

**„Untersuchungen zur Rolle der *Neutrophil*
Extracellular Traps in der mesenterialen Ischämie-
Reperfusion-Schädigung im keimfreien Mausmodell“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie,
Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stefanie Anna Ascher (geb. Kemski)

geboren in Groß-Strehlitz

Mainz, 2022

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Einleitung	5
3.1 Dünndarm	5
3.1.1 Abschnitte und Versorgung des Dünndarms	5
3.1.2 Die Bildung des Darm-Ökosystems	8
3.1.3 Einfluss von Antibiotika auf die intestinale Mikrobiota.....	10
3.2 Gnotobiotik	12
3.2.1 Allgemeine Erläuterung.....	12
3.2.2 Charakteristika keimfreier Gnotobioten.....	13
3.3 Immunabwehr	16
3.3.1 Granulozyten (Leukozyten).....	16
3.3.2 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	20
3.4 Toll-like Rezeptoren	24
3.4.1 Mustererkennung durch Toll-like Rezeptoren (TLR)	24
3.4.2 Signaltransduktion von TLR4.....	28
3.4.2.1 Der MyD88-abhängiger Signalweg	29
3.4.2.2 Der MyD88-unabhängige und der TRIF-abhängige Signalweg	30
3.4.3 Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin)	31
3.5 Mesenteriale Ischämie und Reperfusion	32
3.6 IVM	34
3.6.1 Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie (IVM).....	34
3.6.2 IVM-Fluoreszenzfarbstoffe	36
3.6.2.1 Acridinorange.....	36
3.6.2.2 SYTOX Orange.....	37
3.7 Zielsetzung	38
4. Materialien	39
4.1 Geräte	39
4.2 Software	40
4.3 Verbrauchsmaterialien	41
4.4 Instrumente	42
4.5 Anästhesie	42
4.6 Antibiotika	43
4.7 Chemikalien	43

4.8 Kits	44
4.9 Puffer	45
4.10 Antikörper	45
4.10.1 Immunfluoreszenz	45
4.10.2 FACS.....	46
5. Mauslinien	49
5.1 C57BL/6J	49
5.2 Swiss Webster	49
5.3 <i>Pad4</i>^{-/-}	49
5.4 <i>Tlr4</i>^{-/-}	50
5.5 <i>Myd88</i>^{-/-}	50
5.6 <i>Trif</i>^{-/-}	51
5.7 <i>Myd88</i>^{-/-} x <i>Trif</i>^{-/-}	51
5.8 <i>Vwf</i>^{-/-}	51
5.10 TLR4^{fl/fl} x VE-Cadherin-Cre⁺	52
5.8 Altered Schaedler Flora (ASF)	52
6. Methoden	53
6.1. Behandlungen und (Mono-) Kolonisierungen	53
6.1.1 Antibiotika Behandlung.....	53
6.1.2 LPS Behandlung	53
6.1.3 DSS Behandlung.....	53
6.1.4 Kolonisierung mit zökalem Inhalt.....	54
6.1.5 Monokolonisierung mit <i>Escherichia coli</i> JP 313.....	54
6.1.6 Monokolonisierung mit <i>Bacillus subtilis</i> PY79.....	55
6.2 Isolierung von murinen neutrophilen Granulozyten aus Knochenmark und Blut	55
6.2.1 Isopyknische Zentrifugation (Dichtegradienten-Zentrifugation)	55
6.2.2 Lyse der Erythrozyten	56
6.2.3 Magnetic Activated Cell Separation (MACS)	57
6.3 <i>In vitro</i> Stimulierung und Quantifizierung der LPS-induzierten NETose ..	58
6.3.1 <i>In vitro</i> LPS Stimulierung.....	58
6.3.2 Quantifizierung der LPS-induzierten NETose durch Messung der	59
Fluoreszenzintensität	59
6.3.3 Quantifizierung der LPS-induzierten NETose mittels Immunfluoreszenz ..	59
6.4 Detektion von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie (FACS)	60

6.5 <i>In vivo</i> Mausmodell	61
6.5.1 Mesenteriale Ischämie-Reperfusion.....	61
6.5.2 Quantifizierung der IVM Ergebnisse	71
6.6 Statistische Analyse	76
7. Ergebnisse	77
7.1 Einfluss der Darmmikrobiota auf die NET-Bildung isolierter Knochenmark-Neutrophile	77
7.1.1 Abhängigkeit der Darmbesiedelung und der Mauslinie auf die <i>in vitro</i> NETose.....	77
7.1.2 Einfluss des Enzyms Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) auf die LPS-induzierte NET-Bildung.....	80
7.1.3 Einfluss des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) in der LPS-induzierten <i>in vitro</i> NETose.....	81
7.1.4 Einfluss der Antibiotika Behandlung auf die NET-Bildung.....	83
7.1.5 Rolle der Endotoxin-Toleranz in der <i>in vitro</i> NETose	85
7.1.6 Einfluss der Dextran Natriumsalz-induzierten Mukositis auf die <i>in vitro</i> NETose.....	86
7.1.7 Wirkung der Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota auf die LPS-induzierte <i>in vitro</i> NETose.....	87
7.2 Einfluss der Darmmikrobiota auf die <i>in vivo</i> NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell	88
7.2.1 Einfluss der Darmmikrobiota auf das Adhäsionsverhalten von Leukozyten an das Endothel und die <i>in vivo</i> NETose	88
7.2.2 Die Rolle der Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) in der <i>in vivo</i> NETose .	91
7.2.3 Einfluss des TLR4 und dessen Adaptermoleküle MyD88 und TRIF auf die <i>in vivo</i> NETose.....	93
7.2.4 Rolle der endothelialen TLR4-Expression in der <i>in vivo</i> NETose.....	97
7.2.5 Einfluss der von-Willebrand-Faktor Defizienz auf die <i>in vivo</i> NETose.....	98
7.2.6 Wirkung der Antibiotika-Behandlung auf die <i>in vivo</i> NET-Bildung.....	100
7.2.7 Rolle der Endotoxin-Toleranz im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell	104
7.2.8 Wirkung der Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota, sowie der Monokolonisierung auf die <i>in vivo</i> NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell	106
7.2.9 Altered Schaedler Flora (ASF) in der <i>in vivo</i> NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell.....	113
7.3 Expression von TLR4 und L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse	114

7.3.1 Bestimmung der TLR4- und L-Selektin-Expression auf neutrophilen Granulozyten von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen	117
7.3.2 Expression des TLR4 und L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten Antibiotika-behandelter CONV-R WT Mäuse	118
7.3.3 Auswirkung der LPS-Behandlung auf die TLR4-Expression in Knochenmark-residenten neutrophilen Granulozyten und Neutrophilen im Vollblut	120
8. Diskussion.....	122
8.1 Die intestinale Mikrobiota und NETose	122
8.1.1 Die Beeinflussung der NETose durch die intestinale Mikrobiota	123
8.1.2 Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die entzündungsvermittelte NET-Bildung	128
8.2 Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) und Von-Willebrand-Faktor (VWF) in der NETose.....	129
8.3 Einfluss des Immunrezeptors TLR4 auf die NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell.....	131
8.4 Ausblick.....	133
9. Anhang	134
9.1 Abkürzungsverzeichnis	134
9.2 Abbildungsverzeichnis	137
9.3 Tabellenverzeichnis	141
9.4 Literaturverzeichnis	142
Eidesstattliche Versicherung	175

1. Zusammenfassung

Die intestinal Mikrobiota beschreibt ein komplexes und dynamisches System und umfasst die gesamten Mikroorganismen, die den Darm besiedeln. Die intestinale Mikrobiota erfüllt wichtige Funktionen im Körper. Besonders über die letzten Jahre sind die immunologischen und protektiven Funktionen der intestinalen Mikrobiota in den Fokus gerückt. Kommt es zu einer Dysbiose, einer Veränderung der bakteriellen Besiedelung des Darms, so steigt das Risiko für verschiedene Erkrankungen. Eine Veränderung in der bakteriellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota konnte mit der Bildung von entzündlichen Darmerkrankungen, Darmkrebs, Atherosklerose und der arteriellen Thrombose in Zusammenhang gebracht werden.

Die akute mesenteriale Ischämie oder der Mesenterialinfarkt beschreibt eine lebensbedrohliche Unterbrechung des intestinalen Blutflusses durch die Okklusion der Mesenterialarterie *Arteria mesenterica superior*. Der Zustand der Ischämie führt zur Desintegration der Mukosa und Translokation der Bakterien, die Entzündungsreaktionen induzieren. Durch Reperfusion, der wiederhergestellten Durchblutung der Gefäße, werden die durch Ischämie hervorgerufenen Gewebeschäden weiter begünstigt. In Folge der Ischämie und Reperfusion nimmt durch kontinuierliche Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen die Schädigung des Gewebes und der Organe stetig zu, was letztendlich zur Nekrose führen kann.

Immunzellen, wie die neutrophilen Granulozyten (Leukozyten) gehören zur ersten Abwehrlinie gegen Mikroorganismen. Sie sind in der Lage durch Freisetzung eines dreidimensionalen Netzwerks, bestehend aus Chromatin (Komplex aus DNA und den Histon-Proteinen), Enzymen und antimikrobiellen Proteinen, Pathogene und Mikroorganismen einzufangen und unschädlich zu machen. Dieser Prozess wird als NETose, eine spezielle Form des Zelltods, bezeichnet.

Da im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell der Einfluss einer über Mikrobiota-vermittelte NETose noch unerforscht ist, wurde in *in vitro* Experimenten (Zellkultur) und im *in vivo* Mausmodell (Ischämie-Reperfusion) die Fragestellung der Mikrobiota-Abhängigkeit auf die NET-Bildung genauer untersucht. Im ersten Versuchsteil, den Zellkulturexperimenten, wurden über die Dichtegradienten-Zentrifugation isolierte neutrophile Granulozyten mit dem Lipopolysaccharid (LPS, TLR4-Agonist) vom

Serotyp *E. coli* 0111:B4 stimuliert und das Fluoreszenzsignal der extrazellulären DNA der NET-Strukturen gemessen. Im zweiten Versuchsteil, dem Modell der mesenterialen Ischämie-Reperfusion, wurde durch die reversible Okklusion der *Arteria mesenterica cranialis* (analog zur *Arteria mesenterica superior* im Menschen) die Ischämie induziert. Nach einstündiger Ischämie wurde durch Entfernung einer atraumatischen Klemme die Reperfusion zugelassen. Über die Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie wurde das Zellverhalten Pre- und Post-Ischämie dokumentiert. In der Arbeit wurde die Anzahl an adhärierenden Leukozyten und die Zahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten ermittelt. Anhand der in der Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte in keimfreien (GF) C57BL/6J Mäusen, die frei von der intestinalen Mikrobiota sind, sowohl in den *in vitro* und in den *in vivo* Experimenten eine vermehrte NETose beobachtet werden. Eine ebenfalls vermehrte NETose konnte in mit Antibiotika-behandelten (Depletion der intestinalen Mikrobiota) konventionell aufgewachsenen (CONV-R) C57BL/6J Mäusen beobachtet werden. CONV-R Tiere, wie auch konventionalisierte Mäuse (ehemals keimfreie Tiere, die mit zökalem Inhalt kolonisiert wurden) und Tiere, die mit nur einem Bakterienstamm (*E. coli* JP313 gram-negativ oder *Bacillus subtilis* YP79 gram-positiv) monokolonisiert wurden, bildeten in den *in vitro* und *in vivo* Versuchen weniger NETs. Durch eine stetige Rekrutierung und Aktivierung der Leukozyten kann es bei der mesenterialen Ischämie-Reperfusion zu einer verstärkten Schädigung des Gewebes kommen. In GF C57BL/6J Mäusen war die Zahl an adhärierenden Leukozyten gegenüber den CONV-R C57BL/6J Mäusen reduziert. Somit wurde vermutet, dass, obwohl die Leukozyten der GF Tiere ein vermindertes Adhäsionsverhalten aufweisen, sie jedoch reaktiver auf eine Stimulierung reagieren. In Ergebnissen der Durchflusszytometrie konnte auf den isolierten neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse eine vermehrte Expression des TLR4-Rezeptors detektiert werden. Zur Bestätigung der Annahme, dass eine erhöhte Reaktivität des TLR4-Signalwegs die NETose in keimfreien Mäusen induziert, wurden Mäuse untersucht, die defizient für den TLR4-Signalweg waren. Hierbei stellte sich heraus, dass die NETose von einem intakten TLR4-TRIF-Signalweg abhängt. Somit konnte gezeigt werden, dass die intestinale Mikrobiota den TLR4-TRIF Signalweg reguliert und so die *in vitro* und *in vivo* NETose steuert.

2. Abstract

The intestinal microbiota is a complex and dynamic system and includes all the microorganisms which colonize the intestine. Over the last few years, the immunological and protective functions of the intestinal microbiota have come into focus. If dysbiosis occurs the risk for various diseases increases. An alteration in the bacterial composition of the intestinal microbiota has been linked to the development of inflammatory bowel disease, colon cancer, atherosclerosis and arterial thrombosis.

Acute mesenteric ischemia (mesenteric infarction) describes a life-threatening interruption of the intestinal blood flow due to occlusion of the superior mesenteric artery. Ischemia leads to perforation of the mucosa and translocation of bacteria and bacterial components that induce inflammatory reactions. Reperfusion (restored blood flow to the vessels) further elevates the tissue damage caused by ischemia. As a result of ischemia and reperfusion, continuous recruitment and activation of immune cells (leukocytes) steadily increases tissue and organ damage, which can lead to necrosis.

Immune cells such as neutrophil granulocytes (leukocytes) belong to the first line of defense against microorganisms. They are able to capture and kill pathogens by releasing a three-dimensional network consisting of chromatin (complex of DNA and histone proteins), enzymes and antimicrobial proteins. This process is called NETosis, which is a special form of cell death.

Since the influence of microbiota-induced NETosis in the mesenteric ischemia-reperfusion model is still unexplored, the question of microbiota dependence on NET-formation was examined in *in vitro* experiments (cell culture) and in the *in vivo* mouse model (ischemia-reperfusion). In the first part of the work, neutrophil granulocytes were isolated by density gradient centrifugation, stimulated with lipopolysaccharide (LPS, TLR4 agonist) of serotype *E. coli* 0111:B4 and the fluorescence intensity of the extracellular DNA (NET structures) was measured. In the second part (mesenteric ischemia-reperfusion injury), ischemia was induced by reversible occlusion of the cranial mesenteric artery (similar to the superior mesenteric artery in humans). One hour after ischemia, reperfusion was allowed by removal of an atraumatic clamp. Cell behavior before and after ischemia was documented using intravital video

fluorescence microscopy. Leukocyte adhesion and NETs or NET-positive leukocytes were visualized by intravital video fluorescence microscopy.

Based on the results obtained in this work, increased NETosis was observed in germ-free (GF) C57BL/6J mice (lack gut microbiota), in both *in vitro* and *in vivo* experiments. Enhanced NETosis was observed in antibiotic-treated (depletion of intestinal microbiota) conventionally raised (CONV-R) C57BL/6J mice. CONV-R mice, as well as conventionalized mice (formerly germ-free animals colonized with cecal content) and mice monocolonized with only one bacterial strain (*E.coli* JP313 gram-negative or *Bacillus subtilis* YP79 gram-positive), formed fewer NETs in the *in vitro* and *in vivo* experiments. Continuous recruitment and activation of leukocytes can result in increased tissue damage during mesenteric ischemia-reperfusion. In GF C57BL/6J mice, the number of adherent leukocytes was reduced compared with CONV-R C57BL/6J mice. Thus, it was suggested that although the leukocytes of the GF mice had decreased adhesion behavior, they were more reactive to stimulation. In flow cytometry, increased expression of the TLR4 receptor was detected on isolated neutrophil granulocytes from germ-free mice. To confirm the hypothesis that increased reactivity of the TLR4 pathway induces NETosis in germ-free mice, mice deficient for TLR4-TRIF signaling were examined. Here, NETosis was found to be dependent on an intact TLR4-TRIF signaling pathway. Intestinal microbiota was shown to regulate the TLR4-TRIF signaling pathway, thus controlling *in vitro* and *in vivo* NETosis.

3. Einleitung

3.1 Dünndarm

3.1.1 Abschnitte und Versorgung des Dünndarms

Der Dünndarm erstreckt sich über eine Länge von etwa drei bis fünf Metern und reicht vom Pylorus (Magenpförtner, ein Muskel der den Magen zum *Duodenum* hin abschließt) bis zur *Ostium ileale* (eine kleine Öffnung in der Wand des Zökums; markiert den Übergang vom *Ileum* in das Zökum). Anatomisch wird der Dünndarm in die drei Abschnitte *Duodenum* (Zwölffingerdarm), *Jejunum* (Leerdarm) und *Ileum* (Krummdarm) eingeteilt (**Abbildung 1**).¹

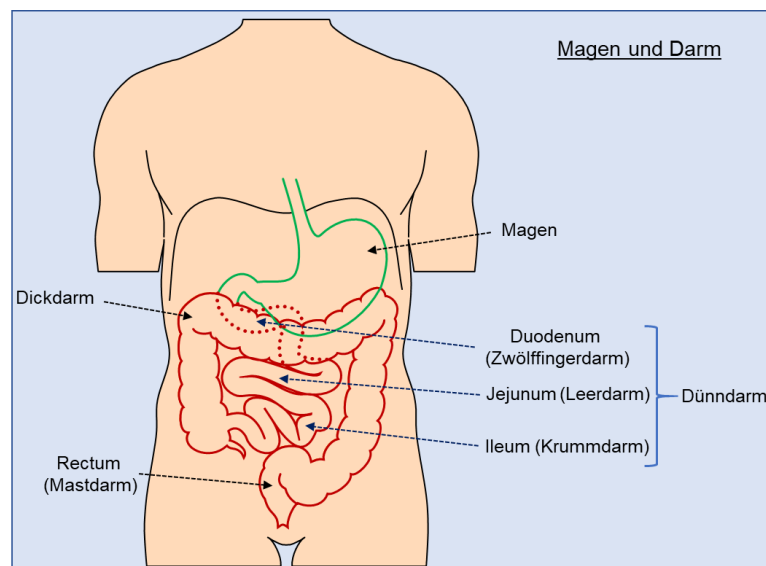


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gastrointestinaltrakts beim Menschen. Hierbei wird der Darm in die Abschnitte Dünndarm (*Duodenum*, *Jejunum*, *Ileum*) und Dickdarm (mit *Rectum*) unterteilt.

Das *Duodenum*, das direkt an den Magen anschließt und in das *Jejunum* mündet, ist ca. 25 cm bis 30 cm lang und C-förmig. Im *Duodenum* wird die aufgenommene Nahrung resorbiert und der Magensaft neutralisiert. Nach dem *Duodenum* folgt das *Jejunum* und ohne eine direkte Begrenzung das *Ileum*. Beide Abschnitte haben zusammen eine Länge von etwa drei bis fünf Metern, wobei das *Jejunum* 2/5 und das *Ileum* 3/5 der gesamten Dünndarmlänge ausmachen. Im *Jejunum* wie auch im *Ileum* findet die enzymatische Zersetzung sowie die Durchmischung der Nahrung statt. Des Weiteren erfolgt die Resorption der Nahrungsmittelbestandteile im *Jejunum* wie auch

im *Ileum*, wobei verschiedene Nährstoffe vom *Jejunum* oder *Ileum* aufgenommen werden.²⁻⁵

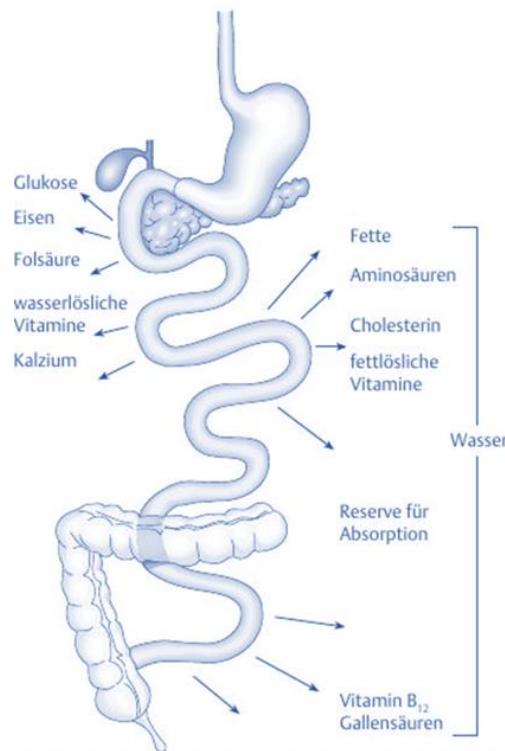


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Resorptionsvorgänge im Jejunum und Ileum.⁶

Im *Jejunum*, dem mittleren Teil des Dünndarms werden neben Wasser, Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, wasserlösliche Vitamine und Fettsäuren aufgenommen. Dagegen werden vom *Ileum*, dem letzten Abschnitt des Dünndarms vor dem Dickdarm, Vitamine wie Vitamin B₁₂ oder Vitamin C, sowie die Gallensäure resorbiert (**Abbildung 2**).²⁻⁵

Das *Jejunum* sowie das *Ileum* sind intraperitoneal, innerhalb der Bauchhöhle, gelagert. Über Platten aus Binde- und Fettgewebe, dem sogenannten Mesenterium, sind die Dünndarmschlingen befestigt (**Abbildung 3**). Die Wurzel (*Radix mesenterii*) des Mesenteriums verläuft quer über die hintere Bauchwand. Neben der Aufgabe zur Befestigung des Dünndarms und zur Bewegungseinschränkung der Bauchorgane, verlaufen im Mesenterium wichtige Leitungsbahnen, wie Lymphgefäße, Nerven und Gefäße (**Abbildung 3**), die den Dünndarm versorgen.⁷

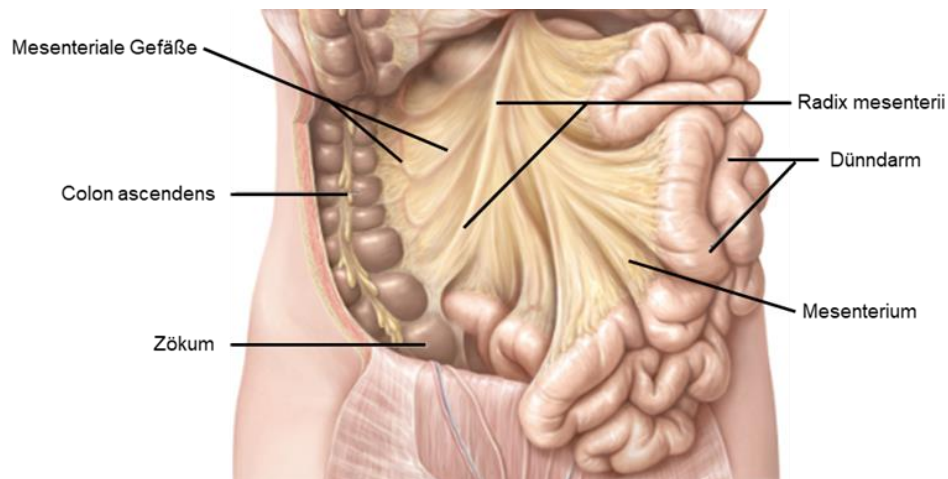


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mesenteriums. Veränderte Abbildung nach Schünke et al.⁷

Die Gefäßversorgung des Dünndarms erfolgt über zwei unpaarige Äste der Bauchaorta, dem *Truncus coeliacus* und der *A. mesenterica superior* (**Abbildung 4**).

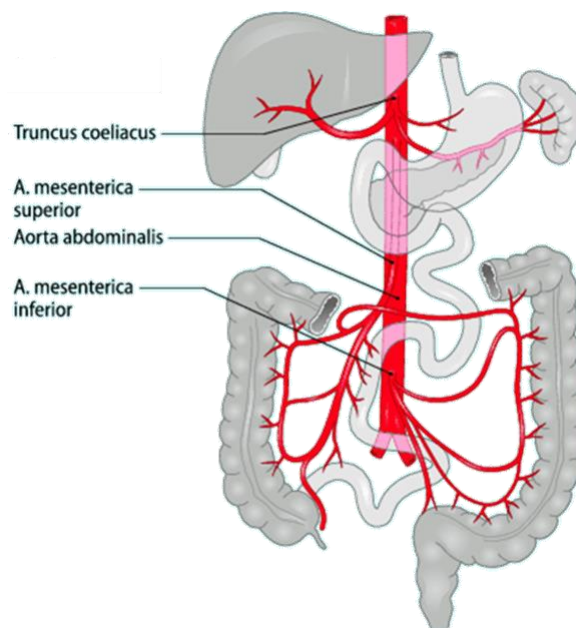


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des Dünndarms.⁵

Das *Duodenum* wird über die Arterienäste des *Truncus coeliacus* sowie der *A. mesenterica superior* versorgt, während das *Jejunum* wie auch das *Ileum* ausschließlich von Arterien der *A. mesenterica superior* versorgt werden. Hierbei teilt sich die *A. mesenterica superior* in die Gefäßäste *Aa. ileales* und *Aa. jejunales* auf. Im Verlauf durch das Mesenterium bilden sich bis zu 18 jejunale und ileale Gefäßäste

(**Abbildung 3**, mesenteriale Gefäße) aus, welche wiederum Anastomosen (Querverbindungen zwischen Gefäßsträngen) untereinander ausbilden.^{7,8}

3.1.2 Die Bildung des Darm-Ökosystems

Der menschliche Darm verfügt über eine hohe Diversität an Mikroorganismen. Die Gesamtheit der Mikroorganismen im Intestinaltrakt wird auch als intestinale Mikrobiota bezeichnet.

