Jousseaume AM, Kirchhof B, Gottstein C. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese: Möglichkeiten antiangiogener Therapie. *Ophthalmologe.* 2003;100(4):284–91.
  87. Käßmeyer S, Plendl J, Custodis P, Bahramsoltani M. New insights in vascular development: Vasculogenesis and endothelial progenitor cells. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2009;38(1):1–11.

88. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455–67.
89. Sandor Z, Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: A key to impaired healing? *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350(1):147–50.
90. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol.* 1998;161(12):6845–52.
91. Schirbel A, Kessler S, Rieder F, West G, Rebert N, Asosingh K, et al. Pro-angiogenic activity of TLRs and NLRs: A novel link between gut microbiota and intestinal angiogenesis. *Gastroenterology.* 2013;144(3):613–23.
92. Vaupel P, Schaible H-G, Mutschler E. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2015.
93. Rakoff-Nahoum S, Kong Y, Kleinstein SH, Subramanian S, Ahern PP, Gordon JI, et al. Analysis of gene-environment interactions in postnatal development of the mammalian intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(7):1929–36.
94. Franks I. Microbiota: Gut microbes might promote intestinal angiogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(1):3.
95. Suh SH, Choe K, Hong SP, Jeong S, Mäkinen T, Kim KS, et al. Gut microbiota regulates lacteal integrity by inducing VEGF-C in intestinal villus macrophages. *EMBO Rep.* 2019;20(4):1–20.
96. Pontarollo G, Mann A, Brandão I, Malinarich F, Schöpf M, Reinhardt C. Protease-activated receptor signaling in intestinal permeability regulation. *FEBS J.* 2020;287(4):645–58.
97. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn K V. Endothelial protein C receptor (EPCR), Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) and their interplay in cancer growth and metastatic dissemination. *Cancers.* 2019;11(1):1–18.
98. Borensztajn KS, Bijlsma MF, Groot AP, Brüggemann LW, Versteeg HH, Reitsma PH, et al. Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation. *Exp Cell Res.* 2007;313(12):2622–33.
99. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Vlaenderen I Van, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996;383(6595):73–5.
100. Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg MD, Luger TA, Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol.* 2008;83(6):1309–22.
101. Vidal K, Grosjean I, Revillard JP, Gespach C, Kaiserlian D. Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and

- immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods*. 1993;166(1):63–73.
102. Saqui-Salces M, Merchant JL. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010;1803(7):786–95.
  103. Jamasbi J, Ayabe K, Goto S, Nieswandt B, Peter K, Siess W. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thromb Haemost*. 2017;117(7):1249–57.
  104. Cenac N, Cellars L, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL, et al. Proteinase-activated receptor-1 is an anti-inflammatory signal for colitis mediated by a type 2 immune response. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(9):792–8.
  105. Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through duox activation and hydrogen peroxide release. *Curr Biol*. 2013;23(5):424–9.
  106. Abrams GD, Bauer H, Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. *Lab Invest*. 1963;12:355–64.
  107. Gustafsson BE. The physiological importance of the colonic microflora. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1982;77:117–31.
  108. Kollar L. Untersuchung des Einflusses der Mikrobiota auf morphogenetische Signalwege und der Auswirkung auf Proliferation, Morphologie und Permeabilität im Dünndarm adulter C57BL/6J-Mäuse [Dissertation]. Mainz: Centrum für Thrombose und Hämostase der Johannes Gutenberg-Universität; 2017.
  109. Antico S, Lionetto MG, Giordano ME, Caricato R, Schettino T. Cell volume regulation and apoptotic volume decrease in rat distal colon superficial enterocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(6):1551–65.
  110. Dang PM-C, Rolas L, El-Benna J. The Dual Role of Reactive Oxygen Species-Generating Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Gastrointestinal Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Antioxid Redox Signal*. 2020;33(5):354–73.
  111. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;532(1):3–16.
  112. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007;449(7165):1003–7.
  113. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker H-C, Podolsky DK. Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors. *J Immunol*. 2000;164(2):966–72.
  114. Inoue R, Yajima T, Tsukahara T. Expression of TLR2 and TLR4 in murine small intestine during postnatal development. *Biosci Biotechnol Biochem*.

- 2017;81(2):350–8.
115. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):253–9.
  116. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997;151(3):671–7.
  117. Bertrand FE, Angus CW, Partis WJ, Sigounas G. Developmental pathways in colon cancer: Crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle*. 2012;11(23):4344–51.
  118. Buongusto F, Bernardazzi C, Yoshimoto AN, Nanini HF, Coutinho RL, Carneiro AJ V., et al. Disruption of the Hedgehog signaling pathway in inflammatory bowel disease fosters chronic intestinal inflammation. *Clin Exp Med*. 2017;17(3):351–69.
  119. 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 Med*. 2008;5(12):1761–75.
  120. Rupperecht M, Mensing CH, Barvencik F, Itrich H, Heiland M, Rueger JM, et al. Skelettale und kutane Charakteristika des nävoiden Basalzellkarzinomsyndroms (Gorlin-Goltz-Syndrom). *RöFo*. 2007 Jul 6;179(06):618–26.
  121. Hauswirth U. Basalzellkarzinom. In: Moll I, Hrsg. *Duale Reihe Dermatologie*. 7., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2010: 480-487. DOI: 10.1055/b-002-11376
  122. Sekulic A, Migden MR, Basset-Seguin N, Garbe C, Gesierich A, Lao CD, et al. Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: Final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–10.
  123. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (Review). *Int J Mol Med*. 2006;18(6):1019–23.
  124. Wu Y, Lu J, Antony S, Juhasz A. Activation of Toll-Like Receptor 4 Is Required for the Synergistic Induction of Dual Oxidase 2 and Dual Oxidase A2 by Interferon- $\gamma$  and Lipopolysaccharide in. ... (Baltimore, Md 1950 .... 2013;190(4):1859–72.
  125. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxidants Redox Signal*. 2015;23(5):406–27.
  126. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009;459(7249):996–9.
  127. Knaus G, Leto TL, Hrsg. *NADPH Oxidases: Methods and Protocols [E-Book]*. 1. Auflage. New York, Humana Press; 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-9424-3.