Die Bildung des komplexen Darm-Ökosystems beginnt mit dem Geburtsvorgang. Während der Geburt kommt es zu einer Kolonisierung bzw. einem Erstkontakt mit Umgebungskeimen. Somit werden Neugeborene, die über eine natürliche Geburt oder einen Kaiserschnitt zur Welt kommen, mit der vaginalen bzw. dermalen Mikrobiota der Mutter kolonisiert.^{10, 12} Hierbei kann es bei den Neugeborenen zu einer anfänglichen Kolonisierung mit Proteobakterien, wie den am häufigsten vorkommenden Bakterien *Escherichia* oder *Shigella* (beide kommen im Darmtrakt vor), kommen.¹³⁻¹⁵ In Magenaspirate von vaginal geborenen Säuglingen konnten die *Lactobacillus*-Spezies *L. iners* und *L. crispatus* (vaginale Bakterien) nachgewiesen werden.¹¹ Bereits ein paar Tage nach der Kolonisierung verschiebt sich das Verhältnis der intestinalen Mikrobiota. Während die Zahl an Proteobakterien abnimmt steigt die Anzahl der Bakterienklassen die zu den Phyla Actinobacteria, Firmicutes und Bacteroidetes gehören.^{9,13-17} Bis zum 18. Lebensmonat eines Babys kommt es zur weiteren Verschiebungen und Umverteilung der Darmbakterien. Bakterienfamilien wie *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* und *Clostridiaceae* erreichen ab dem zweiten Lebensmonat eines Babys ein signifikantes Kolonisierungslevel, das über die Zeit bis hin zum 18. Monat abnimmt. Dagegen nehmen die Bakterienfamilien *Ruminococcaceae* und *Lachnospiraceae*, die zum Firmicutes Phylum gehören, im 1. Lebensjahr zu.^{9,17,18} Nach Erreichen des 1. Lebensjahres ähnelt das Darm-Ökosystem immer mehr dem eines erwachsenen Menschen.^{9,18} Die im menschlichen Darm stabilsten und dominantesten Darmbakterien gehören den Phyla Firmicutes und Bacteroidetes an (**Abbildung 5**).^{12,23} Vom Magen bis hin zum Dickdarm nimmt die Zahl an Bakterien zu. Das *Duodenum* und *Jejunum* weisen eine geringe Diversität auf,

während der Dickdarm die maximale Diversität an Darmbakterien aufweist (**Abbildung 5**).¹²

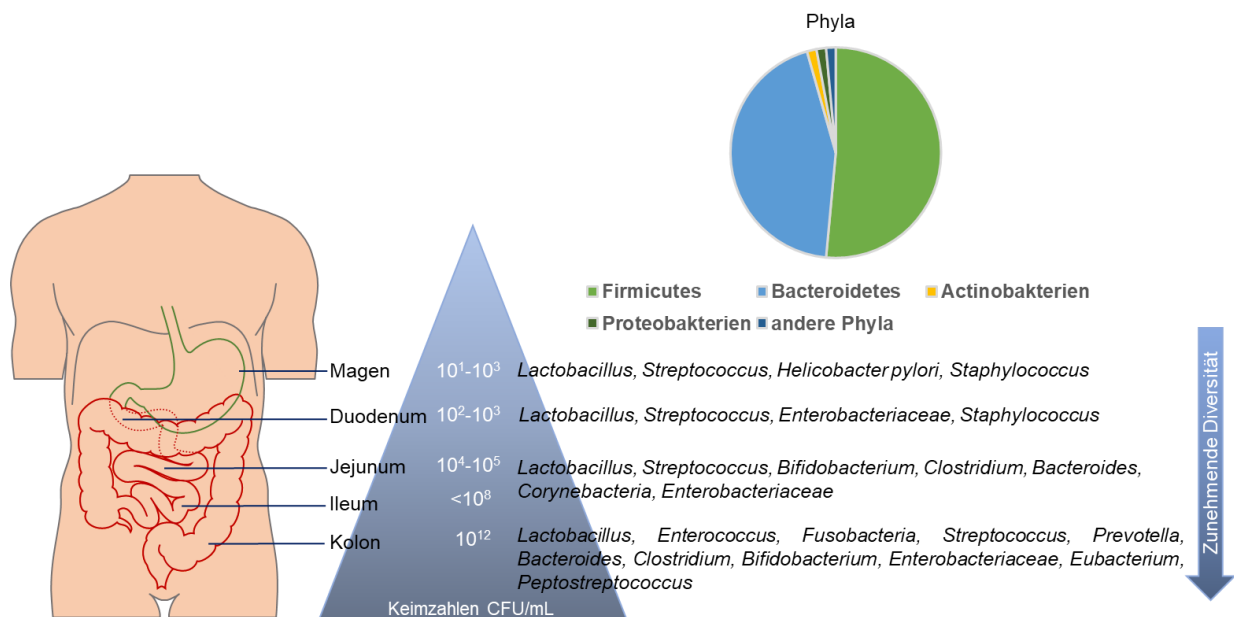


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bakterienverteilung im Magen, Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) und dem Kolon (Dickdarm). Sowie eine Übersicht der Keimzahlen in den Abschnitten Magen, Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) und Kolon. Veränderte Abbildung nach Haller und Hörmannspurger.^{12, 20-22}

Neben dem Faktor Geburt, ob über einen Kaiserschnitt oder einer natürlichen Geburt, haben weitere Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktionalität der intestinalen Mikrobiota. Ein weiterer relevanter Faktor ist die Ernährung, die einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota hat.²⁴ In Humanstudien wie auch Mausstudien konnte festgestellt werden, dass die Aufnahme von kalorien- und fettreicher Nahrung zu einer reduzierten Diversität an Darmbakterien und einer verminderten Verteilung an Darmbarriere schützenden Bifidobakterien, führt.²⁵⁻²⁸ Ein weiterer Faktor, der mit einer Veränderung der intestinalen Mikrobiota in Zusammenhang gebracht wird, ist die Applikation von Antibiotika.

3.1.3 Einfluss von Antibiotika auf die intestinale Mikrobiota

Antibiotika werden zur Behandlung von bakteriellen Infektionen eingesetzt. Dabei können sie eine bakterizide (Bakterien werden abgetötet) oder bakteriostatische (Hemmung von Wachstum und Vermehrung der Bakterien) Wirkung aufweisen. Etwa ein Viertel der in Deutschland stationär behandelten Patienten werden mit Antibiotika therapiert. In 70% der Krankheitsfälle wird Antibiotika als therapeutische Maßnahme und in etwa 30% der Fälle als prophylaktische Therapie verwendet.²⁹ In Human- wie auch Mausstudien konnte nach Verabreichung von Antibiotika eine Dezimierung bzw. einer Verschiebung der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota nachgewiesen werden.³⁰⁻³⁵ Auch nach der Beendigung der Therapie mit Antibiotika kann es Wochen bis hin zu zwei Jahre dauern bis die intestinale Mikrobiota ihre ursprüngliche Zusammensetzung erreicht hat.³⁶⁻³⁸ Des Weiteren konnte in Maus- und Humanstudien gezeigt werden, dass nach einer sechsmonatigen Erholungsphase die originale Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota nicht mehr erreicht werden konnte.^{39, 40} Im Fall der Tierstudie konnten sich in Jungtieren etwa 68,9% und in älteren C57BL-Mäusen 75% der Bakteriengattungen nicht mehr erholen. Die Mehrzahl der Bakterien, die depletiert wurden, gehörten zum Firmicutes Phylum und zur Familie der Clostridiales.³⁹ Durch die Antibiotikaexposition kann es neben einer Kolonisierung mit multiresistenten Bakterienstämmen auch zu einer Dysbiose des Darms kommen. Die damit verbundenen Veränderungen der Darmbakterien können beispielsweise in Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, Fettleibigkeit, Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Asthma in Verbindung gebracht werden.^{29, 30, 34} Um zukünftig die intestinale Mikrobiota und ihre Diversität besser schützen zu können, wird in sogenannten AMS-Programmen (antimikrobielles Stewardship) über die Therapiedauer, die Darreichungsform oder die Dosierung von Antibiotika entschieden.²⁹ In ersten Humanstudien konnten bereits durch den kontrollierten Einsatz von Antibiotika die Gesamtmortalität⁴¹ wie auch die Sepsisraten⁴² reduziert werden.²⁹

Durch das zunehmende Interesse an der intestinalen Mikrobiota rücken Studien mit Mäusen, die mit Antibiotika behandelt werden, in den Fokus. Das keimfreie Mausmodell (Kapitel **3.2 Gnotobiotik**) und die Antibiotikabehandlungsprotokolle werden immer häufiger als vergleichbare Methoden verwendet, um die Wirkung der

intestinalen Mikrobiota bei der Aktivierung von entzündlichen Gefäßphänotypen zu untersuchen.^{30, 57} Die Antibiotikabehandlung stellt zwar eine kostengünstige und eine leicht zugängliche Alternative zum keimfreien Mausmodell dar, doch können Faktoren wie die antimikrobielle Resistenz (Antibiotikaresistenz)^{31, 32}, eine unvollständige oder uneinheitliche Entfernung der Darmbakterien⁴³ sowie kein allgemein standardisiertes Antibiotikabehandlungsschema,^{43, 57} die Reproduktion des Versuchsverfahrens erschweren.^{43, 44} Demzufolge ist es notwendig auf die Grenzen dieser Methode und die Art der eingesetzten Kontrollen hinzuweisen. Das keimfreie Mausmodell stellt nach wie vor die aktuellste Methode zur Untersuchung der Mikrobe-Wirt und Mikrobe-Mikrobe-Interaktion dar. Im keimfreien Mausmodell zählen Monokolonisierung und Kolonisierungen mit einem minimalen mikrobiellen Konsortium zu den standardisierten experimentellen Ansätzen.^{57,58} Daher sollte, wenn möglich der Einsatz der Antibiotikabehandlung überdacht und das keimfreie Mausmodell vorgezogen werden.

3.2 Gnotobiotik

3.2.1 Allgemeine Erläuterung

Die Gnotobiotik bzw. die gnotobiotische Tierhaltung beschreibt einen Zustand, in dem die mikrobiologische Besiedelung von Versuchstieren klar definiert ist. Hierbei lassen sich die Versuchstiere in zwei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe sind die keimfreien Gnotobioten zusammengefasst. Diese Tiere sind frei von jeglichen Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Durch aseptische Hysterektomie^{45, 47} oder mittels Embryotransfer^{46, 47} können Versuchstiere generiert und in den keimfreien Zustand überführt werden. Um den sterilen und keimfreien Hygienestatus der Tiere zu gewährleisten, werden diese in Isolatoren (**Abbildung 6**) gehalten. Diese Isolatoren bestehen aus flexiblen, luftdichten, transparenten PVC-Hüllen, die ein geschlossenes System bilden. Durch die sterile Be- und Entlüftung wird in den Isolatoren ein Überdruck erzeugt, der für die Aufrechterhaltung des keimfreien Hygienestatus essenziell ist.

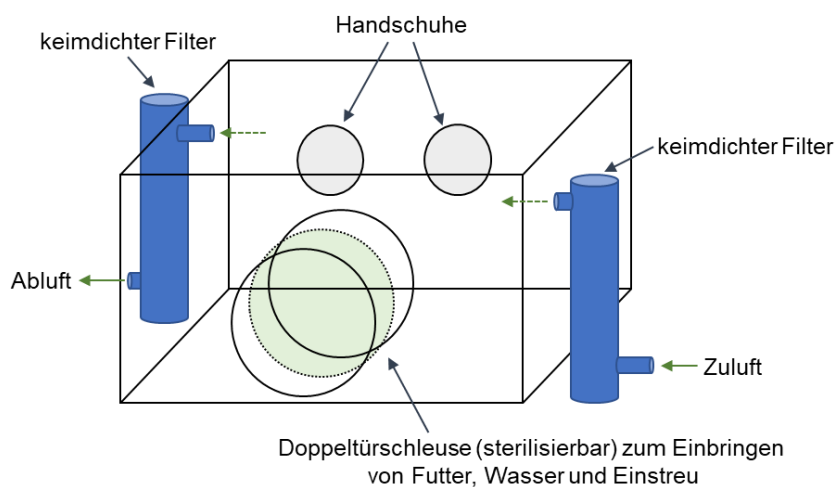


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Isolators für die Haltung von keimfreien und assoziierten Versuchstieren.

Die zweite Gruppe der Gnotobioten umfasst die assoziierten Tiere. Hierbei werden keimfreie Tiere mit genau bekannten Bakterien besiedelt. Werden Versuchstiere mit einem, zwei, drei oder mehreren Arten von Mikroorganismen besiedelt, wird von mono-, di-, tri- oder polyassozierten Versuchstieren gesprochen. Wie bereits die keimfreien Gnotobioten werden auch assoziierte Tiere zur Erhaltung und

Sicherstellung der definierten mikrobiellen Bedingungen in Isolatoren gehalten.^{47, 48} Obwohl die gnotobiotische Tierhaltung eine zeit- und arbeitsintensive Technologie ist, ermöglicht die Forschung an keimfreien Tieren den Einfluss der Darmmikrobiota auf die Physiologie des Wirts wie auch die Entwicklung von Erkrankungen bzw. Krankheitsprozesse besser zu verstehen.^{52, 57}

3.2.2 Charakteristika keimfreier Gnotobioten

In **Tabelle 1** sind Beispiele für die charakteristischen Eigenschaften der keimfreien Versuchstiere aufgelistet. Hierbei werden die keimfreien (germ-free, GF) Tiere mit konventionell (conventionally raised, CONV-R) aufgewachsenen Tieren verglichen. Diese Versuchstiere sind verglichen zu den keimfreien Gnotobioten mit nicht näher definierten Mikroorganismen besiedelt.

Die größte und offensichtlichste Auffälligkeit in den keimfreien Tieren ist das vergrößerte Zökum. Durch die Ansammlung von Flüssigkeit im Zökum kann das Gewicht um das 10-fache vergleichend zum Gewicht eines normalen Zökums, zunehmen.⁴⁹ Neben dem Zökum wiesen noch weitere Organe eine Veränderung in ihrer Größe vor. Das Herz, die Milz, die Leber und auch die Lymphknoten sind in den keimfreien Tieren kleiner verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Versuchstieren. Ein weiterer morphologischer Unterschied zwischen keimfreien und konventionell aufgewachsenen Tieren ist in den Darmzotten zu finden. In Mausstudien konnte festgestellt werden, dass die Darmzottenbreite der keimfreien Tiere verglichen zu ihren Kontrolltieren (CONV-R) kleiner ausfällt⁵⁵. Dagegen nahm die Länge der Darmzotten in den keimfreien Gnotobioten zu.⁵⁶ Verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Tieren ist die Masse an Körperfett in den keimfreien Mäusen geringer. Des Weiteren sind sie bei Ernährung mit hohem Zucker- und Fettanteil gegen induzierte Fettleibigkeit geschützt.^{54, 66}

Tabelle 1: Übersicht der Charakteristika von keimfreien Gnotobioten im Vergleich zu konventionell aufgewachsenen Versuchstieren.

		Bezogen auf keimfreie Gnotobioten	Referenz
Morphologische Eigenschaften	Größe (Herz, Milz, Leber, Lymphknoten)	↓	49-52
	Größe Zökum	↑	52, 45
	Körperfett	↓	52, 53, 54
	Darmzottenbreite	↓	55
	Darmzottenlänge	↑	56
Immunologische, physiologische und biochemische Eigenschaften	Kurzkettige Fettsäuren (SCFA)	↓	59, 60
	Darmbeweglichkeit	↓	60, 61
	Proliferation	↓	62
	Vitamin B und Vitamin K	↓	60
	Anzahl T-Zellen, Monozyten, neutrophile Granulozyten	↓	64, 65
	Fressverhalten	↑	60
	Lokomotorik	↑	60
	Darmvaskularisierung	↓	55, 230
	Erneuerung der Darmzellen	↓	230

Neben der Morphologie sind auch Unterschiede zwischen keimfreien und konventionellen Versuchstieren in den immunologischen, physiologischen wie auch biochemischen Funktionen zu finden. Hierbei konnte in Tierstudien festgestellt werden, dass keimfreie Tiere eine herabgesetzte Darmbeweglichkeit, eine verringerte Darmvaskularisierung sowie verminderte Zellerneuerung der Darmzellen bzw. Proliferation aufweisen.^{55, 60-62, 230} Weitere Unterschiede der keimfreien Gnotobioten zu konventionell aufgewachsenen Tieren konnten im Fressverhalten wie auch in lokomotorischen Aktivitäten nachgewiesen werden.⁶⁰ Besonders bei der Ernährung der keimfreien Gnotobioten ist darauf zu achten, dass zur Erhaltung der Gesundheit, das Futter mit Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin A (Retinol) und Vitamin K angereichert wird.^{67, 68} In weiteren Mausstudien konnte festgestellt werden, dass GF Versuchstiere

verglichen zu den CONV-R Tieren eine geringere Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Darminhalt vorweisen.^{60, 69} In Mäusen, die mit Antibiotika behandelt wurden, konnte neben einer verminderten Anzahl an kurzkettigen Fettsäuren, eine Veränderung im Gallensäure- und Glucosemetabolismus festgestellt werden.^{70, 71} Neben dem Einfluss auf metabolische Prozesse kann die Darmmikrobiota auch die Zellpopulation von Immunzellen beeinflussen. Dabei wurde festgestellt, dass die Zahl an T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Knochenmark sowie im Blut von keimfreien Mäusen reduziert waren (**Tabelle 2**).⁶⁴

Tabelle 2: Einfluss der Mikrobiota auf die Zellpopulation.

Zellen	Keimfreie Gnotobioten	Antibiotika behandelte Mäuse	Referenz
Monozyten	↓	↓	72, 73
Makrophagen	↓	↓	73, 74
Neutrophile Granulozyten	↓	↓	65, 73, 75
Basophile Granulozyten	↑	↑	43, 76
Eosinophile Granulozyten	↑	↑	77, 78
T-Zellen	↓	↓	64, 79
B-Zellen	↓	↓	79, 80, 81
Dendritische Zellen	↓	↓	75, 82

Die Anzahl an Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen (Lymphozyten) war in den keimfreien und in Antibiotika-behandelten Mäusen reduziert. Dagegen wurde in beiden Mausmodellen eine erhöhte Anzahl an basophilen und eosinophilen Granulozyten (Leukozyten) festgestellt (**Tabelle 2**).⁴³

3.3 Immunabwehr

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor potenziellen Eindringlingen, wie Bakterien, Viren oder Parasiten zu schützen. Die Immunabwehr besteht aus der adaptiven und der angeborenen Immunantwort. Beide Abwehrlinien verfügen über zelluläre und humorale Bestandteile. Die zellulären Bestandteile umfassen Abwehrzellen wie Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und die NK-Zellen. Bestandteile der humoralen Immunantwort sind das Komplementsystem, Lysozyme, Zytokine und über B-Lymphozyten/Plasmazellen gebildete Antikörper.^{83, 86}

3.3.1 Granulozyten (Leukozyten)

Neben den Monozyten und Lymphozyten gehören die Granulozyten zu den Leukozyten, den weißen Blutkörperchen, die das Eindringen von Pilzen, Bakterien oder Viren verhindern. Die Granulozyten lassen sich in die drei Typen basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten (**Abbildung 7**) unterteilen und sind Teil der unspezifischen (angeborenen) Immunabwehr.

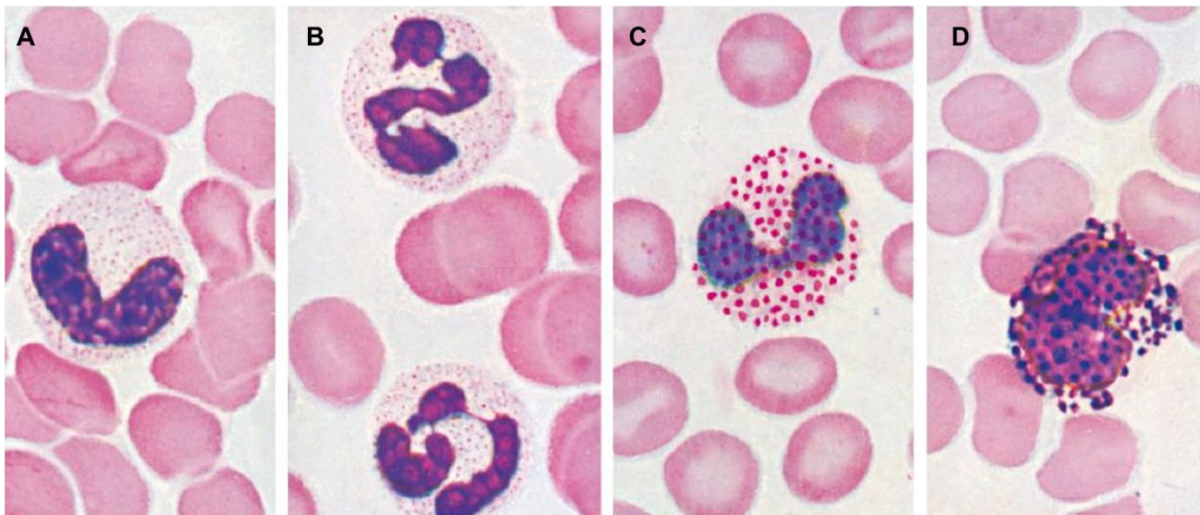


Abbildung 7: Darstellung der Granulozyten im Blutausstrich (veränderte Abbildung nach Kühnel).⁸⁷ **A** Stabkerniger neutrophiler Granulozyt. **B** Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt. **C** Eosinophiler Granulozyt. **D** Basophiler Granulozyt. Vergrößerung 900-fach.

Die drei Granulozyten-Typen können anhand ihrer unterschiedlichen Granula (Form, Größe und Inhalt) differenziert werden. Da die Kerne über verschiedene Formen verfügen, werden die Granulozyten auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet.

In **Tabelle 3** ist die Verteilung der neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten im Menschen und in der Maus zusammengefasst.^{88, 89}

Tabelle 3: Verteilung der Granulozyten im peripheren Blut im Menschen und der Maus.^{88, 89}

	Mensch (x10⁹ Zellen/L)	Maus (x10⁹ Zellen/L)
Neutrophile Granulozyten	1,70-7,00	0,46-2,20
Basophile Granulozyten	0,00-0,08	0,00-0,09
Eosinophile Granulozyten	0,03-0,40	0,00-0,38

Basophile Granulozyten:

Die basophilen Granulozyten sind im Vergleich zu den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten seltener im Blut (Mensch und Maus) zu finden (<1% der Leukozyten) und sind etwa 14-16 µm groß.⁸⁴ Der Zellkern ist groß, hantelförmig und seltener segmentiert. Die im Zytoplasma zu findenden unregelmäßig groben und großen Granula (bis 1 µm) überdecken überwiegend den Zellkern. In den Granula der basophilen Granulozyten sind Histamin, Heparin, Prostaglandine und Zytokine gespeichert. Diese Mediatoren können Gefäßerweiterungen, vermehrte Kapillarpermeabilität und eine Verhinderung der Blutgerinnung bewirken. Durch das in den Granula vorliegende Heparin erscheinen im Blutaussstrich die basophilen Granula dunkelblau-violett (**Abbildung 7D**). Neben der Beteiligung an allergischen Entzündungen, wehren die basophilen Granulozyten Wurmparasiten ab und schützen den Organismus durch die Produktion von antimikrobiellen Proteinen gegen Bakterien.^{83, 88-91}

Eosinophile Granulozyten:

Eosinophile Granulozyten verfügen über zwei Kernsegmente und haben einen Durchmesser von 12 bis 17 µm. Die im Zytoplasma vorliegenden Granula haben eine Größe von 0,3-1,5 µm und füllen wie schon in den basophilen Granulozyten das Zytoplasma fast vollständig aus. In den Granula ist das zytotoxische Major Basic Protein (MBP), das Parasiten abtötet und proinflammatorische Zellen aktiviert, zu finden. In kleineren Granula (0,1-0,5 µm) sind Enzyme wie die saure Phosphatase, Histaminase, Kollagenase, Protease (Serinprotease)⁸⁵ und Elastase gespeichert. Durch die in den Granula vorliegenden basischen Proteinen färben sich die Granula der Eosinophilen mit dem sauren Eosinfarbstoff rot (**Abbildung 7C**). Neben der Bekämpfung der Helminthen-Erkrankung (parasitisch lebende Würmer) sind die eosinophilen Granulozyten auch an der Überempfindlichkeitsreaktion (Allergien) beteiligt.^{83, 88, 90}

Neutrophile Granulozyten:

Die neutrophilen Granulozyten machen im Menschen etwa 60-70% (in der Maus 5-40%)⁸⁴ aller im Organismus zirkulierenden Leukozyten aus und bilden die erste Linie der Immunabwehr. Abhängig von der Form des Zellekerns wird zwischen stabkernigen und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten unterschieden. In unreifen Neutrophilen ist der Kern stabkernig (**Abbildung 7A**), dagegen besteht in reifen neutrophilen Granulozyten der Kern aus drei bis vier Segmenten und wird somit auch als segmentkernig (**Abbildung 7B**) bezeichnet. Die im Knochenmark gebildeten Neutrophilen haben einen Durchmesser von etwa 12-15 µm. Im Menschen werden pro Tag ca. 10^{11} neutrophile Granulozyten produziert. In Mausstudien konnte festgestellt werden, dass das Knochenmark von Mäusen einen Reservepool funktionell reifer neutrophiler Granulozyten enthält, der während bakterieller Infektionen schnell mobilisiert werden kann. Dieses Reservoir enthält 20-mal mehr neutrophile Granulozyten als das periphere Blut.⁹⁴ Die neu gebildeten Zellen können in der Blutzirkulation für etwa 8 bis 12 Stunden und im Gewebe für 1-2 Tage überleben.^{88, 90, 92} Bei einer auftretenden Infektion wandern die im Blutstrom zirkulierenden

neutrophilen Granulozyten durch das Endothel der postkapillaren Venolen (erhöhte Permeabilität) zum geschädigten Gewebe. Der Vorgang der Leukozytentransmigration lässt sich in die Abschnitte Rollen, Adhäsion und Diapedese (Durchquerung des Endothels) zusammenfassen (**Abbildung 8**).⁹⁰

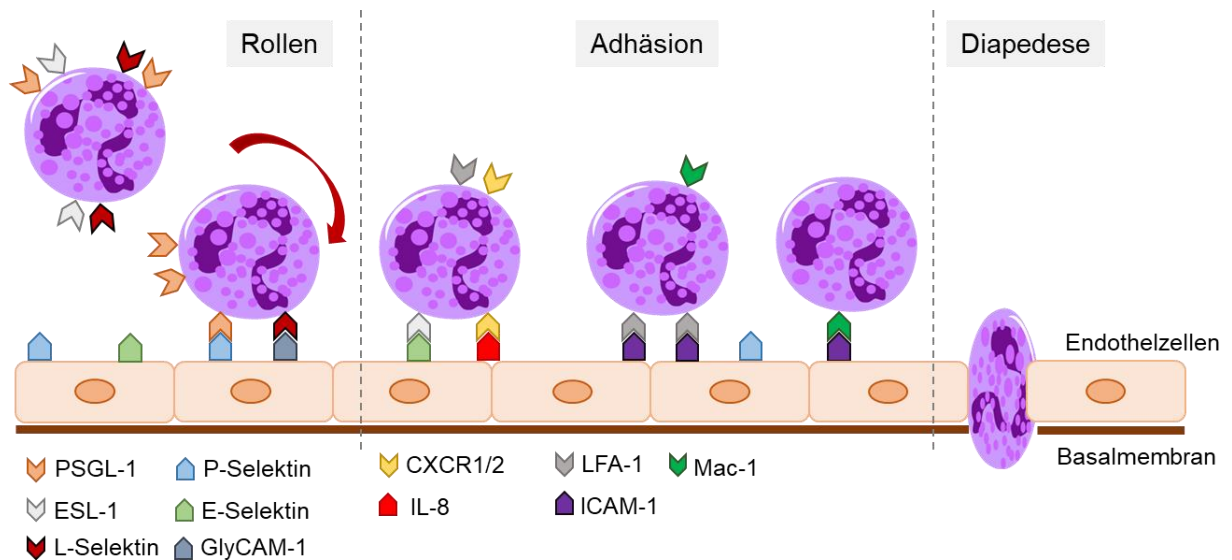


Abbildung 8: Vereinfachte schematische Darstellung der Rekrutierung und Transmigration am Beispiel eines neutrophilen Granulozyten.

Die Leukozytentransmigration beginnt nach der Rekrutierung der Immunzellen mit dem Rollen der neutrophilen Granulozyten auf der vaskulären Zelloberfläche. Die durch Makrophagen ausgeschütteten Zytokine IL-1 und TNF- α (Tumornekrosefaktor) bewirken eine vermehrte Expression der Zelladhäsionsmoleküle P- und E-Selektin. Das Rollen der Granulozyten wird durch die Bindung der Adhäsionsmoleküle P-/E-Selektin und GlyCAM-1 (Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) auf dem Endothel mit den Liganden PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), ESL-1 (E-selectin ligand-1) und L-Selektin, die auf den neutrophilen Granulozyten exprimiert sind, induziert.^{83, 95-97} Durch die Interaktion von endothelial exprimierten IL-8 (Chemokin) mit seinen Chemokin-Rezeptoren CXCR1/2 auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten, kommt es zur Aktivierung der Integrine LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) und Mac-1 (Macrophage-1 antigen).⁹⁸ LFA-1 und Mac-1 bilden die Integrinkette $\beta 2$.⁹³ Hierbei kommt es durch die Bindung der Integrine an ICAM-1 (Intracellular cell adhesion molecule-1) zu einer verstärkten Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an das Endothel.^{83, 99} Im letzten Schritt wandern die neutrophilen Granulozyten zwischen den Endothelzellen durch die Basalmembran in

das Gewebe. Dieser Vorgang wird durch das Molekül PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule), welches auf den neutrophilen Granulozyten und am Rand der Endothelzellen lokalisiert ist, induziert. In Anwesenheit von Chemokinen wandern die ins Interstitium migrierten Zellen weiter zur Stelle der Entzündung.⁸³

Zur Bekämpfung pathogener Erreger verfügen die neutrophilen Granulozyten über zwei Typen von Granula. Die im Zytoplasma gelagerten Granula sind klein (< 1 µm) und erscheinen im Blutaussstrich rosa bis lila. Die neutrophilen Granula lassen sich in die Typen „azurophile“ und „spezifische“ Granula unterteilen. In den primären azurophilen Granula sind die Myeloperoxidase, Elastase, Cathepsin G, saure Hydrolasen und α-Defensine enthalten. Die sekundären Granula oder spezifische Granula enthalten wie die azurophilen Granula neben dem Lysozym auch weitere bakterizide Substanzen, wie das Laktoferrin und die alkalische Phosphatase. Während in den tertiären Granula die Gelatinase enthalten ist. Dadurch sind die neutrophilen Granulozyten in der Lage Pathogene über eine intrazelluläre Phagozytose oder über eine extrazelluläre Entleerung der Granula zu bekämpfen. Die extrazelluläre Form der Verteidigung ist durch eine Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) gekennzeichnet.^{90, 91, 101}

3.3.2 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Neutrophil Extracellular Traps, auch kurz NETs genannt, bestehen im Allgemeinen aus glatten Fasern, dem Chromatin, mit einem Durchmesser von etwa 15-17 nm und kugelförmigen Domänen (Proteine) die an die Fasern gebunden sind. Diese Fasern können ein dreidimensionales dichtes Netzwerk bis hin zu einem Durchmesser von 50 nm bilden, welches in der Lage ist Pathogene einzufangen. Nur etwa 20 % der neutrophilen Granulozyten sind in der Lage diese netzartigen Strukturen auszubilden.¹⁰⁰⁻¹⁰²

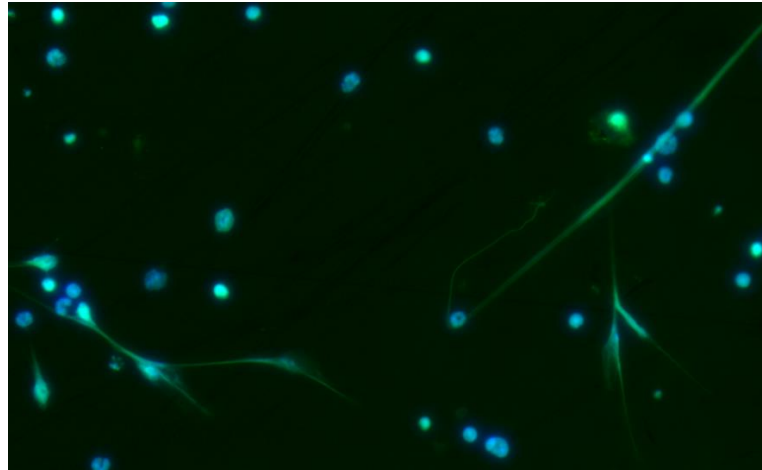


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Neutrophil Extracellular Traps (NETs). LPS induzierte NET-Bildung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark einer Wildtyp Maus (C57BL/6J). Immunfluoreszenz; NETs/DNA werden mit dem Farbstoff SYTOX Green (färbt die extrazelluläre DNA, grün) und die nukleare DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab 100 μm .

Die Fasern der Netzstruktur bestehen aus dem Chromatin, genauer gesagt aus der entfalteten DNA und den an ihr gebundenen Histonen, sowie den Enzymen und verschiedenen antimikrobiellen Proteinen, die Pathogene unschädlich machen.⁹⁰ Zu den Proteinen und Enzymen gehören die Myeloperoxidase (MPO), Neutrophile Elastase (NE), Histone, Cathepsin G und das Lactoferrin.^{100, 102} Da die DNA den Hauptbestandteil der NETs bildet, kann durch den Einsatz der Desoxyribonuklease (DNase) die NET-Strukturen zerbrochen bzw. die NET-Bildung verringert bis verhindert werden.^{100, 104, 105}

Die Stimulierung der neutrophilen Granulozyten und der damit verbundenen Ausschüttung der NET-Fasern erfolgt durch diverse Stimuli. Zu den bekanntesten Stimuli gehören das Lipopolysaccharid (LPS), Phorbol Myristat Acetat (PMA), Calciumionophor A23187 oder das Interleukin-8 (IL-8).^{100, 106, 107} Auch Bakterien (gram-positiv und gram-negativ), Pilze, aktivierte Plättchen oder Viren können die Bildung von NETs induzieren.^{100, 106, 108}

Der Vorgang der NET-Bildung wird als NETose bezeichnet. Die NETose bzw. die Ausschüttung der NETs in den extrazellulären Raum verläuft über zwei verschiedene Wege ab (**Abbildung 10**). Die erste bzw. bekannteste Form der NET-Bildung ist die sogenannte „suizidale“ NETose (**A**), die letztendlich zum Zelltod der neutrophilen Granulozyten führt. Nach Aktivierung benötigen die Zellen etwa 3 bis 4 Stunden, bis es zur Bildung und Freisetzung der NETs kommt.¹⁰⁹⁻¹¹²

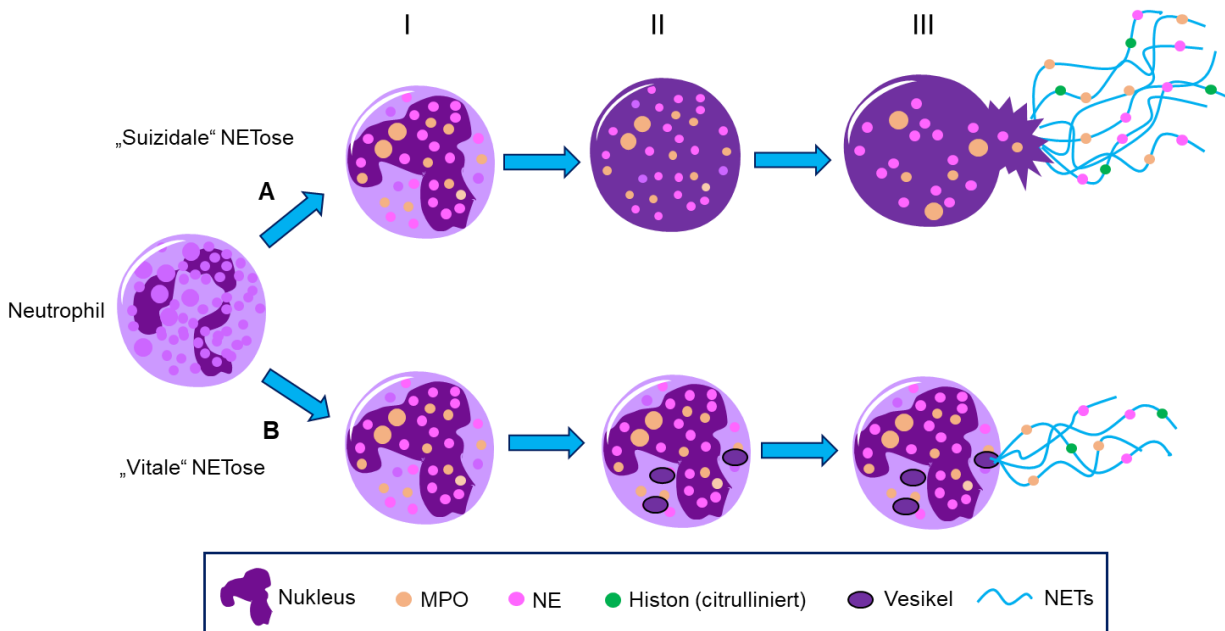


Abbildung 10: Schematische Darstellung der NET-Bildung. Neutrophile Granulozyten können nach Aktivierung auf zwei unterschiedlichen Wegen NETs bilden. Hierbei wird zwischen der lytischen NET-Bildung („suizidale“ NETose) und der nicht lytischen NET-Bildung („vitale“ NETose) unterschieden. Während bei der „suizidalen“ NETose nach Ruptur der Plasmamembran NETs in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und die Zelle abstirbt, werden bei der „vitalen NETose“ die NETs über Vesikel transportiert und Exozytose in den extrazellulären Raum freigesetzt. Bei diesem Vorgang bleiben die neutrophilen Granulozyten intakt.

Die Stimulierung der neutrophilen Granulozyten führt zur Freisetzung von Calcium (Ca^{2+}) aus dem Zytoplasma, wodurch es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) kommt. Diese induziert die Aktivierung der NADPH-Oxidase, woraufhin die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert wird. Die Bildung von ROS führt zur Aktivierung des Enzyms Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) und zur Ruptur der neutrophilen Granulähüllen, wodurch es zur Freisetzung der Myeloperoxidase (MPO) und der Neutrophilen Elastase (NE) kommt (**Abbildung 10, AI**).¹¹⁰⁻¹¹³ Die Aktivierung von PAD4 hat zur Folge, dass es zu einer Dekondensation des Chromatins bzw. einer Auflockerung des dicht gepackten DNA/Histon-Komplexes kommt (**Abbildung 11**). Dieser Mechanismus ist unter dem Begriff Citrullinierung oder Deiminierung bekannt. Hierbei kommt es zur enzymatischen Umwandlung eines positiv geladenen Arginins zum ungeladenen Citrullin und somit zur Dekondensation der Chromatinstruktur.^{114, 115} Das durch PAD4 citrullinierte Histone 3 (citH3) ist ein wichtiger Marker der *Neutrophil Extracellular Traps*.^{116, 117}

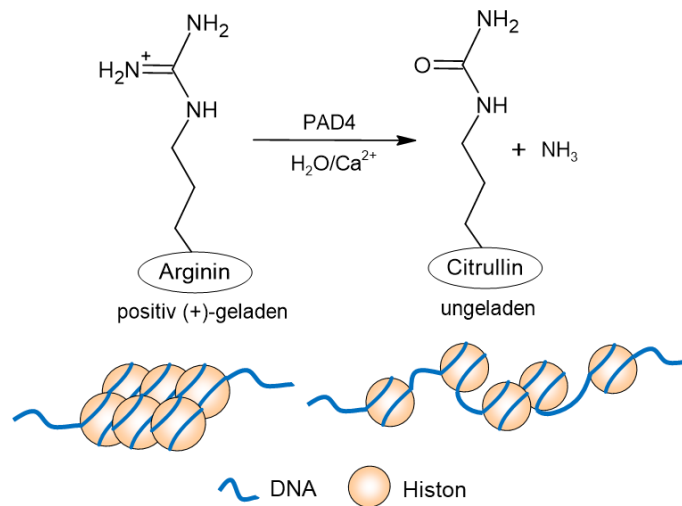


Abbildung 11: Mechanismus der PAD4-katalysierten Reaktion (Ca^{2+} -abhängig) des Arginins in ein Citrullin. Durch den Verlust der positiven Ladung kommt es zu einer Dekondensation (Auflockerung) der Chromatin-Struktur.

Die Enzyme MPO und NE verlagern sich in den Zellkern, wo sie neben PAD4 an der Auflockerung der Chromatin-Struktur beteiligt sind. Durch den fortlaufenden Vorgang der Dekondensation dehnt sich das Chromatin immer weiter aus, was letztendlich zur Ruptur der Zellkernmembran führt (**Abbildung 10, AI** → **AII**).¹¹⁸ Im letzten Schritt (**Abbildung 10, AIII**) kommt es zur Ruptur der Plasmamembran und der vollständigen Entleerung des Zytoplasmainshalts in den extrazellulären Raum. Die hier freigesetzten NETs bestehen aus den DNA-Fäden und den gebundenen Proteinen/Enzymen MPO, NE, citrullinierte Histone (**Abbildung 10**). Die zweite und schnelle Form der NET-Bildung (5 bis 60 Minuten) beschreibt die „vitale“ NETose (**B**).¹⁰⁹ In diesem Fall bleiben nach der Freisetzung der NETs die neutrophilen Granulozyten intakt und sind noch in der Lage Phagozytose und Chemotaxis durchzuführen. Verglichen zur „suizidalen“ NETose ist hier die NADPH-Oxidase nicht von Bedeutung. Auch kommt es nach Stimulierung der neutrophilen Granulozyten zu einer Aktivierung des Enzyms PAD4, sowie der Verlagerung von NE und MPO in den Nukleus, mit anschließender Dekondensation des Chromatins (**Abbildung 10, BI**). Im nachfolgenden Schritt bilden sich Vesikel aus der Kernmembran, in denen sich das Chromatin und die antimikrobiellen Proteine bzw. Enzyme befinden (**Abbildung 10, BII**). Abschließend werden die in den Vesikel befindlichen NETs mittels Exozytose in den extrazellulären Raum entlassen (**Abbildung 10, BIII**).¹¹⁰⁻¹¹²

Die Hauptaufgabe freigesetzter NETs liegt, darin, eingedrungene Pathogene zu binden und mittels ihrer antimikrobiellen Fähigkeit eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*)^{100, 106, 119}, Viren (Influenza A, HIV-1)^{120, 121} und Pilzen (*Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*)^{106, 122} zu eliminieren. Obwohl NETs schützen sollen, kann die Überexpression der NETs eine schädliche Wirkung zur Folge haben. In Experimenten konnte der Einfluss der NETs in Bereichen wie der Infektion (Sepsis)^{123, 124}, Autoimmunität (Psoriasis, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Rheumatoide Arthritis und Diabetes Mellitus Typ1)¹²⁵⁻¹²⁸, Autoinflammatorische Erkrankungen (Gicht, Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn)^{129, 130}, Stoffwechselerkrankungen (Fettleibigkeit und Diabetes Mellitus Typ2)^{128, 131} sowie in Gefäßerkrankungen (Atherosklerose, Thrombose)^{105, 132-135}, beobachtet werden. Aktuell wird der Zusammenhang zwischen NETs und dem COVID-19 Virus untersucht. In ersten Experimenten konnten im Serum, Plasma und Gewebeproben von COVID-19 positiven Patienten, citrulliniertes Histone (citH3), freie DNA und DNA-MPO-Verbindungen nachgewiesen werden.^{136, 137}

3.4 Toll-like Rezeptoren

3.4.1 Mustererkennung durch Toll-like Rezeptoren (TLR)

Toll-like Rezeptoren, kurz TLRs, gehören zur Gruppe der pattern-recognition receptors (PRR), die der Erkennung von Pathogenen, wie Bakterien, Viren oder Pilzen, dienen. TLRs sind Transmembran-Glykoproteine. Sie bestehen aus N-terminalen leucinreichen Ektodomänen (LRR, leucine-rich repeat), wobei ein LRR-Motiv aus etwa 20 bis 30 Aminosäuren bestehen kann und Pathogene erkennt. Neben einer transmembranen Domäne verfügen die Toll-like Rezeptoren über eine intrazelluläre C-terminale Signaldomäne, der Toll-interleukin 1 (Toll/IL-1) Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne), die für die Signaltransduktion relevant ist (**Abbildung 12**).^{138, 139}

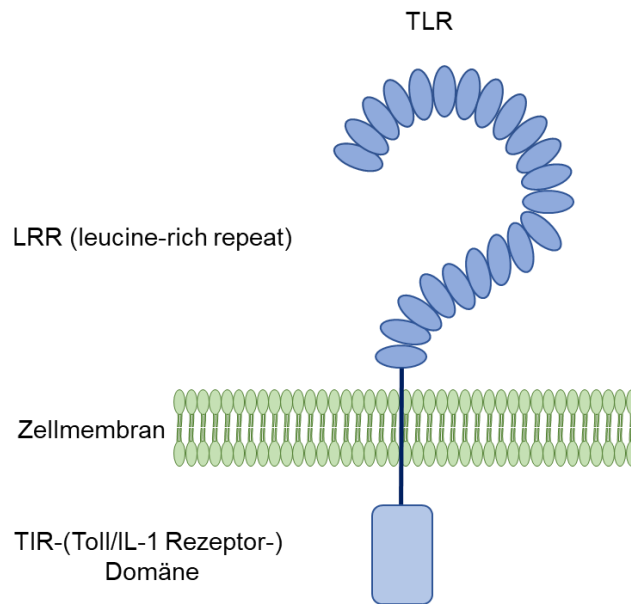


Abbildung 12: Vereinfachte Darstellung des strukturellen Aufbaus der Toll-like Rezeptoren.

Toll-like Rezeptoren, die auf den Zelloberflächen von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen oder Mastzellen zu finden sind, erkennen charakteristische Muster von Molekülen (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) bestimmter Mikroorganismen und lösen durch deren Erkennung und Bindung eine Immunreaktion aus.^{140, 141} Bisher konnten im Menschen 10 und in der Maus 12 Toll-like Rezeptoren bestimmt werden. Im Menschen wie auch in der Maus sind die Rezeptoren TLR1 bis TLR9 vertreten, während der TLR10 in der Maus inaktiv ist und die TLRs 11, 12 und 13 im Menschen nicht mehr existent sind.^{140, 141} Des Weiteren lassen sich die Toll-like Rezeptoren anhand ihrer Lokalisation in zwei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe sind die Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, 5, 6 und 10^{142, 143} zusammengefasst, die auf den Oberflächen von Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen, Mastzellen oder B-Zellen, exprimiert werden.¹³⁹⁻¹⁴¹ Hierdurch wird die Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen ermöglicht. Zusätzlich können TLRs neben den Immunzellen auch auf Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen^{144, 145} und in Kardiomyozyten^{146, 147} sowie glatten Muskelzellen¹⁴⁸ exprimiert werden. Hingegen liegen die Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8, 9, 11^{151, 152}, 12¹⁵³ und 13^{154, 155} intrazellulär bzw. endosomal und im Endoplasmatischen Retikulum vor und wehren mögliche intrazelluläre Erreger durch die Erkennung der Erreger-RNA/DNA ab.¹³⁹⁻¹⁴¹ In **Tabelle 4** ist eine Zusammenfassung der Toll-like Rezeptoren mit Beispielen für ihre jeweiligen Liganden dargestellt. Toll-like Rezeptor 2, der Heterodimere mit den Toll-like Rezeptoren 1 und 6 bildet, erkennt eine Vielzahl von verschiedenen Liganden.

Neben di- und triacylierten Lipopeptiden von Bakterien und Mykoplasmen erkennen diese heterodimeren Komplexe Zellwandkompartimente von gram-positiven Bakterien wie auch Pilzen. Dagegen werden von den intrazellulären Rezeptoren 3, 7 und 8, die virale doppelsträngige RNA und virale einzelsträngige RNA erkannt, während der Toll-like Rezeptor 9 bakterielle DNA mit unmethylierten CpG-Motiven erkennt. Neben dem TLR2 erkennt auch der TLR4 bakterielle Zellwandbestandteile. Lipopolysaccharide (LPS), Bestandteile der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien, sind die wichtigsten Liganden des Toll-like Rezeptors 4. Des Weiteren kann der TLR4 auch körpereigene endogene Liganden erkennen und binden. Endogene Liganden werden als damage-associated molecular patterns (DAMPs) bezeichnet.¹⁵⁶ Zu diesen Liganden gehören die Hyaluronsäure, Fibrinogen sowie die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70. Das Flagellin, ein Protein, welches ein Hauptbestandteil der Flagellen oder Geißeln von Bakterien ist, werden vom TLR5 erkannt und gebunden. Toll-like Rezeptor 10, das in der Liste als letzter TLR im Menschen aktiv ist, erkennt das Glykoprotein 41 (gp41), ein Transmembranprotein des humanen Immundefizienzvirus (HIV). Die im Endosom exprimierte Toll-like Rezeptoren 11 und 12 erkennen das eukaryotische Protein Profilin bzw. Profilin-ähnliche Proteine des Parasiten *Taxoplasma gondii*. Zusätzlich ist der TLR11 in der Lage unbekannte Komponenten von uropathogenen Bakterien (*E. coli*) zu erkennen. Der ebenfalls endosomal exprimierte TLR13 erkennt die bakterielle 23S rRNA.

Tabelle 4: Auflistung der Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden.