128. Dalal PJ, Muller WA, Sullivan DP. Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *Am J Pathol.* 2020;190(3):535–42.
129. 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*. *Mol Endocrinol.* 2007;21(7):1593–602.
130. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell.* 2010;140(6):859–70.
131. Fischli S. Schilddrüse. In: Arastéh K, Baenkler H, Bieber C, et al., Hrsg. *Duale Reihe Innere Medizin.* 3., Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012: 736–770. DOI: 10.1055/b-002-5209.
132. Deutzmann R. Schilddrüsenhormone (Thyroxin und Triiodthyronin). In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R et al., Hrsg. *Duale Reihe Physiologie.* 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016: 365-374. DOI: 10.1055/b-004-132217
133. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(4):775–94.
134. Abdel-Moneim AME, Elbaz AM, Khidr RES, Badri FB. Effect of in Ovo Inoculation of *Bifidobacterium* spp. on Growth Performance, Thyroid Activity, Ileum Histomorphometry, and Microbial Enumeration of Broilers. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020;12(3):873–82.
135. Sasivari Z, Szinnai G, Seebauer B, Konrad D, Lang-Muritano M. Double variants in *TSHR* and *DUOX2* in a patient with hypothyroidism: Case report. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2019;32(11):1299–1303.
136. Wang H, Kong X, Pei Y, Cui X, Zhu Y, He Z, et al. Mutation spectrum analysis of 29 causative genes in 43 Chinese patients with congenital hypothyroidism. *Mol Med Rep.* 2020;22(1):297–309.
137. Pontarollo G, Melzow F, Reinhardt C. Comment on “endothelial protein C receptor (EPCR), protease activated receptor-1 (PAR-1) and their interplay in cancer growth and metastatic dissemination” *cancers* 2019, 11, 51. *Cancers (Basel).* 2019;11(3):1–6.

## 8 Anhang

### 8.1 Details der Versuche

#### 8.1.1 Histologie

Tabelle 23: Anzahl der untersuchten Mäuse in histologischen Versuchen

Abbildung	Mauslinie	Anzahl Tiere	Anzahl untersuchter Stellen	Anzahl Abstandsmessungen
11 a - d	CONV-R WT	8	11	21
	CONV-R <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup>	7	10	16
	GF WT	7	7	8
	GF <i>Tlr4</i> <sup>-/-</sup>	7	7	11
19 a - d	CONV-R <i>Duox2</i> <sup>+/+</sup>	7	13	19
	CONV-R <i>Duox2</i> <sup>-/-</sup>	7	12	13

#### 8.1.2 MODE-K Zellkultur

Tabelle 24: Anzahl der untersuchten Wells im ROS-Glo™ H2O2 Assay

Stimulans	Anzahl Wells
CTR	12
LPS	6
LPS + Duox-Inhibitor	6
Duox-Inhibitor	6

## 8.2 Anwendungsprotokolle

### 8.2.1 RNeasy Mini Kit Protokoll

Verwendet wurde das RNeasy Mini Kit der QIAGEN GmbH. Das Anwendungsprotokoll ist zu finden unter:

<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=1f8ed6e7-2423-4cff-8013-0eb89ead5cb0&lang=en>

### 8.2.2 ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay Protokoll

Verwendet wurde das ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay der Promega Corporation mit der Katalognummer G8820. Das Anwendungsprotokoll ist zu finden unter:

[https://www.promega.de/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/ros\\_glo-h2o2-assay/?catNum=G8820&gclid=CjwKCAjwiOv7BRBREiwAXHbv3MXmVZ5DMYfvRELEjELa\\_kTQYJ1Y5bP-nCPOw4R\\_YuB\\_5xFJX0uj-hoCDOMQAvD\\_BwE#protocols](https://www.promega.de/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/ros_glo-h2o2-assay/?catNum=G8820&gclid=CjwKCAjwiOv7BRBREiwAXHbv3MXmVZ5DMYfvRELEjELa_kTQYJ1Y5bP-nCPOw4R_YuB_5xFJX0uj-hoCDOMQAvD_BwE#protocols)

## **9 Danksagung**

Mein Dank geht zunächst an meinen Doktorvater für die Überlassung des spannenden Themas und der Erstellung des Gutachtens. Ebenso möchte ich mich bei ihm für seine Begleitung mit vielen wissenschaftlichen Erklärungen und konstruktiver Kritik auf meinem Weg bis zur Fertigstellung der Doktorarbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Zweitgutachter, der mich durch seine Kooperation mit dem CTH an die Arbeitsgruppe vermitteln konnte, mir beratend zur Seite stand und schließlich für die Erstellung des Gutachtens.

Ich möchte mich auch bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und bei allen Fragen und Problemen ein offenes Ohr für mich hatte. Besonderer Dank gilt hierbei meiner Betreuerin, die mich weit über das übliche Maß hinaus unterstützt hat. Ebenso geht mein Dank an das ganze CTH und die kooperierenden Arbeitsgruppen, durch deren Mitarbeit meine Forschung ermöglicht wurde.

Für die Hilfe bei der sprachlichen Gestaltung dieser Arbeit geht mein Dank an meine Freunde.

Zuletzt geht ein großer Dank geht an meine Familie. Durch ihre Ermutigung habe ich diese Arbeit erst begonnen und mit ihrer Unterstützung schließlich fertig stellen können.