Rezeptor	Liganden	Quelle der Liganden	Referenz
TLR1- TLR2	Triacylierte Lipopetide	Bakterien, Mykobakterien	158, 176
TLR3	Doppelsträngige RNA Poly (I:C) (Analogon der doppelsträngigen RNA)	Viren Synthetisch hergestellt	159-161
TLR4	Lipopolysaccharid Hyaluronsäure Fibrinogen Hitzeschockproteine 60 und 70	Gram-negative Bakterien Wirtszellen Wirtszellen Wirtszellen	157, 177
TLR5	Flagellin	Bakterien	162
TLR6- TLR2	Lipoteichonsäure (LTA) Diacylierte Lipopeptide Zymosan	Gram-positive Bakterien Mykoplasmen Pilze	163, 176
TLR7	Einzelsträngige RNA 2',3'-cGMP	Viren	164, 165
TLR8	Einzelsträngige RNA Bakterielle RNA	Viren Bakterien	166, 167
TLR9	CpG-DNA Mitochondriale DNA	Bakterien, Viren	168, 169, 171, 172
TLR10	HIV-1 gp41	Viren	142, 143
TLR11	Profilin-ähnliche Proteine Unbekannte proteinreiche Komponenten Flagellin	<i>Taxoplasma gondii</i> Uropathogene Bakterien <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>E. coli</i>	170, 173, 174
TLR12	Profilin	<i>Taxoplasma gondii</i>	153
TLR13	Bakterielle ribosomale RNA	Bakterien	154, 155, 175

3.4.2 Signaltransduktion von TLR4

Die TLR4-abhängige Signaltransduktion erfolgt mit der Erkennung und Bindung von LPS an das Plasmaprotein LBP (Lipopolysaccharid-bindendes Protein) und dem anschließenden Transfer von LPS durch den LPS-LBP-Komplex zum Glykosylphosphatidylinositol-Ankerprotein CD14 (cluster of differentiation 14). Das Protein CD14 kann als Oberflächenprotein mCD14 als auch in gelöster Form (sCD14) im Serum auftreten. Im Folgenden wird das LPS weiter an das Protein MD2 (Lymphozytenantigen 96), welches an der extrazellulären Domäne (LRR, **Abbildung 12**) des Toll-like Rezeptor 4 gebunden ist, geleitet. Durch die Bindung des LPS an den TLR4/MD2 Rezeptor-Komplex erfolgt eine Dimerisierung des genannten Komplexes und der anschließenden Rekrutierung von verschiedenen Adaptermolekülen, die für die Signalweiterleitung essentiell sind.¹⁷⁸⁻¹⁸¹ In **Abbildung 13** wird eine vereinfachte Darstellung der TLR4 Signaltransduktion gezeigt.

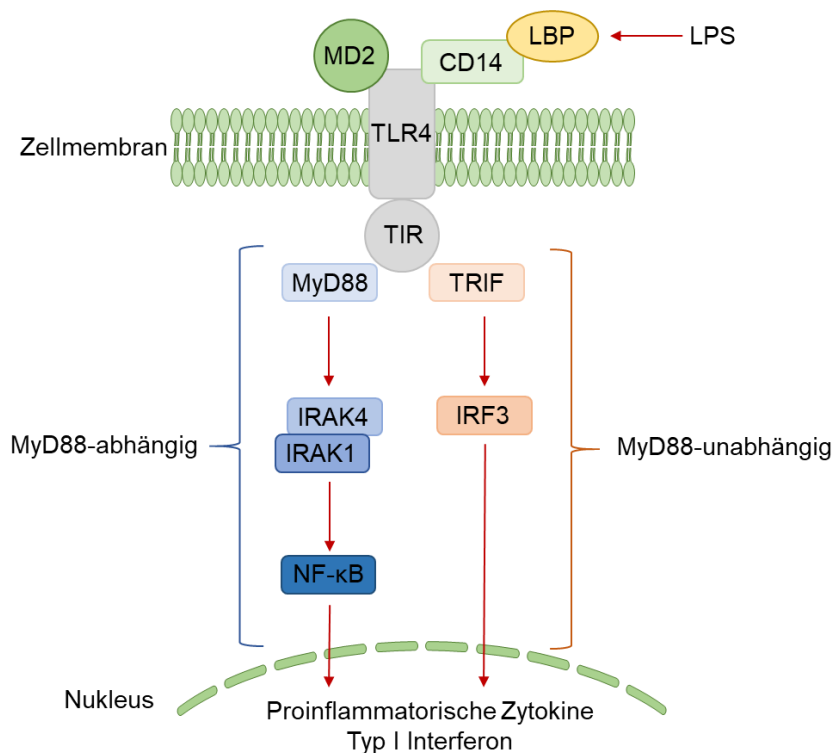


Abbildung 13: Vereinfachte schematische Darstellung des TLR4 Signalwegs. Durch LPS-Aktivierung des TLR4-Rezeptors kommt es zur Rekrutierung und Bindung der Adaptermoleküle MyD88 (Zellmembran) und TRIF (Endosom) an die TLR4-TIR-Domäne. Im MyD88-abhängigen Signalweg werden durch Phosphorylierung von NF-κB die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen induziert. Im MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg kommt es durch die Phosphorylierung und Aktivierung von IRF3 zur Bildung von Typ I Interferonen.

Da der TLR4 in der Lage ist, die Adaptermoleküle MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) mit TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) sowie TRIF (TIR domain containing adaptor protein inducing IFN β) mit TRAM (TRIF related adaptor molecule) zu binden, kann der TLR4 Signalweg in zwei Hauptwege unterteilt werden. Zum einen in den MyD88-abhängigen und zum anderen in den MyD88-unabhängigen bzw. TRIF-abhängigen Signalweg.¹⁷⁸⁻¹⁸¹ Die Aktivierung der beiden Signalwege läuft nacheinander ab. Der TLR4 löst zunächst den TIRAP-MyD88-Signalweg an der Zellmembran aus. Anschließend kommt es zu einer Endozytose (Bildung von Vesikeln bzw. Endosomen), wobei TLR4 intrazellulär (im Endosom) exprimiert wird und es zur Aktivierung des TRAM-TRIF-Signalweges kommt.^{182, 183}

3.4.2.1 Der MyD88-abhängiger Signalweg

Nach der Aktivierung mit LPS und der Bindung der Adaptermoleküle MyD88 und TIRAP an die TIR-Domäne des Toll-like Rezeptor 4 kommt es zur Rekrutierung von IRAK4 (Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 4). Die Bindung von IRAK4 an MyD88 erfolgt durch die Wechselwirkung zwischen den Todesdomänen der beiden Moleküle. Daraufhin wird IRAK 1 (Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 1) gebunden und phosphoryliert. IRAK1 bindet weiter an TRAF6 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6), der zu einem Signalkomplex, bestehend aus UBC13 (Ubiquitin konjugiertes Enzym 13) und UEV1A (Ubiquitin konjugiertes Enzym E2 Variante 1 Isoform A), gehört. Durch eine Ubiquitinierung des Signalkomplexes kommt es zur Bindung und Aktivierung durch Auto-Phosphorylierung von TAK1 (TGF β -aktivierte Kinase 1). Des Weiteren kann TAK1 MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase) und den IKK- (I κ B-Kinase) Komplex aktivieren. Dadurch können direkt oder über Phosphorylierung Signalmoleküle der MAP-Kinase und des NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) Signalweges aktiviert werden. In Folge der Phosphorylierung werden die an NF- κ B gebundenen inhibitorischen Moleküle dissoziiert und eine NF- κ B abhängige Transkription ermöglicht. Zu den im Zellkern durch Transkription induzierten Genen gehören proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumor Nekrose Faktor alpha) und Interleukin 6 (IL-6), die für Entzündungsreaktionen und Regulation der Immunantwort von zentraler Bedeutung sind.^{141, 177, 180, 181}

3.4.2.2 Der MyD88-unabhängige und der TRIF-abhängige Signalweg

Bei der MyD88-unabhängigen Signaltransduktion werden die Adaptermoleküle TRAM und TRIF rekrutiert und binden an die TIR-Domäne des Toll-like Rezeptor 4. Hierbei kommt es zu einer zeitlich verzögerten Aktivierung von NF- κ B und den MAP-Kinasen durch die Bindung von RIP1 (Rezeptor-interagierendes Protein1) an das Adaptermolekül TRIF. Daraufhin kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von IRAK1 und TRAF6, die bereits beim MyD88-abhängigen Signalweg für die spätere Aktivierung von NF- κ B relevant sind. Zusätzlich erfolgt im TRIF-abhängigen Signalweg die Aktivierung des IRF3 (Interferon-Regulationsfaktor 3) durch dessen Bindung mit TRAF3 (TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 3), TANK (TRAF-Familie assoziiertes NF- κ B Aktivator), TBK1 (TANK bindende Kinase 1) und IKKi. Hierbei kommt es zur Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF3. Das in den Zellkern migrierte IRF3 induziert die Bildung von Typ I IFN (Interferon), die Regulatoren des Immunsystems sind.^{141, 177, 180, 181}

3.4.3 Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin)

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Wie in **Abbildung 14** dargestellt, wird das LPS in drei Abschnitte unterteilt.

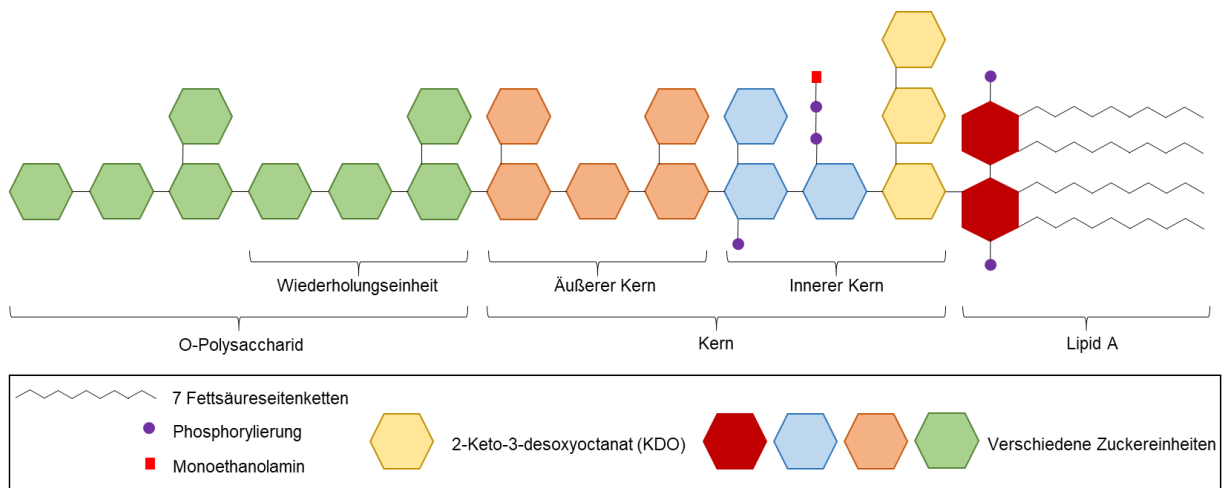


Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung des allgemeinen Aufbaus von LPS.¹⁸⁴ Das Lipopolysaccharid wird in drei Abschnitte eingeteilt: das Lipid A, eine Kern-Oligosaccharid-Einheit und eine O-spezifische Seitenkette.

Der erste Abschnitt des Lipopolysaccharids umfasst das hydrophobe Lipid A, das in die Zellmembran integriert ist. Das hoch konservierte Lipid A ist aus zwei phosphorylierten Glucosaminresten und 6 Fettsäureketten aufgebaut. Wobei 4 Fettsäureketten direkt und zwei über eine Veresterung an das Disaccharid gebunden sind. Innerhalb verschiedener Bakterien kann es zu einer Variation der Anzahl an Fettsäureketten kommen. Im Fall von *Helicobacter pylori*^{186, 187} verfügt das Lipid A über 4 Fettsäureketten, während beim *Acinetobacter*¹⁸⁸ sogar 7 Fettsäureketten am Glucosaminrest gebunden sind. Dagegen verfügt das Lipid A von *Escherichia coli*¹⁸⁵ über 6 Fettsäureketten und wird somit auch als Lipid A-Prototyp bezeichnet. Das pentaacylierte Lipid A (5 Fettsäureketten) bewirkt eine verminderte TLR4-abhängige Zellaktivierung und kann inhibitorisch auf die Aktivierung mit hexaacylierten LPS reagieren.^{149, 150} Am Glucosaminrest von Lipid A ist die strukturell konservierte Kern-Oligosaccharid-Region gebunden, die aus einem inneren und einem äußeren Kern besteht. Im inneren Kern bindet das 2-Keto-3-desoxyoctanat (KDO) direkt an den Glucosaminrest von Lipid A und an überwiegend phosphorylierten Heptosen, wie der L-Glycero-D-Mannoheptose. Dagegen sind im äußeren Kern Hexosen, wie die

Glucose und Galactose aber auch N-Acetylglucosamin gebunden. Die letzte Region des Lipopolysaccharids ist die O-Polysaccharidkette. Die äußere Schicht von LPS besteht aus wiederholenden und verzweigten Polysacchariden. Diese O-spezifische Seitenkette ist abhängig von Spezies und Stamm und ist aus variablen Oligosacchariden (Hexosen) aufgebaut.^{184, 185}

Das für die gram-negativen Bakterien charakteristische Lipid A induziert bei seiner Freisetzung aus der Zellmembran eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems. Durch die Entzündungsreaktionen kann es zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen oder gar zu einem septischen Schock kommen. Um solche unkontrollierten Reaktionen zu verhindern, wird LPS kontrolliert und wiederholt verabreicht. Durch die Gabe von LPS wird eine Endotoxin-Toleranz herbeigeführt. In Mausstudien konnte gezeigt werden, dass durch eine vermehrte Verabreichung von LPS die Mortalität sowie ischämische Gewebeschädigungen verhindert werden konnten.¹⁸⁹⁻¹⁹²

3.5 Mesenteriale Ischämie und Reperfusion

Die mesenteriale Ischämie (Mesenterialinfarkt) bezeichnet allgemein eine auftretende arterielle oder venöse Durchblutungsstörung des Darms, die zu einer dauerhaften Schädigung bis hin zur Zerstörung des Gewebes führen kann. Der akute Mesenterialinfarkt ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild und läuft in drei Phasen ab. Im Initialstadium (1. Phase) kommt es zur Bildung von heftigen und diffusen Bauchschmerzen. Dieser Zustand wird von Übelkeit und Erbrechen begleitet. In der zweiten Phase (Intervallstadium) kommt es kurzzeitig zu einer Abnahme der Schmerzintensität („fauler Frieden“). In der letzten Phase, dem Endstadium, verschlechtert sich der Allgemeinzustand drastisch. Weitere Symptome sind eine zunehmende Abwehrspannung, Hypotonie und ein blutiger Stuhlgang. Final kann es zur Entwicklung eines septischen Schocks kommen, was zum Tod des Patienten führen kann.^{194, 268} Durch anhaltende Ischämie kommt es zur Desintegration der Mukosa die letztendlich durch den Verlust der Barrierefunktion die Translokation von Bakterien fördert und Entzündungsreaktionen induziert.¹⁹³ Die akute mesenteriale

Ischämie (AMI) lässt sich durch ihre Ursache und über die Lokalisierung des Gefäßverschlusses in vier Gruppen unterteilen. Die arterielle Embolie, arterielle Thrombose, venöse Thrombose und die nonokklusive mesenteriale Ischämie (NOMI). Etwa 50% der AMI-Vorfälle geht auf die arterielle Embolie zurück. In 85% der Fälle ist die Durchblutungsstörung auf den Verschluss der *A. mesenterica superior* (im Menschen) zurückzuführen, die das distale *Duodenum*, das *Jejunum*, das *Ileum* sowie das *Kolon* versorgt.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Neben dem Mesenterium^{198, 199} können auch die Leber²⁰⁰, die Nieren²⁰¹, das Gehirn²⁰² sowie das Myokard²⁰³ von einer Ischämie und Reperfusion betroffen sein. Die durch die Ischämie hervorgerufene Schädigung des Gewebes kann durch die nachfolgende Reperfusion weiter verschlimmert werden. Als Reperfusion bzw. Reperfusionsschaden wird ein Zustand beschrieben, bei dem durch eine wiederhergestellte Durchblutung der Gefäße, Schäden entstehen können. Durch die nun wieder eingetretene Sauerstoffversorgung wird der oxidative Stress in den Zellen begünstigt. Hierbei kann es zu einer vermehrten Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*), die eine Gewebeschädigung weiter verstärken können, kommen. Wasserstoffperoxid H₂O₂, das ebenfalls zur reaktiven Sauerstoffspezies gehört, löst im post-ischämischen Zustand eine Veränderung der Endothelzellfunktion aus. Zusammengefasst kommt es zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1), einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten an das Endothel sowie einer erhöhten Produktion an Mediatoren (PFA, plättchenaktivierender Faktor), die eine Entzündung weiter begünstigen. Durch die stetige Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten mittels ROS und Zytokinen nimmt die Permeabilität ab und die Schädigung des Gewebes bzw. der Organe bis hin zur Nekrose zu.²⁰⁴⁻²⁰⁶

3.6 IVM

3.6.1 Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)

Die Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie (**Abbildung 15**) ermöglicht eine quantitative, wie auch qualitative Analyse von zellbiologischen Prozessen am lebenden Organismus.

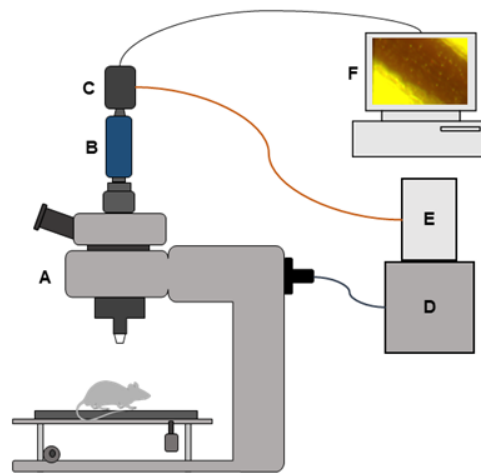


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines Intravitalmikroskops. (A) Mikroskop für physiologische Experimente (IVM). (B) Emissionssplitting-System. (C) Kamera. (D) Beleuchtungssystem. (E) Realtime-Controller. (F) Computer mit Bildgebungssoftware.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie (A) wird die Eigenschaft von fluoreszierenden Stoffen (Fluorochromen) genutzt. Dabei wird Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und mit einer veränderten Wellenlänge abgegeben (**Abbildung 16**, Jablonski-Diagramm).

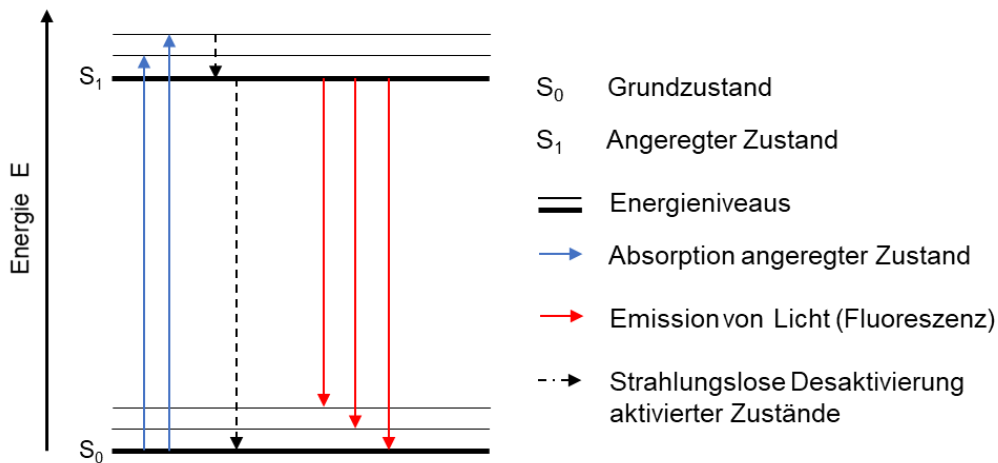


Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms der Fluoreszenz.

Von einer Lichtquelle (**D**) trifft der Lichtstrahl auf einen Anregungsfilter, der die gewünschte Anregungswellenlänge herausfiltert. Der Strahl trifft auf einen dichroitischen Spiegel. Das kurzwellige Anregungslicht wird am Spiegel reflektiert und trifft durch das Objektiv (konzentriert den Strahl) auf das Gewebe oder den lebenden Organismus. Die im Gewebe bzw. lebenden Organismus befindlichen/injizierten Fluoreszenzfarbstoffe (Moleküle) werden nun angeregt und gehen in den energetisch höheren Zustand über (Übergang von S_0 nach S_1 , **Abbildung 16**). Da allerdings der energetisch niedrige Zustand bevorzugt wird, gelangt das Molekül unter der Emission eines Photons in den Grundzustand zurück ($S_1 \rightarrow S_0$). Das Emissionslicht (längere Wellenlänge) wird im Objektiv gesammelt, auf den Spiegel gelenkt und weitergeleitet. Durch den Einsatz eines Filters (**B**) kann das noch verbleibende Anregungslicht aus dem Strahl entfernt werden. Das Emissionslicht trifft anschließend auf den Detektor (Kamera, **C**). Die mit Fluoreszenzfarbstoff behandelte Probe erscheint in den entsprechenden Emissionsfarben auf dem Computer und kann mit der Bildgebungssoftware analysiert werden.

3.6.2 IVM-Fluoreszenzfarbstoffe

3.6.2.1 Acridinorange

N,N,N',N'-Tetramethylacridin-3,6-diaminhydrochlorid (Acridinorange) ist ein Zellmembran durchlässiger Fluoreszenzfarbstoff und ein DNA-Interkalator mit metachromatischen Eigenschaften.

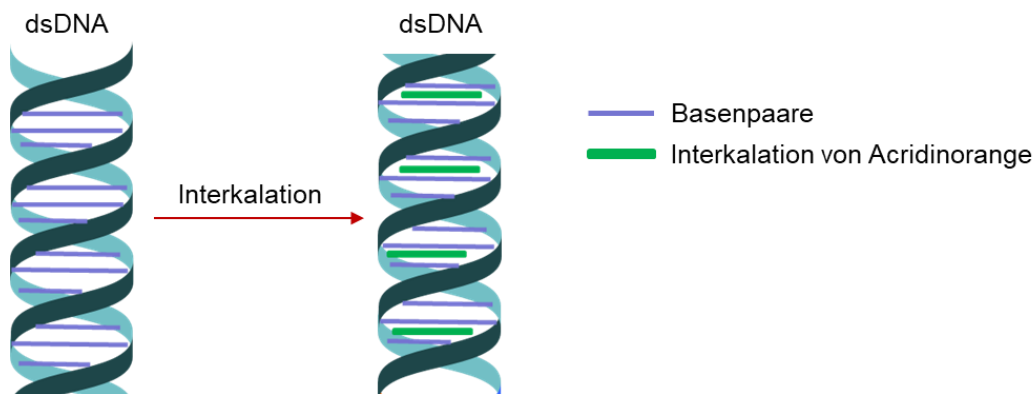


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Interkalation von Acridinorange (grüne Balken) zwischen den Basenpaaren der Doppelsträngigen-DNA.

Acridinorange bildet mit ZnCl_2 ein wasserlösliches Doppelsalz, das grün fluoresziert. Durch die Bindung des kationischen Acridinorange mit der polyanionischen DNA werden die spektralen Eigenschaften von Acridinorange geändert. Je nach Bindungstyp resultieren unterschiedliche Fluoreszenzfarben (metachromatisches Verhalten). Lagert sich Acridinorange an doppelsträngiger DNA (dsDNA) an (**Abbildung 17**), so tritt grüne Fluoreszenz auf (Anregung 470nm, Emission 526 nm). Bei einer Bindung von Acridinorange mit RNA bzw. einzelsträngiger DNA (ssDNA) entsteht rote Fluoreszenz (Anregung 470 nm, Emission 650 nm).^{207, 208}

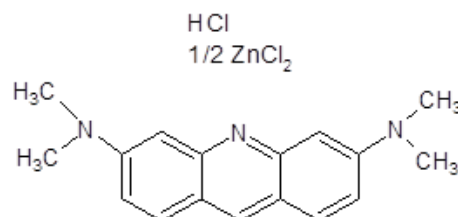


Abbildung 18: Strukturformel von Acridinorange (Zinkchlorid Doppelsalz).

In der Forschung wird Acridinorange als Vitalfarbstoff zum Nachweis lebender Zellen eingesetzt und kann in *in vivo* Untersuchungen zur Färbung von Leukozyten eingesetzt werden. Für die Intravitalmikroskopie werden 50 µL 0,05% Acridinorange (in 0,9% NaCl, isotonisches NaCl verdünnt) intravenös appliziert.

3.6.2.2 SYTOX Orange

SYTOX Orange ist ein Fluorophor und DNA-Interkalator. SYTOX Orange kann nicht die Membran von lebenden Zellen passieren und färbt somit nur die Nukleinsäure von nicht intakten Zellen.^{209, 210} Durch die Bindung von SYTOX Orange mit DNA entsteht rote Fluoreszenz (Anregung 547 nm, Emission 570 nm). In der Forschung wird SYTOX Orange hauptsächlich als Indikator für den Zelltod verwendet. Durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoff kann in *in vivo* Versuchen extrazelluläre DNA (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) gefärbt und quantifiziert werden. Für die Intravitalmikroskopie werden 50 µL einer 5 µM SYTOX Orange Lösung (in 0,9% NaCl, isotonisches NaCl verdünnt) intravenös appliziert.

3.7 Zielsetzung

Der akute Mesenterialinfarkt ist ein lebensbedrohlicher Gesundheitszustand mit einer hohen Letalität (ca. 80%) und Mortalität (ca. 50%).²¹¹ Um den Einfluss der intestinalen Mikrobiota im Mesenterialinfarkt näher zu untersuchen und zu verstehen, wird das mesenteriale Ischämie-Reperfusionmodell angewendet. Dieses Modell ermöglicht eine Echtzeit-Aufnahme des Zellverhaltens vor und nach der Ischämie. Im Rahmen der Doktorarbeit wird dieses Versuchsmodell im keimfreien und gnotobiotischen Mausmodell eingesetzt. Dies ermöglicht die Untersuchung und Bewertung einer Mikrobiota-abhängigen Adhäsion der Leukozyten ans Endothel und einer Mikrobiota-induzierten *in vivo* NETose. Zusätzlich werden in *in vitro* Experimenten aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten mit dem TLR4-Agonist LPS (aus *E. coli* vom Serotyp *E. coli* 0111:B4) stimuliert und das Fluoreszenzsignal der NET-Strukturen mittels einem Fluoreszenz-Lesegerät bestimmt. Auch in diesem Versuchsteil wird durch den Einsatz des keimfreien und gnotobiotischen Mausmodells der Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die *in vitro* NETose untersucht. Neben den bereits genannten Mausmodellen (Kolonisierungsmodelle) werden außerdem die Mäuse mit einem Antibiotika-Cocktail (Dezimierung der Darmbakterien), LPS (Induzierung der Endotoxintoleranz) und DSS (Auslösung einer Entzündungsreaktion) behandelt und die Auswirkung der einzelnen Behandlungen in Bezug auf die NET-Bildung betrachtet. Da die LPS-Sensitivität der Zellen durch Aktivierung des TLR4-Signalweges bestimmt wird, soll im *in vitro* und *in vivo* Versuchsmodell die Abhängigkeit der NETose vom TLR4-Signalweg genauer untersucht werden. Hierzu werden in der Arbeit Mäuse eingesetzt, welche defizient für den TLR4-Signalweg sind.

4. Materialien

4.1 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
CO ₂ - Inkubator	INCO 153	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Digitalkamera (IVM)	ORCA-Flash4.0 C13440	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	Becton Dickinson, New Jersey, Vereinigte Staaten
Feinwaage	R 180 D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Infusionswärmer	Astotherm IFT 200	Stihler Electronic, Stuttgart, Deutschland
Inkubationsschüttler	Certomat H	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Intravitalmikroskop	BX51WI	Olympus, Shinjuku, Japan
Isolatoren	Flexible Film Isolator	CBC Ltd., Madison, Vereinigte Staaten
Kühlschrank -20 °C	Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank 4 °C	Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Labor-Bildgebungssystem (real time controller) (IVM)	U-RTC	Olympus, Shinjuku, Japan
Lichtbogen-Beleuchtungssystem (IVM)	MT20	Olympus, Shinjuku, Japan
Lichtmikroskop	Axio Observer	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop	Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Emissionssplitting-System	DV2-CUBE, T56I5pxr	Photometrics, Arizona, Vereinigte Staaten
Mikroplatten-Lesegerät	SpectraMax i3	Molecular Devices LLC, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Narkosemittelverdampfer	Vapor 19.3	Dräger, Lübeck, Deutschland

Pipetten	Pipet Lite XPS LTS (1000, 200, 20, 2 µL)	Mettler-Toledo, Ohio, Vereinigte Staaten
Stereomikroskop	M50	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank	Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Temperatur-Kontrollmodul	TKM-0904	FMI, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Jugendheim, Deutschland
Tischnarkosegerät	Univet Porta	Groppler, Deggendorf, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, Verinigte Staaten
Waage	1502	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage	EMB 500-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wärmeplatte	TKM-0904	FMI, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Jugendheim, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 16R	Heraeus, Hanau, Deutschland

4.2 Software

Tabelle 6: Verwendete Software.

Software	Hersteller
AxioVision 4.8	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BD FACSDiva™	Becton Dickinson, New Jersey, Vereinigte Staaten
cellSense	Olympus, Shinjuku, Japan
eXcellence RT	Olympus, Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
FlowJo v10	FlowJo LLC, Tree Star Inc., Oregon, Vereinigte Staaten

GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software Inc, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Microsoft Office 2010	Microsoft, Washington, Vereinigte Staaten
SoftMax® Pro 6	Molecular Devices LLC, Kalifornien, Vereinigte Staaten

4.3 Verbrauchsmaterialien

Table 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chamberslides, Glas, Lab-Tek II	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Dreiwegehahn	BD, New Jersey, Vereinigte Staaten
Eppendorf tubes (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt, Sarstedt, Niedersachsen
FACS-Röhrchen	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Kanülen 20G x 1½"	BD, New Jersey, Vereinigte Staaten
Kanülen 26G x ½"	BD, New Jersey, Vereinigte Staaten
Mikrotiterplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Mikrotiterplatte, V-Form	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Nahtmaterial 7/0 USP, 0.5 metric	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Nahtmaterial, Prolene (Polypropylen), 7-0 Stärke	Ethicon (Johnson & Johnson), New Jersey, Vereinigte Staaten
Pasterupipetten, Glas	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Petrischalen	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Pipettenspitzen (0,1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Polyethylen-Schlauch (0,28 mm) Katheter	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Deutschland
PP Röhrchen (15 mL und 50 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Serologische Pipetten (5 mL und 10 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Spritzen (1 mL und 2 mL)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzen (10 mL und 20 mL)	BD, New Jersey, Vereinigte Staaten
Sugi Saugtupfer	Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland
Zellsiebe 70 µm	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten

4.4 Instrumente

Tabelle 8: Verwendete Instrumente.

Instrument	Modell	Hersteller
Applikator für Mikroserrrefine-Klemme	18057-14	FST, Heidelberg, Deutschland
Arterienklemme	15.45.12	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
Federschere	05.12.20	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
Irisschere	02.20.10	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
Mikroserrrefine-Klemme (2 mm)	18055-02	FST, Heidelberg, Deutschland
Pinzetten	07.61.25 07.61.05	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
Schlundsonde	18060-20	FST, Heidelberg, Deutschland

4.5 Anästhesie

Tabelle 9: Verwendete Anästhesie.

Anästhesie	Konzentration	Hersteller
Medetomidin (Dorbene vet)	0,05 mg/kg	Zoetis, Berlin, Deutschland
Fentanyl	0,05 mg/kg	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Midazolam	5,0 mg/kg	Hameln pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland

4.6 Antibiotika

Tabelle 10: Verwendete Antibiotika.

Antibiotika	Konzentration	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	1 g/L	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Medronidazol	1 g/L	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
Neomycinsulfat	1 g/L	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
Vancomycin	0,5 g/L	Hikma, London, Vereinigtes Königreich

4.7 Chemikalien

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
1 x RBC Lyse-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Acridinorange	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
BSA	Eurobio Scientific, Les Ulis, Frankreich
DAPI	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I (50 U/mL)	Qiagen, Hilden, Deutschland
FCS (hitzeinaktiviert)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin 86% (Gew.-%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES 1M	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Verinigte Staaten
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
Histopaque 1119	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
Kaliumchlorid KCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB Medium	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
NaCl 0,9%, Infusionslösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Schaedler Agar	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten
SYTOX Green	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
SYTOX Orange	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Triton-X 100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultrapure LPS, <i>E. coli</i> 0111:B4	Invivogen, Kalifornien, Vereinigte Staaten

4.8 Kits

Tabelle 12: Verwendete Kits.

Kits	Hersteller
Neutrophil Isolation Kit (mouse)	Miltenyi, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Mouse Lipopolysaccharides (LPS) ELISA kit	Cusabio, Texas, Vereinigte Staaten

4.9 Puffer

Tabelle 13: Verwendete Pufferlösungen.

Puffer	Zusammensetzung
HBSS	8 g/L NaCl 0,4 g/L KCl 0,06 g/L KH ₂ PO ₄ 1,0 g/L Glucose 0,048 g/L Na ₂ HPO ₄ 0,35 g/L NaHCO ₃ mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen und autoklavieren. Anschließend werden 25 mM HEPES und 10% FCS hinzugefügt.
MACS-Puffer	500 mL PBS, pH 7,2 0,5% BSA 2 mM EDTA

4.10 Antikörper

4.10.1 Immunfluoreszenz

Tabelle 14: Verwendete Immunfluoreszenzantikörper.

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Anti-Histone H3 (citrulline R2+R8+R17)	4 µg/mL	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Alexa Fluor 555 Esel Anti-Kaninchen IgG	4 µg/mL	Life Technologies GmbH, Kalifornien, Vereinigte Staaten

4.10.2 FACS

Tabelle 15: *Verwendeter APC Antikörper Cocktail.*

APC Antikörper Cocktail	Konzentration	Hersteller
APC anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) Klon D7	2,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC anti-mouse CD117 (c-Kit) Klon 2B8	1 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC anti-mouse NK-1.1 Klon PK136	2 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC anti-mouse TER-119/ Erythroid Cells Klon TER-119	1 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC anti-mouse CD3ε Klon 145-2C11	1 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC anti-mouse CD19 Klon 6D5	2 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC/Cy7 anti-mouse Ly-6G Klon 1A8	1 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PE/Cy7 anti-mouse/human CD 11b Klon M1/70	0,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Brilliant Violet 510™ anti-mouse Ly-6C Klon HK1.4	2 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Tabelle 16: *Verwendete Antikörper für Isotypen-Kontrollen.*

Antikörper (Isotypen- Kontrolle)	Konzentration	Hersteller
FITC Rat IgG2a, κ Klon RTK2758	2,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PE Rat IgG2a, κ Klon RTK2758	2,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PerCP/Cy5.5 Rat IgG2b, κ Klon RTK4530	5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC/Cy7 Rat IgG2a, κ Klon RTK2758	1,2 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PE/Cy7 Rat IgG2b, κ Klon RTK4530	0,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Table 17: *Verwendete Antikörper für Zielproteine.*

Antikörper (Zielproteine)	Konzentration	Hersteller
PE anti-mouse CD284 (TLR4) Klon SA15-21	2,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
FITC anti-mouse CD62L Klon MEL-14	2,5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PerCp/Cy5-5 anti-mouse CD184 (CXCR4) Klon L276F12	5 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Table 18: *Verwendeter Antikörper zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen.*

Antikörper	Konzentration	Hersteller
TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32)	10 µg/mL	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Table 19: *Verwendete Antikörper für das Single Staining.*

Antikörper (Single Staining)	Verdünnung	Hersteller
Brilliant Violet 510™ anti-mouse Ly-6C Klon HK1.4	1:100	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PE/Cy7 anti-mouse/human CD 11b Klon M1/70	1:400	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC/Cy7 anti-mouse Ly-6G Klon 1A8	1:50	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
APC anti-mouse CD19 Klon 6D5	1:100	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PerCp/Cy5-5 anti-mouse CD184 (CXCR4) Klon L276F12	1:40	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PE anti-mouse CD284 (TLR4) Klon SA15-21	1:400	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
FITC anti-mouse CD62L Klon MEL-14	1:400	Biolegend, Kalifornien, Vereinigte Staaten
DAPI	1:1000	Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten



5. Mauslinien

5.1 C57BL/6J

C57BL/6J Mäuse gehören zu den am häufigsten genutzten Inzuchtstämmen in der Wissenschaft und wurden in vielen verschiedenen Forschungsbereichen genutzt (Kardiovaskuläre Erkrankungen, Immunologie, etc). Außerdem wurden C57BL/6J Mäuse als genetischer Hintergrund für das Züchten von neuen transgenen (genetisch verändert) Mauslinien eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden C57BL/6J Mäuse eingesetzt, die unter SPF (spezifisch Pathogen-frei) und keimfreien Bedingung (Haltung im Isolator) gehalten wurden. Keimfreie C57BL/6J Mäuse wurden von [REDACTED] (Wallenberg Laboratorium der Universität Göteborg, Schweden) am 08.05.2012 an [REDACTED] abgegeben. C57BL/6J Tiere unter SPF Bedingungen wurden in dieser Arbeit mit CONV-R WT abgekürzt, während Tiere aus der keimfreien Haltung als GF WT bezeichnet wurden.²¹³

5.2 Swiss Webster

Wie die C57BL/6J Mäuse, wurden auch die Swiss Webster Mäuse sehr häufig zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt. Auch dieser Mausstamm wurde als genetischer Hintergrund für das Züchten von neuen transgenen Mauslinien verwendet. Der Ursprung der Linie stammte vom Rockefeller Institut. Über Rockland Farms Inc. wurden 1940 Swiss Webster Auszucht-Tiere an die Firma Taconic abgegeben. Über Taconic können Swiss Webster Mäuse aus der SPF- wie auch aus einer keimfreien Isolator-Haltung erworben werden.²¹⁴ Im Rahmen der Arbeit wurden konventionell aufgewachsene (SPF) und keimfreie Swiss Webster Mäuse eingesetzt.

5.3 *Pad4*^{-/-}

Die Peptidylarginin-Deiminase, Typ IV (PAD4), ist ein Enzym, das vor allem in neutrophilen Granulozyten vorkommt und eine wichtige Rolle in der NET-Bildung spielt. In *Pad4*-defizienten Mäusen fehlen die Exons 9 und 10, die ein Teil des aktiven

Zentrums der Peptidylarginin-Deiminase sind. Das Fehlen der Exons 9 und 10 reichte bereits aus, um die Deiminierung der Histone H3 und H4 zu verhindern und die Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* zu unterbinden.²¹⁵ *Pad4*-defiziente Mäuse wurden von [REDACTED] (Centrum für Thrombose und Hämostase CTH, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Für die Durchführung der Experimente wurden Tiere aus der SPF-Haltung eingesetzt.

5.4 *Tlr4*^{-/-}

Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) kann mit MD2 (myeloid differentiation factor 2) das Lipopolysaccharid (LPS, Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien) erkennen. Hierbei bildet sich ein TLR4-MD2-LPS Komplex, der zur Bildung eines TLR4-Homodimers führt. In *Tlr4*-defizienten Tieren wurde die *Tlr4* Gensequenz, die für Kodierung der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne zuständig ist, durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt, wodurch es zu einer Blockierung der TLR4-Stimulierung durch LPS kam.²¹⁶ Als Kontrolle wurde die C57BL/6J Maus eingesetzt. Alle verwendeten *Tlr4*^{-/-} Tiere stammen aus der SPF-Haltung.

5.5 *Myd88*^{-/-}

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) gehört zur Gruppe der Toll-Interleukin-Rezeptor (TIR-domain) enthaltenden Adaptermoleküle und ist ein essenzieller Signalweg des TLR4-Rezeptors. In diesem Mausstamm wurde das *Myd88* Gen inaktiviert (beide Exons des Gens, C-terminale Region des *Myd88* Gens, wurden durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt) und es somit zur Blockierung des zellulären Signalwegs kam.²¹⁷ Als Kontrolle wurde die C57BL/6J Maus eingesetzt. Alle verwendeten Tiere stammen aus der SPF-Haltung.

5.6 *Trif*^{-/-}

Wie MyD88, gehört auch TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β) zur Gruppe der Toll-Interleukin-Rezeptor (TIR-domain) enthaltenden Adaptermoleküle und ist außerdem auch ein wichtiger Signalweg des TLR4-Rezeptors. Durch die Mutagenese mittels N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) kam es zu einer Punktmutation (einer Deletion bzw. Verlust eines Basenpaares) und somit zu einer Mutation von *Trif*. Homozygote Träger (zwei gleiche Allele) wiesen eine Resistenz gegenüber den Effekten von LPS auf.²¹⁸ Als Kontrolle wurde der genetische Hintergrund C57BL/6J eingesetzt. Alle verwendeten Tiere stammen aus der SPF-Haltung.

5.7 *Myd88*^{-/-} x *Trif*^{-/-}

Die Generierung der doppel-knockout Linie erfolgte durch die Verpaarung von *Myd88*- und *Trif*-defizienten Mäusen. Dadurch ergab sich ein Stamm, der sowohl eine Defizienz der TRIF-abhängigen als auch eine Blockade der MyD88-abhängigen TLR-Signalwege aufweist. Zur Kontrolle des Genotyps wurde eine entsprechende Genotypisierung der einzelnen Mausstämme durchgeführt. Der genetische Hintergrund basierte auf der C57BL/6J Maus. Alle doppel-knockout Tiere stammen aus der SPF-Haltung.

5.8 *Vwf*^{-/-}

Der von-Willebrand Faktor (VWF) ist ein multimeres Glykoprotein und wird in Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet.²²² Außerdem ist der VWF ein wichtiger Bestandteil der primären Hämostase. In *Vwf*-defizienten Tieren wurden die beiden Exons 4 und 5 des *Vwf* Gens durch eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Dies führte zu einer vollständigen Deletion von VWF. Mäuse, die *Vwf*-defizient sind, wiesen einen Defekt in der Hämostase (verlängerte Blutstillung) sowie der experimentellen Thrombusbildung auf.²²³ Als Kontrolltiere wurden Geschwister mit

Wildtyp-Allelen aus Zuchten mit heterozygoten Eltern verwendet. Der Knockout-Stamm, wie auch die Kontrolltiere stammen aus der SPF-Haltung.

5.10 TLR4^{fl/fl} x VE-Cadherin-Cre⁺

Bei der Mauslinie TLR4^{fl/fl} x VE-Cadherin-Cre⁺ handelte es sich um eine Endothel-spezifische Toll-like Rezeptor 4-defiziente Mauslinie.²²⁴ Zur Generierung des Stamms wurden gefloxt (loxP-flankierte Genabschnitte) TLR4 Mäuse mit Endothel-spezifischen VE-Cadherin (Vaskulär-endotheliales Cadherin)-Cre Mäusen gekreuzt. Durch die Cre-Rekombinase kam es zur Deletion des flankierten Gens bzw. zur Deletion von TLR4 im Endothel.²²⁴⁻²²⁶ Kontrolltiere erhielten die Bezeichnung TLR4^{wt/wt} x VE-Cadherin-Cre⁺. Die verwendeten Tiere stammen alle aus der SPF-Haltung.

5.8 Altered Schaedler Flora (ASF)

Die über die Firma Taconic bezogene Altered Schaedler Flora setzte sich aus den folgenden acht Mikroorganismen zusammen: ASF 356 (*Clostridium* sp.), ASF 360 (*Lactobacillus intestinalis*), ASF 361 (*Lactobacillus murinus*), ASF 457 (*Mucispirillum schaedleri*), ASF 492 (*Eubacterium plexicaudatum*) ASF 500 (*Pseudoflavinifactor* sp.), ASF 502 (*Clostridium* sp.) und ASF 519 (*Parabacteroides goldsteinii*).²¹⁹⁻²²¹ Zur Generierung der Maus-Linie wurde die Altered Schaedler Flora von kommerziell erhältlichen C3H/HeNTac Mäusen isoliert und in keimfreie C57BL/6J Mäuse transferiert.²²¹ Alle eingesetzten Tiere stammen aus der Isolator-Haltung der Arbeitsgruppe (Gnotobiotik). Die Haltung unter keimfreien Bedingungen diente dem Schutz und somit auch der Vermeidung von Kontaminationen der ASF Tiere mit anderen Mikroorganismen

6. Methoden

6.1. Behandlungen und (Mono-) Kolonisierungen

6.1.1 Antibiotika Behandlung

Zur Depletion von Darmbakterien wurde Trinkwasser mit einem Cocktail aus Breitspektrumantibiotika versetzt. Konventionell aufgezogene C57BL/6J Mäuse wurden mit einem Antibiotika-Cocktail, bestehend aus 1 g/L Ampicillin, 1 g/L Neomycin, 0,5 g/L Vancomycin und 1 g/L Metronidazol, behandelt. Die Behandlung erfolgte für 14 Tage über das Trinkwasser.²²⁸ In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von Antibiotika auf ein bakterielles Minimalkonsortium (ASF) untersucht. Hierzu erhielten mit Altered Schaedler Flora (ASF)-kolonisierte Mäuse die Breitspektrumantibiotika Ampicillin (1 g/L) und Neomycin (1 g/L). Die Antibiotikagabe erfolgte hier für 7 Tage über das Trinkwasser. In beiden Experimenten wurde das Antibiotika-angereicherte Trinkwasser alle 2 Tage frisch angesetzt und gewechselt.

6.1.2 LPS Behandlung

Zur Untersuchung der Wirkung einer metabolischen Endotoxämie auf die Reaktivität von neutrophilen Granulozyten, insbesondere der Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), wurden Mäuse mit 100 µg/mL Lipopolysaccharid (LPS), behandelt. Das in der Arbeit eingesetzte LPS besteht aus der glatten (S)-Form (beinhaltet die Komponenten O-Antigen, Core-Polysaccharid und Lipid A) des gram-negativen Bakteriums *E. coli* 0111:B4.¹⁸⁴ *E. coli* 0111:B4 ist ein spezifisch-pathogener Serotyp, der Diarröh auslösen kann.²²⁷ Die Behandlung erfolgte für 7 Tage über das Trinkwasser.^{228, 229}

6.1.3 DSS Behandlung

Zur Untersuchung der Effekte einer intestinalen Entzündung auf die Bildungen von NETs wurden keimfreie und konventionell aufgewachsene Tiere mit 3,5 %

Dextransulfat Natriumsalz (DSS) über das Trinkwasser behandelt.²²⁸ Die DSS-Gabe erfolgte für 5 Tage.

6.1.4 Kolonisierung mit zökalem Inhalt

Um festzustellen, inwiefern eine Kolonisierung von keimfreien Mäusen sich auf die Bildung von NETs auswirkt, wurden keimfreie Mäuse mit einer komplexen Mikrobiota besiedelt. Hierzu wurde das Zökum einer konventionell aufgewachsenen Maus (CONV-R) entnommen und der komplette Inhalt in 3 mL PBS gelöst. Mit einer Schlundsonde wurden 200 µL des gelösten zökalen Inhalts in den Magen einer keimfreien Maus appliziert. Für die Kolonierungsversuche mit einer komplexen Mikrobiota wurden keimfreie C57BL/6J und keimfreie Swiss Webster Mäuse verwendet. Die Besiedelung des Darms erfolgte für 14 Tage. Im Zuge dieses Experiments wurden diese Tiere als CONV-D (conventionally derived) bezeichnet.

6.1.5 Monokolonisierung mit *Escherichia coli* JP 313

Zur Untersuchung der Wirkung gram-negativer Bakterien auf das Verhalten von Leukozyten und der NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell, wurden keimfreie C57BL/6J Mäuse mit dem Bakterienstamm *Escherichia coli* JP313 monokolonisiert (bezogen von [REDACTED], Institut Pasteur, Paris, Frankreich).²³⁰ Zur Herstellung einer *E. coli* JP 313 Glycerol Lösung wurde die von [REDACTED] bezogene *E. coli* JP313 Lösung auf LB Agar (Schaedler Agar Pulver) Platten ausplattiert und die Bakterien über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Anschließend wurde eine einzelne Kolonie in sterilem LB Medium bei 37 °C kultiviert. Bei einer gemessenen O.D._{600nm} von ~0,8-1,0 wurde die Bakteriensuspension mit Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und schockgefroren. Im nächsten Schritt wurden die gefrorenen *E. coli* Bakterien mit einer sterilen Impföse in 50 mL LB Medium transferiert und im Schüttelinkubator (250 rpm) bei 37 °C über Nacht kultiviert. 200 µL der Impfkultur wurden in 50 mL frisches LB Medium (OD_{600nm} ~0,05) überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) kultiviert. Für die Monokolonisierung wurden je 200 µL der *E. coli*-Bakteriensuspension (OD_{600nm} = 0,6) pro Tier per Schlundsonde appliziert. Die kolonisierten Mäuse wurden bis zum finalen Versuch und dem

Sicherstellen der Besiedelung, für 14 Tage im Isolator gehalten. Die Herstellung und Kultivierung der Bakteriensuspension wurde von [REDACTED] durchgeführt.

6.1.6 Monokolonisierung mit *Bacillus subtilis* PY79

Für die Monokolonisierung wurde *Bacillus subtilis* PY79, eine prototrophe Variante, kultiviert aus dem *Bacillus subtilis* Wildtyp Stamm 168 (bezogen von [REDACTED], Neapel, Italien), verwendet.²³¹ *B. subtilis* ist ein sporenbildendes anaerobes gram-positives Bakterium der kommensalen Darmflora.²³² *B. subtilis* wurde bei 37°C im LB-Medium, bestehend aus 5 g/L Trypton, 10 g/L NaCl und 5 g/L Hefe, kultiviert. Das Sporenwachstum wurde durch die Gabe von DSM (Difco Sporulation Medium) initiiert. Die Sporenbildung und Wachstum erfolgte nach der Erschöpfungsmethode. Diese Methode führte zu einer höheren Zelldichte während der Sporenbildung und zu robusten Sporen mit einer dicken Sporenhülle.²³³ Für die Monokolonisierung wurden pro keimfreier Maus 1.33×10^8 *B. subtilis* Sporen in 200 µL sterilem PBS gelöst und über eine Schlundsonde appliziert. Kolonisierte Tiere wurden bis zum finalen Versuch und dem Sicherstellen der Besiedelung, für 14 Tage im Isolator gehalten. Die Bakteriensuspension wurde von [REDACTED] angesetzt.

6.2 Isolierung von murinen neutrophilen Granulozyten aus Knochenmark und Blut

6.2.1 Isopyknische Zentrifugation (Dichtegradienten-Zentrifugation)

Zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) aus dem Knochenmark wurden *Femur* (Oberschenkelknochen), *Tibia* (Schienbein) und Hüftbein (*Os coxae*) entnommen. Die Haut sowie das Muskelfleisch wurden von allen gesammelten Knochen gelöst. Die Knochenenden wurden abgeschnitten und das Knochenmark mit einer 26G x ½“ Kanüle und 10 mL Waschpuffer (HBSS mit 25 mM HEPES und 10% FCS) aus *Femur*, *Tibia* und Hüftbein gespült. Zum Entfernen von Knochenreste wurde die Zellsuspension mittels Zellsieb (Porengröße von 70 µm) gefiltert. Im Anschluss wurde die gefilterte Zellsuspension bei Raumtemperatur (RT) für 30 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL einer HBSS

Lösung, versetzt mit HEPES, resuspendiert. Für die Isolierung der Neutrophile wurde ein Histopaque-Gradient vorbereitet. Hierbei wurden in ein 15 mL Falcon-Röhrchen 4 mL Histopaque 1077 gefüllt und mit 4 mL Histopaque 1119 unterschichtet. Im Anschluss wurde die 1 mL Zellsuspension vorsichtig auf den Histopaque-Gradienten pipettiert und für 30 min. bei RT und 700 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Die isolierten Neutrophilen sind als Grenzsicht zwischen den beiden Histopaque-Phasen (weißer Ring) zu finden und wurden vorsichtig für weitere Arbeitsschritte abgenommen. Die Neutrophilensuspension wurde mit 20 mL Waschpuffer versetzt und bei RT für 10 min und 300 x g zentrifugiert. 15 mL vom Waschpuffer wurden abgenommen und das Pellet mit 12,5 mL Waschpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei RT für 10 min und 300 x g zentrifugiert. Im letzten Waschschrift wurde der komplette Überstand abgenommen und das Pellet erneut mit 20 ml Waschpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde final für 10 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Die gewaschenen neutrophile Granulozyten wurden für weitere Experimente in 1 mL RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot) gelöst.^{234, 235}

6.2.2 Lyse der Erythrozyten

Zur Vorbereitung der Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut wurde vorab eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Zur Gewinnung des Vollbluts wurden die Mäuse durch Inhalation von 5,0 Vol.% Isofluran und der Injektion von 0,05 mg/kg Fentanyl betäubt. Während der Durchführung der Herzpunktion inhalierte das Spendertier durchgehend 1,8-2 Vol.% Isofluran (bei einer O₂-Trägergas-Flussrate von 1L/min). Das Herz wurde punktiert (zwischen der ersten und zweiten Rippe) und das gesammelte Blut mit EDTA versetzt.²³⁶ 1 mL gesammeltes Vollblut wurde mit 10 mL 1x RBC Lyse-Puffer versetzt und für 5 min (gelegentlich schütteln) auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von 30 mL 1xPBS gestoppt. Das Blut wurde bei 400 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet für weitere Schritte in PBS gelöst.

6.2.3 Magnetic Activated Cell Separation (MACS)

Zur Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus Blut und Knochenmark, sowie zur Kontrolle der Dichtegradienten-Zentrifugation, wurde die Methode der Magnetisch-aktivierten Zell Separation angewendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll des MACS Isolations-Kit durchgeführt. Für das magnetische Markieren wurde gesammeltes Knochenmark bzw. Blut bei 4°C und 300 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µL MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 50 µL eines Neutrophil Biotin-Antikörper Cocktails (Cocktail von Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen Antigene die nicht auf neutrophilen Granulozyten (positive Selektion), wie Lymphozyten, Erythrozyten oder Monozyten, exprimiert werden) dazugegeben, vermischt und für 10 min bei 2 bis 8°C (im Kühlschrank) inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 300 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 400 µL MACS-Puffer resuspendiert und mit 100 µL Anti-Biotin MicroBeads (Monoklonale Anti-Biotin Antikörper konjugierte MicroBeads) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min (im Kühlschrank) wurden die Zellen erneut mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Vor der magnetischen Zellseparation wurde das Pellet in 500 µL MACS-Puffer gelöst. Für die anschließende magnetische Zelltrennung der neutrophilen Granulozyten von den restlichen markierten Zellen, wurde eine MACS-Säule (wurde an einen magnetischen MACS-Separator angebracht) mit 3 mL MACS-Puffer (**Tabelle 13**) gespült. Die Zellsuspension wurde auf die MACS-Säule aufgetragen und der Durchfluss, welcher die nicht markierten Neutrophilen enthält, gesammelt. Im letzten Schritt wurde die MACS-Säule 3-mal mit je 3 mL MACS-Puffer gewaschen und die über den magnetischen MACS-Separator eluierten neutrophilen Granulozyten aufgefangen.

6.3 *In vitro* Stimulierung und Quantifizierung der LPS-induzierten NETose

6.3.1 *In vitro* LPS Stimulierung

Zur Untersuchung der Endotoxin-Wirkung (Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien, die von lysierten oder abgetöteten Bakterien freigesetzt wird) auf die Bildung von NETs wurden die unter Abschnitt 6.2 isolierten neutrophilen Granulozyten mit einem hexaacyliertem Lipopolysaccharid (LPS, **Abbildung 19**) stimuliert. Für die folgenden Experimente wurde gereinigtes LPS (Ultrapure, Firma Invivogen) vom pathogenen *E. coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4 verwendet.

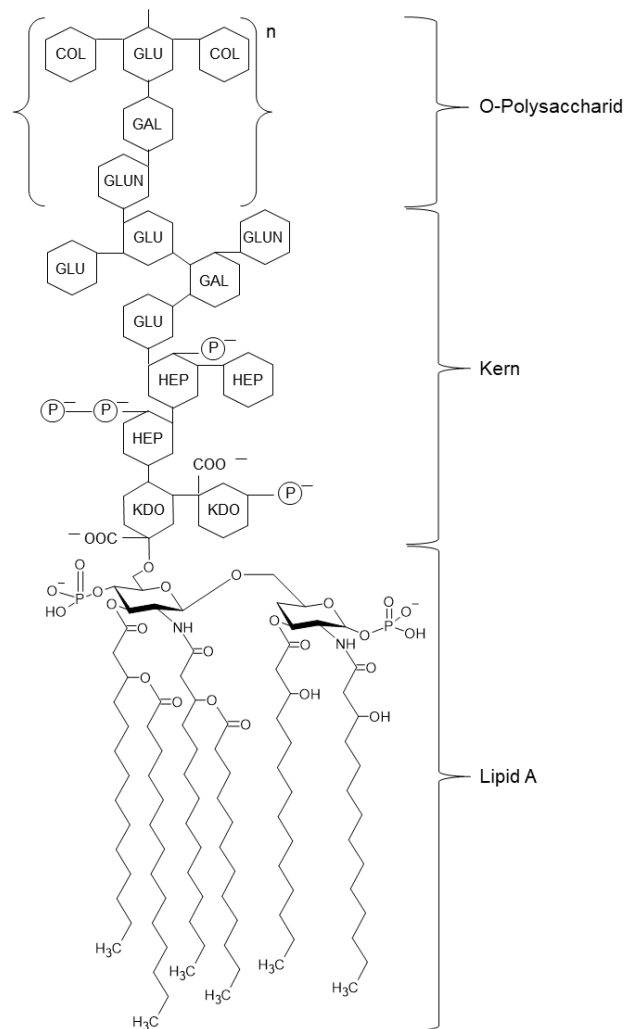


Abbildung 19: Struktur des LPS vom pathogenen Serotyp *E. coli* 0111:B4 nach Adam et al.²³⁷ Die LPS-Struktur setzt sich aus dem Lipid A, dem Kern und dem O-Polysaccharid zusammen. KDO 2-Keto-3-desoxy-octanate, HEP L-Glycero-D-manno-heptopyranose, GLU Glucose, GAL Galactose, GLUN Glucosamin, COL Colitose.

Hierzu wurden je 200 μL bzw. 3×10^5 Zellen pro Kavität in eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert und mit 10 ng/mL LPS stimuliert. Zur Aktivierung der Neutrophilen wurde die Platte für 5 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Kontrolle der NET-Bildung bzw. der Spezifikation des NET-Signals, wurde eine Stunde vor Inkubationsende DNase I (50 U/mL) zu den bereits stimulierten Zellen zugegeben.

6.3.2 Quantifizierung der LPS-induzierten NETose durch Messung der Fluoreszenzintensität

Zur Quantifizierung der NETs wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTOX™ Orange angefärbt. SYTOX™ Orange färbt sowohl die Nukleinsäure innerhalb einer Zelle bei defekter Zellmembran, wie auch extrazelluläre DNA an. Zu den stimulierten Zellen wurden 5 μM SYTOX™ Orange (je 50 μL Fluoreszenzfarbstoff pro Kavität) zugegeben und die Mikrotiterplatte für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit RPMI 1640 Medium (je 50 μL pro Kavität) gewaschen und für 2 min bei 200 x g zentrifugiert. Nach erneutem abnehmen des Überstands wurden die Zellen ein weiteres Mal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und nochmals zentrifugiert (2 min, 200 x g). Das Fluoreszenzsignal (SYTOX™ Orange, Anregungswellenlänge 488 nm und Emissionswellenlänge 532 nm) der gebildeten NETs wurde mit dem SpectraMax i3x Mikrotiterplatten-Lesegerät detektiert.

6.3.3 Quantifizierung der LPS-induzierten NETose mittels Immunfluoreszenz

Als eine weitere Methode zur Quantifizierung und Visualisierung von NETs, können die extrazellulären DNA-Strukturen mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert werden. Für diesen Versuch wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch die citrullinierte Form des Histon H3 (ein Protein des Chromatins) bindet und ein wichtiger Marker der NETs ist. Je 200 μL (3×10^5 Zellen) der Zellsuspension (isolierte Neutrophile Abschnitt 6.2) wurde in eine Kammer eines Kammerobjektträgers pipettiert und mit 10 ng/mL LPS stimuliert. Zur Aktivierung der neutrophilen

Granulozyten wurde der Kammerobjektträger für 5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden die stimulierten Zellen einmal mit 300 µL PBS gewaschen. Für eine bessere Permeabilität der Zellen, wurden diese mit 0,1% Triton-X 100 für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Neutrophilensuspension 3-mal mit 300 µL PBS gewaschen und der Überstand verworfen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die neutrophilen Granulozyten für 2 h mit einer Lösung aus 10% BSA (in PBS gelöst) geblockt. Die Zellen wurden mit dem spezifischen Primärantikörper Anti-Histon H3 (in 5% BSA gelöst; 1:250) über Nacht inkubiert und am nächsten Tag 3-mal mit 300 µL PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit Alexa Fluor 555-gekoppeltem Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper für 2 h (in 5% BSA gelöst; 1:500). In den letzten Arbeitsschritten wurden die stimulierten Zellen 3-mal mit 300 µL PBS gewaschen, für 10 min mit DAPI angefärbt und nochmals mit PBS gewaschen. Zur Fluoreszenzaufnahme der NETs wurde das Lichtmikroskop Axio Observer (Zeiss) verwendet.

6.4 Detektion von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Analyse der Oberflächenproteine TLR4 und L-Selektin auf isolierten neutrophilen Granulozyten wurde die Durchflusszytometrie (FACS) angewendet. Da L-Selektin ein Zelladhäsionsmolekül ist, kann die Expression des L-Selektins eine Aussage über das Adhäsionsverhalten der Zellen in den Venolen der verschiedenen Mauslinien liefern. Die unter Abschnitt 6.2 und 6.3 isolierten Neutrophilen wurden mit der Fc Rezeptor Blocking Lösung TruStain FcX (1:50, **Tabelle 18**) für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 100 µL der geblockten Neutrophilensuspension in eine Mikrotiterplatte (V-Form) überführt und für 2 min bei 2000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 50 µL PBS (Negativkontrolle), APC Antikörper Cocktail (**Tabelle 15**), Isotypen-Kontrolle (**Tabelle 16**) und Antikörperlösung der Zielproteine (**Tabelle 17**) resuspendiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 20 min im Dunkeln (in Alufolie) und auf Eis inkubiert. Zusätzlich wurden je 50 µL DAPI in die Kavitäten mit dem APC Antikörper Cocktail, der Isotypen-Kontrolle und der Antikörperlösung der Zielproteine pipettiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die

Mikrotiterplatte für 2 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 100 µL PBS gelöst. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die gefärbten Zellsuspensionen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit dem Durchflusszytometer BD FACS Canto II analysiert. Zur Kompensation der Fluorophore wurde eine Milz in PBS fein zerkleinert und für 5 min bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 mL 1 x RBC Lyse-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von 20 mL PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI 1640 Medium gelöst. Zur Entfernung von Gewebestücken wurde die Zellsuspension mittels Zellsieb (Porengröße 70 µm) gefiltert. Je 100 µL der Milz-Zellsuspension wurden in die Kavitäten überführt und für 2 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µL des entsprechenden Fluorophors (**Tabelle 19**) gelöst und für 20 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Zellen 2-mal mit 100 µL PBS gewaschen und bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die resuspendierten Zellsuspensionen wurden in die FACS-Röhrchen überführt und analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Software FloJo v10 und die Analyse über die Statistiksoftware GraphPad Prism 8.

6.5 *In vivo* Mausmodell

6.5.1 Mesenteriale Ischämie-Reperfusion

Ziel der Anwendung des mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodells war es, die Bildung von NETs und der Leukozyten-Endothel Interaktion vor und eine Stunde nach dem Mesenterialinfarkt zu visualisieren und quantifizieren. Die Aufnahmen wurden mittels der Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie angefertigt. Diese Methode ermöglicht eine quantitative, wie auch qualitative Analyse von zellbiologischen Prozessen am lebenden Organismus.

Im Folgenden werden die Arbeitsschritte des *in vivo* Mausmodells näher erläutert.

Narkotisierung: Vor Beginn des operativen Eingriffs wurden die Versuchstiere in Vollnarkose gelegt (finaler Versuch, kein Wiedererwachen). Hierzu wurden vorerst die Mäuse aus ihren Käfigen in eine Plexiglas-Kammer (**Abbildung 20**) überführt. Über einen Stutzen (Anschluss 1) wurden 5,0 Vol.% Isofluran (O_2 -Trägergas-Flussrate 1 L/min) in die Plexiglas-Kammer geleitet und über den zweiten Stutzen (Anschluss 2) abgesaugt bzw. abgeleitet.

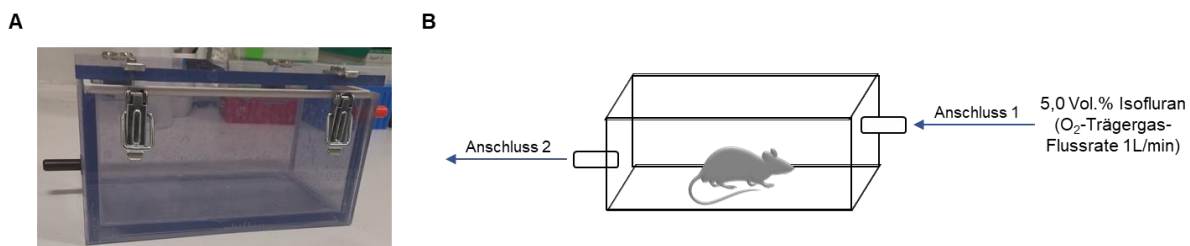


Abbildung 20: **A** Plexiglas-Kammer zur Betäubung von murinen Versuchstieren. **B** Schematische Darstellung der Betäubung eines Versuchstiers in einer Plexiglas-Kammer durch Inhalation von 5,0 Vol.% Isofluran bei einer O_2 -Trägergas-Flussrate von 1 L/min.

Sobald die Tiere keine merkliche Bewegung mehr aufwiesen und ruhig waren, wurde durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion in die Bauchhöhle die Narkose eingeleitet. Die für alle Experimente hier verwendete Narkosemischung setzte sich aus den Komponenten Medetomidin (0,05 mg/kg), Fentanyl (0,05 mg/kg) und Midazolam (5,0 mg/kg) zusammen (**Abbildung 21**). Bei der i.p. Injektion ist zu beachten, dass die mit der Hand fixierten Mäuse in der Rückenlage leicht schräg nach unten (kranial liegt tiefer als kaudal) gehalten werden. So können sich die inneren Organe kranial verschieben und somit kann verhindert werden, dass Organe wie Darm oder Blase punktiert werden.

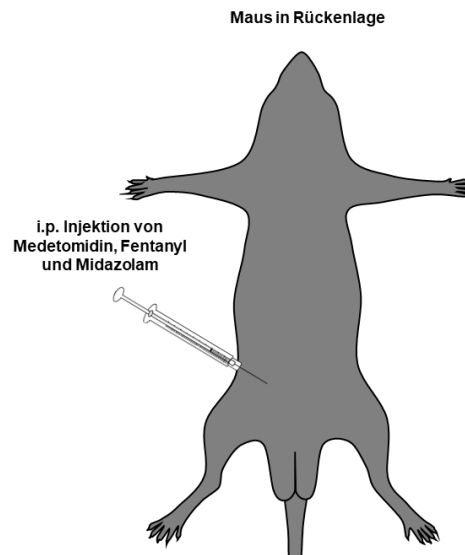


Abbildung 21: Schematische Darstellung der intraperitonealen Injektion in eine Maus.

Wurde eine entsprechende Narkosetiefe erreicht (Mäusen fehlte der Zwischenzehenreflex), können die Versuchstiere in Rückenlage auf eine Wärmeplatte positioniert werden. Zur Überprüfung und Regulierung der Körpertemperatur (zwischen 37°C und 38°C) wurde rektal eine Thermometersonde eingeführt. Während des Eingriffs wurden die Tiere die ganze Zeit über mit ausreichend Sauerstoff versorgt. Die Sauerstoffzufuhr erfolgte durch eine Gesichtsmaske mit Stützen für die Zuluft und Abluft. Hierbei wurden Nase und Mund des Versuchstieres in eine zylindrische Öffnung gelegt (**Abbildung 22**). Die Sauerstoff-Versorgung belief sich auf eine Flussrate von 1 bis 1,5 L/min und wurde bis zum Ende des Experiments beibehalten.

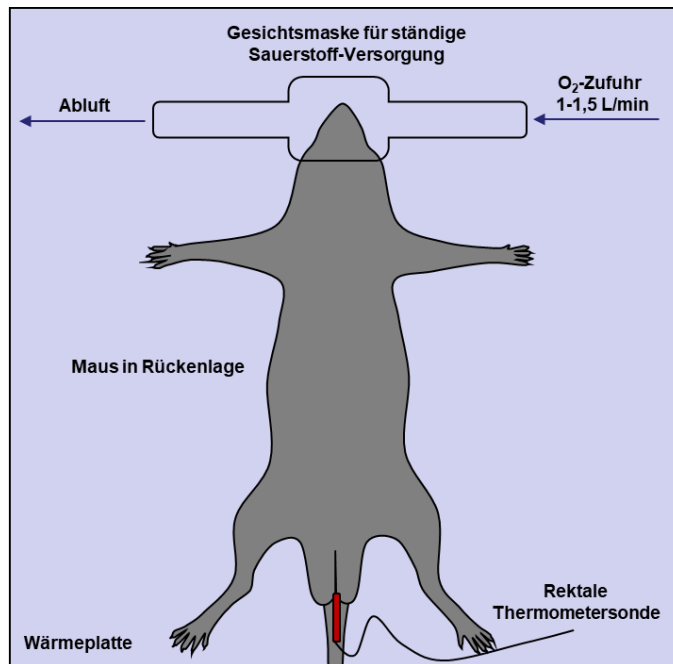


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer narkotisierten Maus auf einer Wärmeplatte mit einer rektalen Thermometersonde und einer Gesichtsmaske mit Sauerstoffzufuhr.

Katheter: Zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe Acridinorange und SYTOX Orange wurde ein Katheter in die *Vena jugularis externa* eingeführt. Unter einem Stereomikroskop (M50, Leica) wurde die Haut an der Halsunterseite entfernt (**Abbildung 23**). Anschließend wurden stumpf die Speicheldrüsen freipräpariert, voneinander getrennt und zum Kopf hin (kranial) ausgelagert.



Abbildung 23: Darstellung einer narkotisierten Maus. Die Haut der Halsunterseite ist entfernt worden. Das Fett und die Speicheldrüsen sind für weitere Arbeitsschritte freigelegt.

Die *Vena jugularis* konnte nun vorsichtig vom Fettgewebe und den Faszien freipräpariert werden. Zur Erleichterung der Platzierung des Polyethylen-Katheters wurde die *Vena jugularis* (**Abbildung 24**, weißer Rahmen) mittels eines Haltefadens kranial fixiert und gestreckt. Zur Fixierung des Katheters wurden drei Ligaturen (Fäden) um die Vene gelegt (in **Abbildung 24** mit weißen Pfeilen markiert). Kurz vor dem Brustkorb, wo die *Vena jugularis* in den Brustkorb (kaudal) mündet, wurden zwei Ligaturen gelegt und mit einem chirurgischen Knoten locker geschlossen. Die dritte Ligatur wurde kranial kurz hinter dem Haltefaden platziert und ebenfalls locker mit einem chirurgischen Knoten verschlossen. Nun wurde zwischen der ersten Ligatur (kranial) und der zweiten Ligatur (kaudal) eine etwa 1 bis 2 mm große Inzision (operativer Einschnitt, in **Abbildung 24** mit einem gelben Pfeil markiert) in die *Vena jugularis* gesetzt.

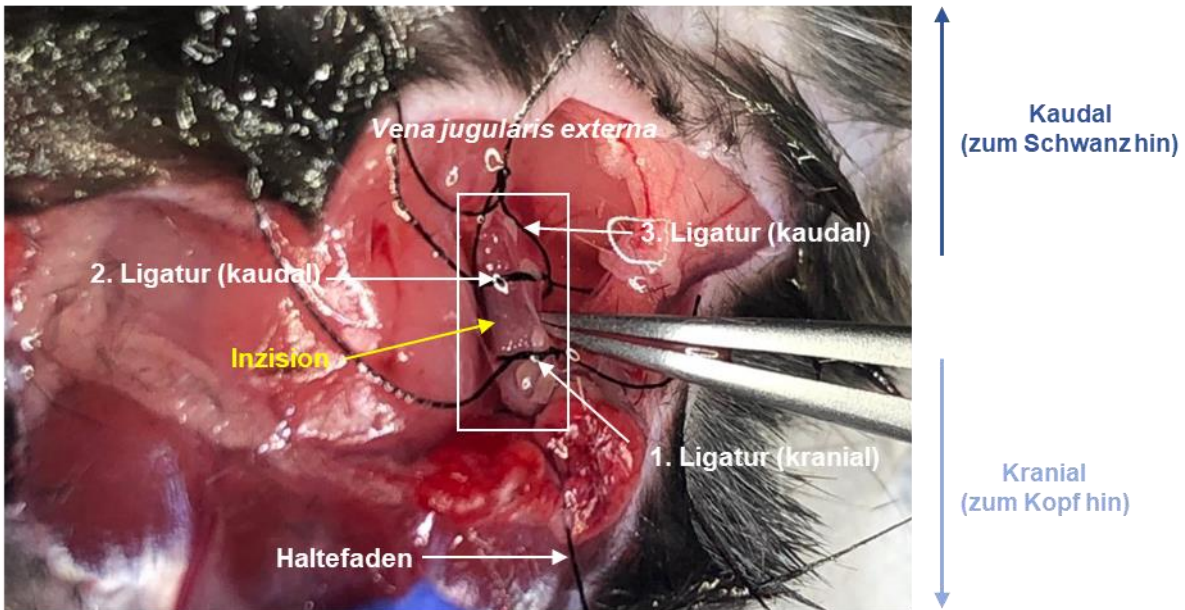


Abbildung 24: Darstellung der freipräparierten Vena jugularis (weißer Rahmen), des Haltefadens sowie der 3. Ligaturen, die zur Halterung des Katheters benötigt wurden. Die Stelle der 1 bis 2 mm großen Inzision wurde mit einem gelben Pfeil markiert und liegt zwischen der 1. und 2. Ligatur.

Der Katheter wurde vorsichtig zwischen den Gefäßwänden in die Vene eingeführt und alle drei Ligaturen wurden zur Fixierung des Katheters zugezogen (**Abbildung 25**). Durch das Anspülen des Katheters mit einer 0,9%-igen NaCl-Lösung wurde die Position wie auch die Dichtigkeit des Katheters kontrolliert.

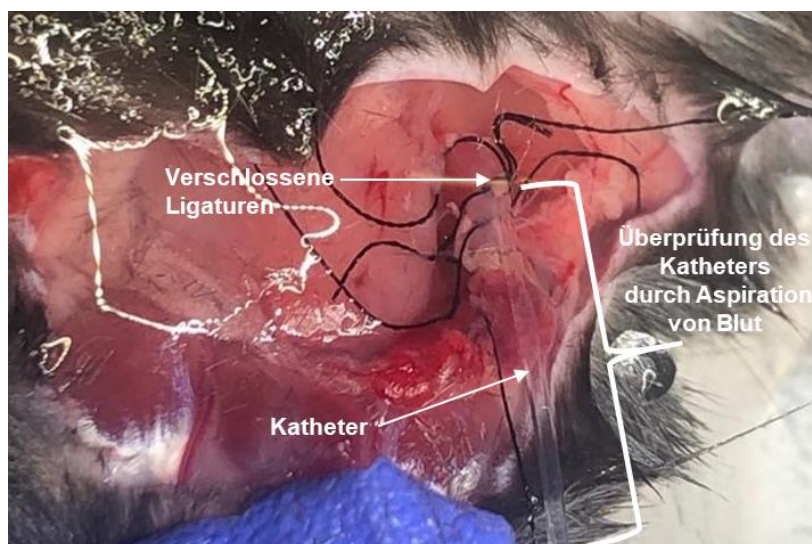


Abbildung 25: Darstellung des eingeführten Katheters in die Vena jugularis.

Hierbei wurde durch die Aspiration mit einer Spritze, die am Ende des Katheters fixiert ist, ein Sog erzeugt (**Abbildung 25**, weiße Klammer).



Abbildung 26: Darstellung des Katheters mit aspiriertem Blut.

Der so entstandene Druck führte dazu, dass das Blut in den Katheter gesogen wurde (**Abbildung 26**). Dies ist eine wichtige Kontrolle für die richtige Position des Katheters in der Vene.

Ischämie-Reperfusion: Zur Untersuchung der Ischämie-Reperfusion in den mesenterialen Gefäßen, wurde die Bauchhöhle entlang der ventralen Bauchseite (**Abbildung 27**, gestrichelte gelbe Linie) geöffnet (Laparotomie) und das Darmkonvolut vorsichtig ausgelagert (**Abbildung 28**).



Abbildung 27: Darstellung der Position des Bauchschnitts vor der Auslagerung des Darmkonvoluts.

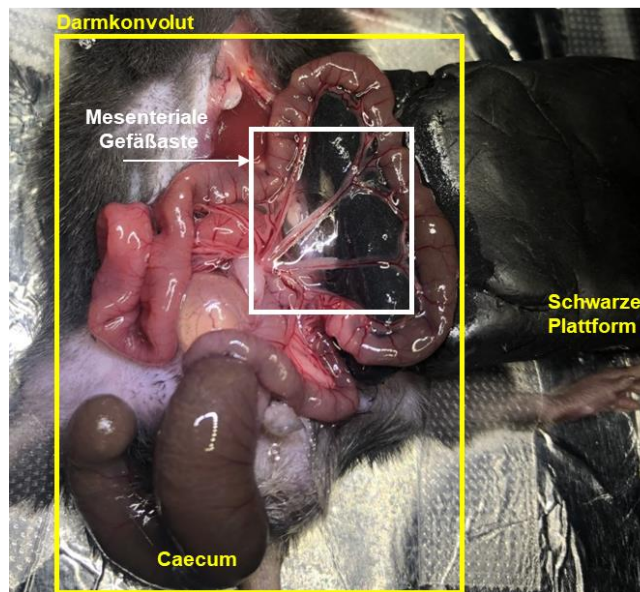


Abbildung 28: Darstellung des Darmkonvoluts (gelber Rahmen). Ein Teil des Darmsegments wurde auf eine schwarze Plattform gelagert. Die mesenterialen Gefäßäste wurden mit einem weißen Rahmen markiert.

Das Darmsegment wurde auf eine schwarze Plattform (bestehend aus einer ausgehärteten Knetmasse) gelegt und die mesenterialen Venolen über das Intravitalmikroskop betrachtet (**Abbildung 28**). Hierbei ist wichtig, dass über den kompletten Zeitraum der Präparation und der Aufnahme der mesenterialen Venolen, das komplette Darmsegment ständig mit körperwarmer NaCl-Lösung befeuchtet wird. Vor Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden 50 μL SYTOX Orange (5 μM) über den *V. jugularis externa* Katheter appliziert. Direkt vor der ersten Aufnahme wurden noch 50 μL Acridinorange (0,05%) über den Katheter injiziert.

Im Anschluss wurde vor der Ischämie das Verhalten der Zellen in sechs verschiedenen Gefäßästen bzw. Gefäßverzweigungen, den Venolen, aufgenommen (**Abbildung 29**). Hierbei wurde das Versuchstier unter das Intravital-Videofluoreszenzmikroskop gelegt und geeignete Venolen, die nicht von Fett überlagert waren, für eine geeignete Aufnahme gesucht.

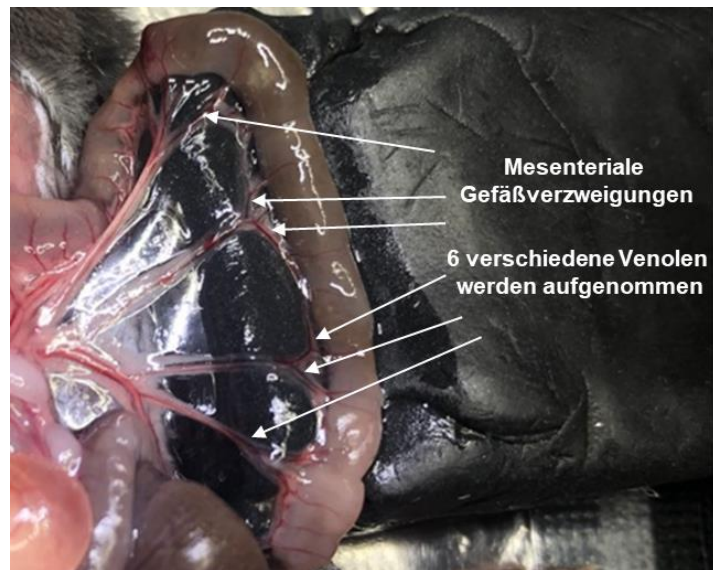


Abbildung 29: Beispielhafte Darstellung der mesenterialen Gefäßäste bzw. der Gefäßverzweigungen die vor wie auch nach der Ischämie und Reperfusion untersucht wurden.

Nach den Videoaufnahmen erfolgte die mesenteriale Ischämie durch das 60-minütige Abklemmen der *Arteria mesenterica cranialis* (analog zur *Arteria mesenterica superior* beim Menschen) mit Hilfe einer atraumatischen (Gewebe wird nicht verletzt) Microserrefine-Klemme (2 mm Federbreite).



Abbildung 30: Darstellung der *Arteria mesenterica cranialis*, die mit einer Micro-Klemme abgeklemmt wurde.

Das Darmkonvolut wurde für die Zeitdauer der Ischämie in die Bauchhöhle zurückgelegt und diese temporär verschlossen. Hierzu wurden die Haut wie auch das Bauchfell mit einem Faden (Prolene (Polypropylen), 7-0 Stärke) mit vier bis sechs

chirurgischen Knoten geschlossen. Nach erfolgter Ischämie wurde die Bauchhöhle wieder geöffnet und die Micro-Klemme entfernt. Anschließend wurde nach der Reperfusion der post-ischämische Zustand derselben Gefäßäste bzw. Gefäßverzweigungen aufgenommen. Hierbei war es hilfreich nach den Pre-Ischämie-Videoaufnahmen mit einem Mobiltelefon, das auf der schwarzen Plattform ausgelagerte Darmsegment zu dokumentieren und über eine selbst angefertigte Skizze schematisch die Positionen der interessanten Stellen zu markieren. Nach Beendigung des Experiments wurden die Versuchstiere in Vollnarkose durch zervikale Dislokation getötet.

Die Aufnahmen der Videosequenzen erfolgte über ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX51WI), das über ein Wasserimmersionsobjektiv (10x Vergrößerung, verbesserte Auflösung) verfügt. Alle Videos setzten sich aus 100 aufgenommenen Bildern zusammen. Die einzelnen Videosequenzen dauern insgesamt 30 Sekunden. Die Belichtungszeit beläuft sich pro Aufnahme auf 30 Millisekunden. Alle Aufnahmen der einzelnen Venolenausschnitte erfolgten direkt hintereinander.

6.5.2 Quantifizierung der IVM Ergebnisse

Zur Quantifizierung wurden sechs verschiedene Gefäßäste bzw. Gefäßverzweigungen (mesenteriale Venolen) vor und nach der einstündigen Ischämie betrachtet.

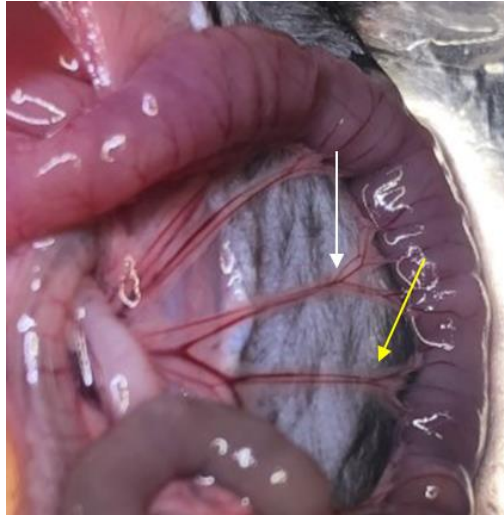


Abbildung 31: Beispielhafte Darstellung von geeigneten (weißer Pfeil) und ungeeigneten (gelber Pfeil) Gefäßästen für die Videoaufnahmen.

Bei der Auswahl der Gefäße war es wichtig, dass die Venolen mit möglichst wenig Fett umschlossen bzw. bedeckt sind. In **Abbildung 31** ist ein makroskopisches Bild von mesenterialen Gefäßästen dargestellt. Wie hier zu erkennen ist, sind manche Blutgefäße mit viel Fett (Gefäßast mit gelbem Pfeil markiert) und andere mit wenig Fett (Gefäßast mit weißem Pfeil markiert) bedeckt. Das Fett verhindert zum einen eine gute Aufnahme des Venolenausschnitts. Die Venolen sehen entsprechend schmal aus und es geht zu viel positives Signal von adhärierenden Leukozyten und den NETs durch die Fettablagerung auf den Gefäßwänden verloren. Zum anderen verfügt das Fettgewebe über eine eigene und meist auch starke Autofluoreszenz, was ein störender Faktor bei der Fokussierung der gefärbten Zellen sein kann. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Auswahl der richtigen Gefäße war neben der Gefäßgröße (Durchmesser) auch die Flussrichtung der Zellen. Hierbei ist zu beachten, dass die Venolen von den Arteriolen differenziert werden müssen. Vor den Aufnahmen ist deshalb immer zu beachten, wie groß die Gefäße sind (Venolen sind größer als die Arteriolen) und in welche Richtung der Zellfluss stattfindet.^{238, 239} Bewegen sich die Zellen in Richtung des Herzens, so handelt es sich um eine Venole, fließen die Zellen

vom Herzen weg, so handelt es sich um eine Arteriole. Die Flussrichtung und die Gefäßgröße sind wichtige Parameter bei der Unterscheidung der Gefäßtypen.

Da parallel zwei Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt wurden, können Aufschlüsse über das Verhalten von Leukozyten (mit Acridinorange angefärbt) und die Bildung von NETs (mit SYTOX Orange angefärbt) gewonnen werden. In den IVM Aufnahmen wurde zwischen NETs und NET-positiven Leukozyten unterschieden. Die NET-Strukturen an sich bestehen aus langen DNA-Filamenten (**Abbildung 32**, weiße Pfeile), auf denen das citrullinierte Histon H3 gebunden ist.¹⁰³ Dagegen wiesen NET-positive Leukozyten keine Filamente auf, sondern wurden hier als runde und rot-gefärbte Zellen definiert (**Abbildung 32**, grüne Pfeile). Bei den NET-positiven Leukozyten handelte es sich um Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt sind. Dadurch gelangte der Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Orange in die Zelle und kann somit die Zelle anfärben.

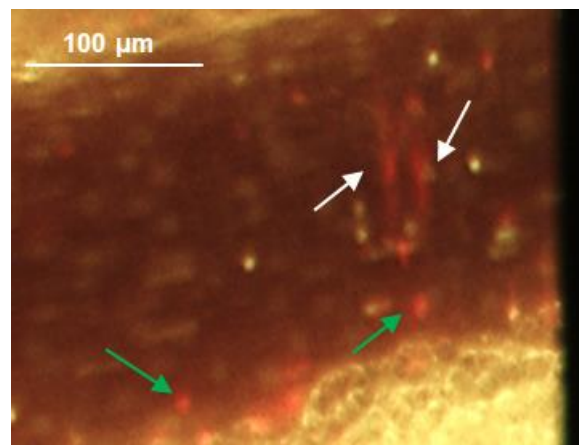


Abbildung 32: Repräsentative Abbildung von NETs (weiße Pfeile) und NET-positiven Leukozyten (grüne Pfeile) in einer mesenterialen Venole.

Zur Bestimmung der Anzahl an adhärennten Leukozyten und NETs in den Venolen wurde ein Auswertungsfenster mit einer Fläche A von $0,06 \text{ mm}^2$ gewählt. In **Abbildung 33** werden repräsentative Abbildungen von adhärennten Leukozyten und den NET-positiven Leukozyten in einem Auswertungsfenster dargestellt.

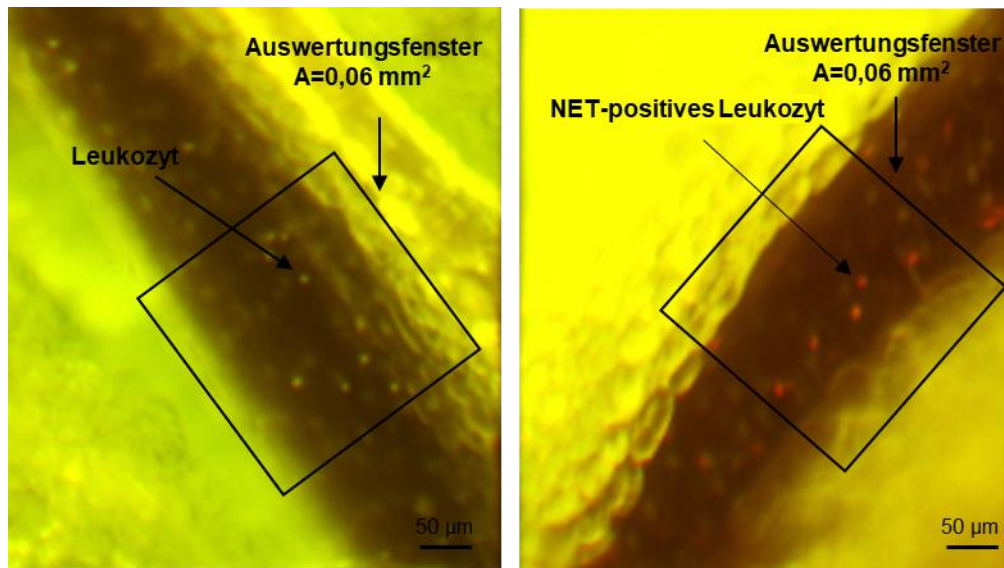


Abbildung 33: Repräsentative Darstellung von Leukozyten und NET-positiven Leukozyten. Leukozyten wurden mit Acridinorange angefärbt (grün); NETs wurden mit SYTOX Orange angefärbt (rot). Auswertungsfenster $0,06 \text{ mm}^2$; Maßstab $50 \text{ }\mu\text{m}$.

Weshalb ein Auswertungsfenster in der Größe von $0,06 \text{ mm}^2$ gewählt wurde, wird anhand der nächsten beiden Abbildungen erläutert. Wie in **Abbildung 34** zu sehen ist, wurde in diesem Beispiel ein Auswertungsfenster mit der Fläche A von $0,02 \text{ mm}^2$ gewählt. Wie dieser Abbildung zu entnehmen ist, fällt das Auswertungsfenster verglichen zur **Abbildung 33** wesentlich kleiner aus. Zwar liegt der schwarze Rahmen direkt auf der mesenterialen Venole, jedoch wurden bei einem Auswertungsfenster dieser Größe viele Zellen nicht miteinbezogen. Des Weiteren können die Venolen im Durchmesser auch breiter ausfallen, was nochmals gegen ein Auswertungsfenster mit der Fläche von $0,02 \text{ mm}^2$ spricht.

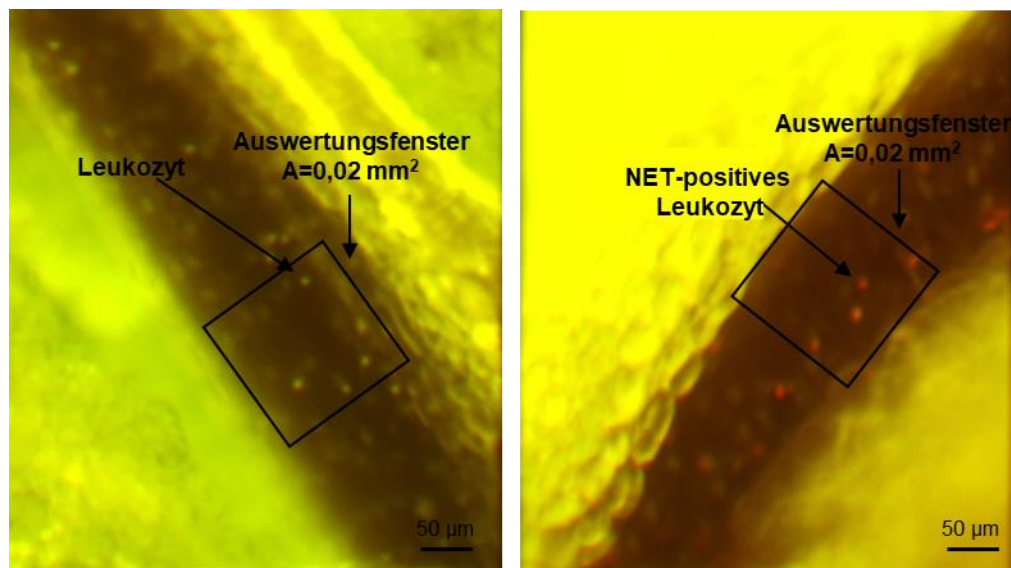


Abbildung 34: Repräsentative Darstellung von Leukozyten und NET-positiven Leukozyten. Leukozyten wurden mit Acridinorange angefärbt (grün); NETs wurden mit SYTOX Orange angefärbt (rot). Auswertungsfenster $0,02 \text{ mm}^2$; Maßstab $50 \mu\text{m}$.

Als weiteres Beispiel wurde ein Auswertungsfenster mit der Fläche A von $0,08 \text{ mm}^2$ gewählt. Wie in **Abbildung 35** zu sehen ist, fällt der schwarze Rahmen verglichen zu den **Abbildungen 33** und **34** wesentlich größer aus. Was in diesem Fall gegen ein Auswertungsfenster dieser Fläche spricht, ist, dass neben dem Venolenausschnitt noch sehr viel Fettgewebe (**Abbildung 35** roter Pfeil) mit in die Auswertung einfließt. Zwar können mit diesem Auswertungsfenster mehr Zellen gezählt und ausgewertet werden, jedoch ist der Anteil an Fettgewebe außerhalb des Gefäßes, der neben den Venolen zu sehen ist, zu hoch. Dieser Anteil des Fettgewebes kann das Ergebnis beeinflussen, da die adhärennten Leukozyten und NETs im Gefäß ausgewertet werden sollen und nicht im Fettgewebe detektierbar sind.

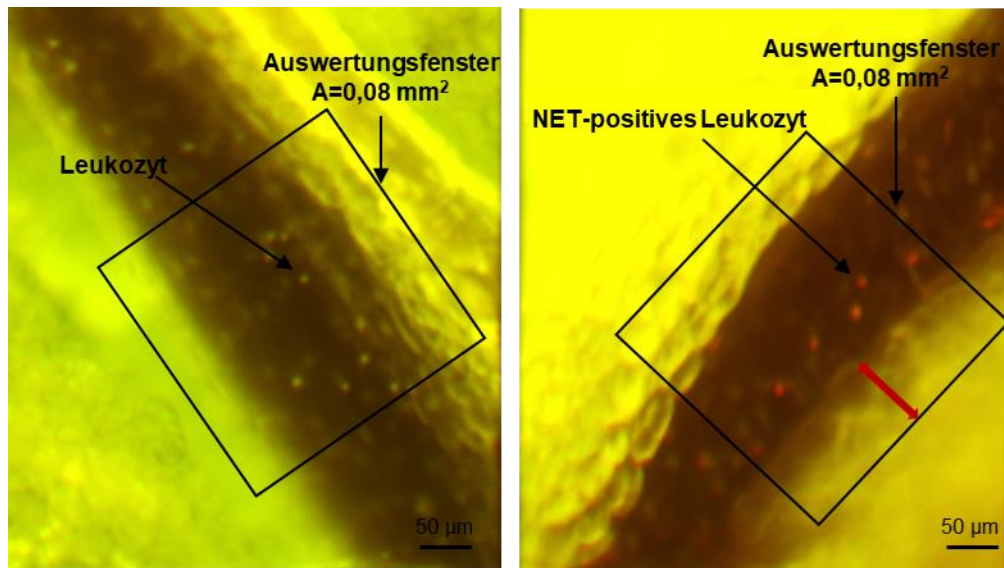


Abbildung 35: Repräsentative Darstellung von Leukozyten und NET-positiven Leukozyten. Leukozyten wurden mit Acridinorange angefärbt (grün); NETs wurden mit SYTOX Orange angefärbt (rot). Auswertungsfenster $0,08 \text{ mm}^2$; Maßstab $50 \mu\text{m}$.

Durch die in den beiden Beispielen beschriebene Definition der Rahmengröße (**Abbildung 34** und **Abbildung 35**) und der Erfahrung, die während der Auswertungen gesammelt wurden, eignet sich für unsere Experimente ein Auswertungsfenster mit einer Fläche A von $0,06 \text{ mm}^2$. Diese Fläche war für die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen geeignet, da eine entsprechend hohe Zahl an adhärenierenden Leukozyten und NETs in diesem Auswertungsbereich gezählt wurde und der Anteil an Fettgewebe nur einen minimalen Einfluss auf das Endergebnis hatte.

In der vorliegenden Arbeit wurden in den jeweiligen Experimenten die *in vivo* Adhäsion von Leukozyten sowie die *in vivo* NETose in mesenterialen Venolen detektiert und ausgewertet. Als adhärenente Leukozyten wurden Zellen definiert, die für eine Videosequenz von 30 Sekunden ihre Position in den Venolen nicht ändern und fest am Endothel anhaften. Als NETs bzw. NET-positive Leukozyten wurden die Zellen bewertet und gezählt, die mit SYTOX Orange sichtlich rot angefärbt waren. Des Weiteren sollten diese Zellen bzw. DNA-Strukturen über die 30 Sekunden der Videoaufnahme ihre Position in den Ausschnitten der Venolen nicht ändern.

Im Folgenden wird die Auswertung der Videoanalysen beschrieben:

Für jeden durchgeführten Versuch wurden an sechs verschiedenen Stellen (Fenster) Videoaufnahmen angefertigt. Jedes Video wurde nacheinander Bild für Bild gesichtet und die adhärennten Leukozyten und NETs. bzw. NET-positiven Leukozyten in einem Auswertungsfenster mit einer Fläche A von $0,06 \text{ mm}^2$ ausgezählt. Nach dem Auszählen wurde der Mittelwert der sechs ausgezählten Fenster berechnet. Dieser Wert bezieht sich auf einen Auswertungsrahmen von $0,06 \text{ mm}^2$. Zur Vereinfachung der Daten und der Darstellung wurden alle für diese Arbeit berechneten Mittelwerte der adhärennten Leukozyten und der NETs bzw. NET-Leukozyten auf eine Rahmengröße bzw. Endotheloberfläche von 1 mm^2 bezogen. Hierzu wurde der Quotient aus dem Mittelwert der ausgezählten Zellen und der Größe des Auswertungsfensters ($A=0,06 \text{ mm}^2$) gebildet. Der neue Wert bezieht sich somit auf eine Endothelfläche von 1 mm^2 . Zum Vergleich des Ischämie-Reperfusion-Zustands in den verschiedenen Experimenten wurden die ermittelten Zellzahlen vor der Ischämie (Pre) und direkt nach der einstündigen Ischämie (Post) miteinander verglichen.

6.6 Statistische Analyse

Alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurden mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 8.0 ausgewertet und als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler) dargestellt. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der D'Agostino-Pearson Omnibus K2 Test angewendet. Die Überprüfung der Gleichheit der Varianzen erfolgte über den F-Test.²⁴⁰ Bei einer Normalverteilung und der Gleichheit der Varianzen wurde für zwei Gruppen der Student's-t-Test (*) angewendet. Bei einer Abweichung von der Normalverteilung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test (#) angewendet.

7. Ergebnisse

7.1 Einfluss der Darmmikrobiota auf die NET-Bildung isolierter Knochenmark-Neutrophile

7.1.1 Abhängigkeit der Darmbesiedelung und der Mauslinie auf die *in vitro* NETose

Zur Untersuchung des Einflusses der Darmmikrobiota auf die Bildungen von NETs, wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten mit dem TLR4-Agonisten LPS (vom Serotyp *E. coli* 0111:B4) für 5 Stunden stimuliert und die Fluoreszenzintensität des NET-Signals gemessen. Des Weiteren wurde zur Kontrolle der NET-Bildung die stimulierten neutrophilen Granulozyten mit DNase I (50 U/mL) versetzt. Hierbei sollte es zur Fragmentierung der DNA-Struktur (Hauptbestandteil der NET-Struktur) und somit auch zu einer Verminderung des Fluoreszenzsignals kommen. Um eine Abhängigkeit der Mauslinie bei der NET-Bildung ausschließen zu können, wurden isolierte neutrophile Granulozyten von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Swiss Webster Mäusen mit LPS (vom Serotyp *E. coli* 0111:B4) stimuliert und miteinander verglichen.

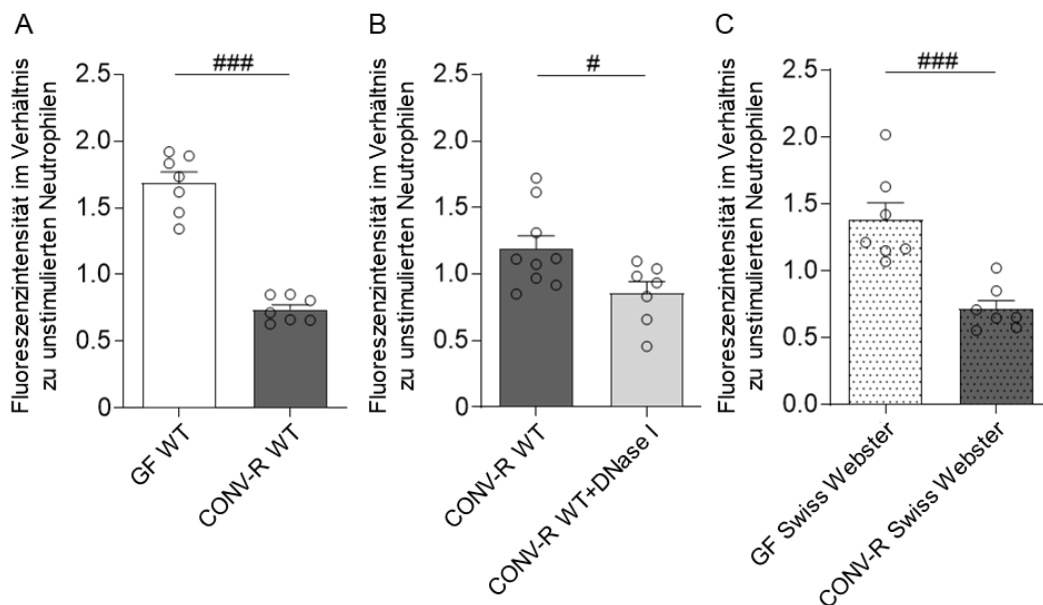


Abbildung 36: LPS-induzierte *in vitro* NETose isolierter neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark. A Vergleich der *in vitro* NET-Bildung in GF WT (n=7) Mäusen mit C57BL/6J (CONV-R)

WT Mäusen (n=7). **B** Verglichen wurde die *in vitro* NETose in CONV-R WT (n=9) mit stimulierten neutrophilen Granulozyten von CONV-R WT Tieren (n=7), die zusätzlich mit 50 U/mL DNase I (Fragmentierung der DNA-Struktur) behandelt wurden. **C** Vergleich der *in vitro* NETose in GF Swiss Webster (n=7) und CONV-R Swiss Webster Mäusen (n=7). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, #p<0.05, ####p<0.001.

Nach Stimulation mit LPS war die gemessene Fluoreszenzintensität in den neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten konventionell aufgewachsener Tiere um den Faktor 2 erhöht (**Abbildung 36A**). In einem zweiten unabhängigen Versuch, einem Kontrollexperiment (nicht gezeigt), konnte durch abermalige LPS-Stimulierung der neutrophilen Granulozyten von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Tieren, das bereits erhaltene Ergebnis aus **Abbildung 36A** reproduziert werden. Somit reagieren die neutrophilen Granulozyten keimfreier Tiere auf die Aktivierung durch LPS mit einer verstärkten NETose. Zur Kontrolle bzw. zum Nachweis der Detektion von NETs in diesem Zell-Assay, wurden die LPS-stimulierten Neutrophilen mit DNase I behandelt. Das gemessene Fluoreszenzsignal der mit DNase I behandelten neutrophilen Granulozyten war signifikant vermindert (**Abbildung 36B**). Somit konnte bestätigt werden, dass das gemessene Fluoreszenzsignal von den extrazellulären DNA-Strukturen aktivierter neutrophiler Granulozyten stammt. Um zu überprüfen, dass die im keimfreien Zustand gesteigerte NETose kein Stamm-spezifischer Effekt ist, wurden neutrophile Granulozyten von Swiss Webster Mäusen (Auszuchtstamm, häufig eingesetzte Versuchstiere) mit LPS vom *E. coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4 stimuliert. Wie bereits in **Abbildung 36A** gezeigt, kam es auch bei keimfreien Swiss Webster Mäusen zu einer vermehrten NET-Bildung und somit zum Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität (**Abbildung 36C**). Die Ergebnisse einer gesteigerten *in vitro* NETose im keimfreien Zustand waren somit reproduzierbar und unabhängig von der Mauslinie.

Neben der Quantifizierung der LPS-induzierten NETose durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität können NETs bzw. die DNA-Struktur und die verschiedenen gebundenen antimikrobiellen Proteine mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe (Immunfluoreszenz) angefärbt und detektiert werden. Hierzu wurden die isolierten neutrophilen Granulozyten mit dem TLR4-Agonsiten LPS stimuliert und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt (färbt Zellkern bzw. die DNA intakter

Zellen an). Des Weiteren wurde zur Detektion der NET-Strukturen der polyklonale Fluoreszenzantikörper Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) und der konjugierte Sekundärantikörper Alexa Fluor 555 Esel Anti-Kaninchen IgG verwendet. Der Fluoreszenzantikörper Anti-Histon H3 bindet an die citrullinierte Form der H3-Histone auf der extrazellulären DNA. Das citrullinierte Histon H3 ist ein wichtiger Marker der NETs (**Abbildung 37**).

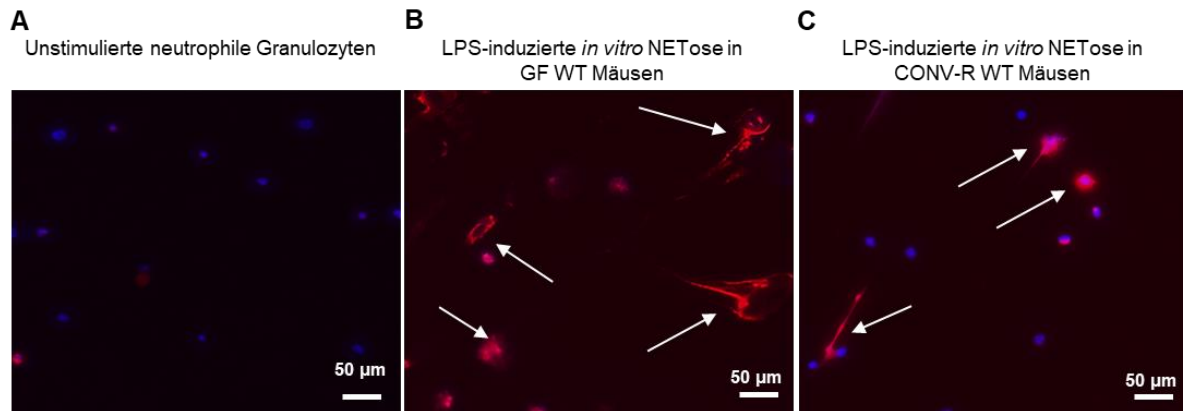


Abbildung 37: Repräsentative Bilder der in vitro NET-Strukturen in keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen. **A** Unstimulierte neutrophile Granulozyten angefärbt mit DAPI (blau) und Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) / Alexa Fluor 555-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen IgG (rot). **B** LPS-induzierte in vitro NETose in GF WT Mäusen. Stimulierte Zellen wurden mit DAPI (blau) und Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) / Alexa Fluor 555-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) angefärbt. NETs wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **C** LPS-induzierte in vitro NETose in CONV-R WT Mäusen. Stimulierte Zellen wurden mit DAPI (blau) und Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) / Alexa Fluor 555-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) angefärbt. NETs wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **A-C** Maßstab 50 µm, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 20facher Vergrößerung.

Wie bereits im Zell-Assay zu erkennen war, führte die LPS-Stimulierung der neutrophilen Granulozyten in keimfreien Mäusen zur vermehrten NETose (**Abbildung 36A**). Im Fall der Immunfluoreszenz konnte das Ergebnis der vermehrten NET-Bildung in den keimfreien Tieren verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Tieren reproduziert werden (**Abbildung 37**). Somit lässt sich auch am Beispiel der Immunfluoreszenz eine erhöhte Empfindlichkeit der neutrophilen Granulozyten gegenüber einer LPS-Stimulierung bestätigen.

7.1.2 Einfluss des Enzyms Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) auf die LPS-induzierte NET-Bildung

Zur Untersuchung der Rolle und Bestätigung der Abhängigkeit der NET-Bildung vom Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) wurden *ex vivo* neutrophile Granulozyten von *Pad4*-defizienten Mäusen aus dem Knochenmark isoliert und mit LPS vom Serotyp *E. coli* 0111:B4 stimuliert. Das Ergebnis des Versuchs wird als Fluoreszenzintensität im Verhältnis zu unstimulierten Neutrophilen zwischen konventionell aufgewachsenen und *Pad4*-defizienten Tieren verglichen.

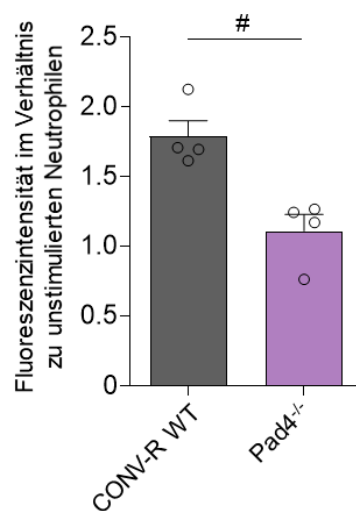


Abbildung 38: Untersuchung der Rolle der Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) auf die LPS-induzierte *in vitro* NETose. Verglichen wurden CONV-R WT ($n=4$) mit *Pad4*-defizienten Mäusen ($n=4$). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, # $p<0.05$.

Nach einer Inkubationszeit von 5 h mit dem TLR4-Agonisten LPS und Messung der Fluoreszenzintensität konnte zwischen den konventionell aufgewachsenen und den *Pad4*-defizienten Tieren ein signifikanter Unterschied in der NET-Bildung detektiert werden. Verglichen zu den CONV-R Tieren fand in den *Pad4*-defizienten Mäusen eine verminderte NET-Bildung statt (**Abbildung 38**). Das Ergebnis bestätigt, dass PAD4 für die Citrullinierung der Histone, sowie der damit verbundenen Dekondensation des Chromatins und der anschließenden NET-Bildung, essenziell ist. Im Rahmen der Arbeit diente dieses Experiment als Kontrollversuch.²⁴¹⁻²⁴³

7.1.3 Einfluss des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) in der LPS-induzierten *in vitro* NETose

Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) ist ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort. Durch die Erkennung und Bindung des Lipopolysaccharids (LPS) kommt es zur Aktivierung des TLR4-Signalweges. Da die LPS-Sensitivität von Zellen, wie den neutrophilen Granulozyten, durch die tonische Aktivierung des TLR4-Signalweges bestimmt wird, wurden im nächsten Versuch neutrophile Granulozyten untersucht, welche defizient für den TLR4-Signalweg sind.^{244, 245} Zur Untersuchung der *in vitro* NETose wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten mit LPS vom Serotyp *E. coli* 0111:B4 für 5 h stimuliert.

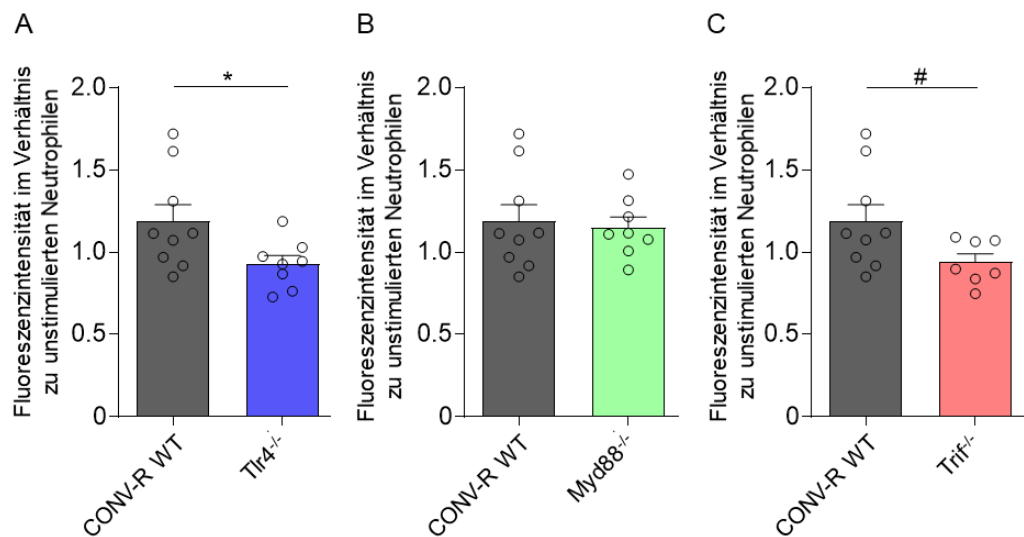


Abbildung 39: Untersuchung der *in vitro* NET-Bildung in Mäusen, die defizient für den TLR4-Signalweg sind. **A** Vergleich der LPS-induzierten *in vitro* NETose in WT CONV-R ($n=9$) und *Tlr4*-defizienten Mäusen ($n=8$). **B** Verglichen wurden CONV-R WT ($n=9$) mit *Myd88*-defizienten Mäusen ($n=8$). **C** Vergleich der LPS-induzierten NETose in CONV-R WT ($n=9$) und *Trif*-defizienten Mäusen ($n=7$). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Student's *t*-Test und den Mann-Whitney-Test, */# $p<0.05$.

Nach LPS-induzierte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und anschließender Messung der Fluoreszenzintensität, wurde in den *Tlr4*-defizienten Mäusen, verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Tieren, eine signifikant verringerte NET-Bildung detektiert (**Abbildung 39A**). Bei Tieren, die defizient für den MyD88-Signalweg sind, konnte kein Unterschied in der LPS-induzierten *in vitro* NETose verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Kontrolltieren festgestellt werden (**Abbildung 39B**). In

Mäusen, die defizient für den TRIF-Signalweg (MyD88-unabhängiger Signalweg) sind, wurden, verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Kontrolltieren, weniger NET-Strukturen im Zell-Assay detektiert (**Abbildung 39C**). Somit kann daraus geschlossen werden, dass nach LPS-induzierter Stimulierung der neutrophilen Granulozyten die NET-Bildung durch einen aktiven TLR4-Rezeptor bzw. über den TLR4-TRIF-Signalweg funktioniert. Besonders die neutrophilen Granulozyten der *Myd88*-defizienten Tiere reagieren sensitiver auf eine Stimulierung mit LPS.

Des Weiteren wurde die LPS-induzierte NETose in konventionell aufgewachsenen, sowie in *Myd88*- und *Trif*-defizienten Mäusen über die Immunfluoreszenz quantifiziert und miteinander verglichen (**Abbildung 40**). Hierbei wurden die isolierten und stimulierten neutrophilen Granulozyten mit DAPI, dem polyklonalem Anti-Histon H3 Antikörper und dem Alexa Fluor 555-konjugierten Esel Anti-Kaninchen Antikörper angefärbt und die erhaltenen Fluoreszenzbilder ausgewertet.

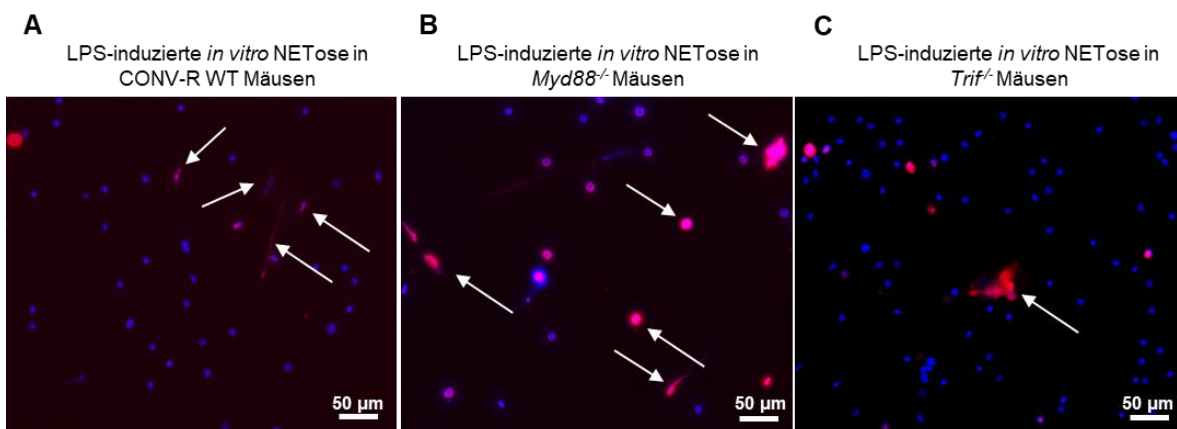


Abbildung 40: Repräsentative Bilder der in vitro NET-Strukturen konventionell aufgewachsener, *Myd88*- und *Trif*-defizienter Mäuse. **A** LPS-induzierte in vitro NETose in CONV-R WT Mäusen. Stimulierte Zellen wurden mit DAPI (blau) und Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) / Alexa Fluor 555-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) angefärbt. NETs wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **B** LPS-induzierte in vitro NETose in *Myd88*-defizienten Mäusen. Stimulierte Zellen wurden mit DAPI (blau) und Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) / Alexa Fluor 555-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) angefärbt. NETs wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **C** LPS-induzierte in vitro NETose in *Trif*-defizienten Mäusen. Stimulierte Zellen wurden mit DAPI (blau) und Anti-Histon H3 (Citrullin R2+R8+R17) / Alexa Fluor 555-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) angefärbt. NETs wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **A-C** Maßstab 50 µm, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 20facher Vergrößerung.

Wie den repräsentativen Bildern der *in vitro* NET-Strukturen zu entnehmen ist, bilden die neutrophilen Granulozyten der *Myd88*-defizienten Mäuse mehr NET-Strukturen (**Abbildung 40B**) aus als die neutrophilen Granulozyten der *Trif*-defizienten Mäuse (**Abbildung 40C**). Im Vergleich dazu wurden bei den konventionell aufgewachsenen Kontrolltieren (**Abbildung 40A**) und den *Myd88*-defizienten Mäusen etwa gleich viele NET-Strukturen detektiert. Auch hier kann festgehalten werden, dass die neutrophilen Granulozyten *Myd88*-defizienter Tiere sensitiver auf eine LPS-Stimulierung reagierten als die der *Trif*-defizienten Mäuse.

7.1.4 Einfluss der Antibiotika Behandlung auf die NET-Bildung

Durch die Behandlung mit einem Antibiotika-Cocktail, bestehend aus Ampicillin, Neomycin, Vancomycin und Metronidazol (**Tabelle 10**), wurde die Depletion der Darmmikrobiota in konventionell aufgewachsenen Mäusen induziert.²⁴⁶ Im folgenden Versuch wurde untersucht, wie sich die Depletion der Darmbakterien auf die LPS-induzierte *in vitro* NETose auswirkt.

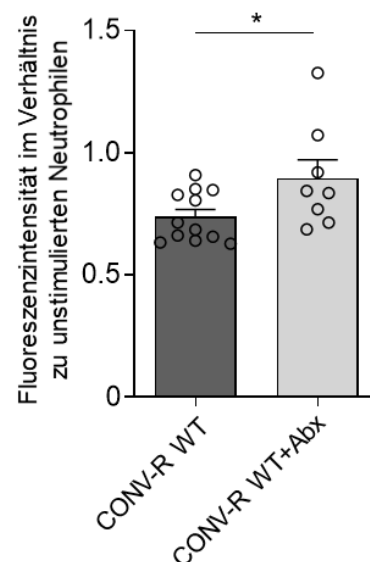


Abbildung 41: Untersuchung der Antibiotika-abhängigen *in vitro* NETose. Vergleich der LPS-induzierten NETose in CONV-R WT (n=12) und mit Antibiotika behandelten CONV-R WT Mäusen (n=8). CONV-R WT Mäuse wurden für 14 Tage mit einem Antibiotika-Cocktail (Abx) behandelt. Antibiotika-Cocktail: 1 g/L Ampicillin, 1 g/L Neomycin, 0,5 g/L Vancomycin und 1 g/L Metronidazol. Ergebnisse

wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Student's t-Test, * $p < 0.05$

Die neutrophilen Granulozyten von Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen wiesen eine vermehrte NET-Bildung verglichen zu den konventionell aufgewachsenen Kontrolltieren auf (**Abbildung 41**). Wie zuvor gezeigt, führte auch der keimfreie Haltungsstatus (frei von Darmbakterien) zu einer gesteigerten NET-Bildung (**Abbildung 36A**). Ähnlich wie keimfreie WT Mäuse schienen auch die neutrophilen Granulozyten der Antibiotika-behandelten Tiere sensitiver auf eine LPS-Stimulierung zu reagieren.

7.1.5 Rolle der Endotoxin-Toleranz in der *in vitro* NETose

Endotoxin (LPS) ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien. Eine Endotoxin-Exposition kann Entzündungen oder einen septischen Schock verursachen. Im folgenden Experiment wurde die Wirkung des Endotoxins auf die Reaktivität der neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse untersucht. Hierzu wurden die keimfreie Tiere für eine Woche mit 100 µg/mL LPS (Serotyp *E. coli* 0111:B4) über das Trinkwasser (ad libitum) behandelt.

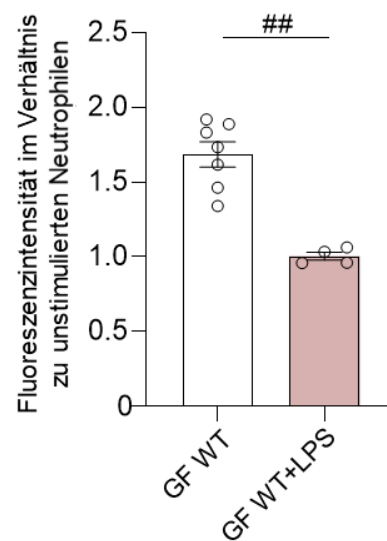


Abbildung 42: Untersuchung der Endotoxin-Toleranz in der LPS-induzierten *in vitro* NETose. Verglichen wurden GF WT (n=7) mit LPS-behandelten GF WT Mäusen (n=4). Das LPS vom *E.coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4 (Invivogen) wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL für 7 Tage über das Trinkwasser verabreicht. Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, ##p<0.01.

Durch die kontinuierliche Aufnahme von LPS über das Trinkwasser waren die keimfreien Versuchstiere in der Lage eine Toleranz gegen das Endotoxin aufzubauen. Nach der einwöchigen Behandlung mit LPS (100 µg/mL) und der anschließenden LPS-Stimulierung der isolierten neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, wurde eine signifikant verminderte NET-Bildung in den behandelten Mäusen verglichen zu den unbehandelten Kontrolltieren detektiert (**Abbildung 42**). Somit führte die Exposition der neutrophilen Granulozyten zur Bildung von weniger sensitiven bzw. reaktiven Neutrophilen.

7.1.6 Einfluss der Dextran Natriumsalz-induzierten Mukositis auf die *in vitro* NETose

Keimfreie und konventionell aufgewachsene Mäuse wurden mit einer 3,5%-igen Dextransulfat Natriumsalz- (DSS)-Lösung für fünf Tage über das Trinkwasser behandelt. Die Behandlung mit DSS hat zur Folge, dass es zu einer Abschwächung der Darmbarriere, zur Infiltration von Bakterien und der damit verbundenen Entzündung des Darms kommt.²⁴⁷

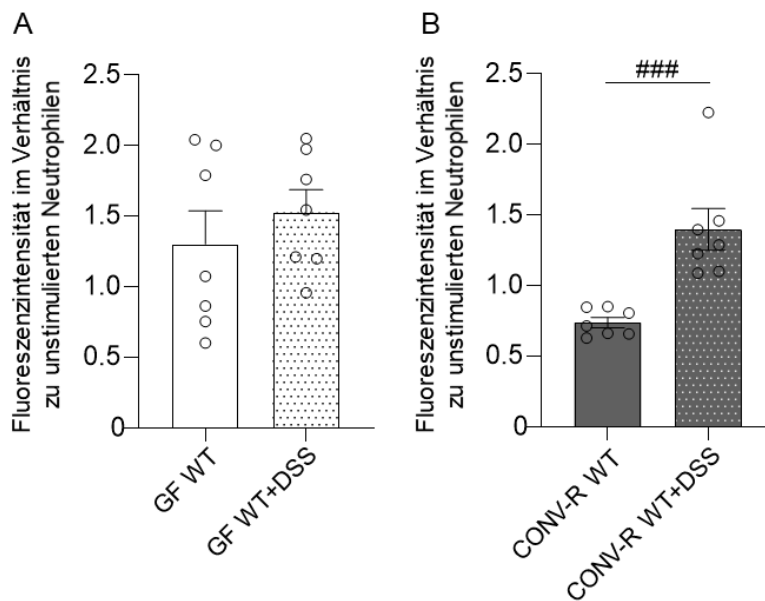


Abbildung 43: Untersuchung der Wirkung von DSS auf die LPS-induzierte NET-Bildung. A Verglichen wurden GF WT (n=7) mit DSS-behandelten GF WT Mäusen (n=7). **B** Verglichen wurden CONV-R WT (n=7) mit DSS-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=7). Die Behandlung mit 3,5 %-igen Dextransulfat Natriumsalz (DSS) erfolgte für 5 Tage über das Trinkwasser. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, ### $p < 0.001$.

In diesem Modell der akuten intestinalen Mukositis wurde verglichen, inwiefern die Behandlung mit DSS einen Einfluss auf die LPS-induzierte *in vitro* NETose in den Neutrophilen von GF WT und CONV-R WT Mäusen hat. Nach Stimulierung und Messung der SYTOX Orange- Fluoreszenzintensität konnte in unbehandelten im Vergleich zu DSS-behandelten GF WT Mäusen kein Unterschied in der LPS-induzierten NET-Bildung detektiert werden (**Abbildung 43A**). Die neutrophilen Granulozyten der DSS-behandelten keimfreien Mäuse reagierten gleichermaßen auf

die LPS-Stimulierung wie die Neutrophilen der keimfreien Kontrollgruppe. Somit schienen die neutrophilen Granulozyten nach erfolgter DSS Behandlung nicht wesentlich sensibler bzw. reaktiver auf eine LPS-Stimulierung zu reagieren. Dagegen führte die DSS Behandlung in CONV-R WT Mäusen verglichen zu der CONV-R WT Kontrollgruppe im *in vitro* NETose Assay zu einer signifikant vermehrten Bildung von NET-Strukturen (**Abbildung 43B**). Da durch die DSS-Behandlung der Mäuse die Barrierefunktion herabgesetzt wurde, wodurch das Eindringen von Bakterien erleichtert wurde, könnte dies ein Grund für die vermehrte *in vitro* NETose sein.

7.1.7 Wirkung der Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota auf die LPS-induzierte *in vitro* NETose

In diesem Kolonisierungsversuch wurden keimfreie C57BL/6J und keimfreie Swiss Webster Mäuse über eine Schlundsonde mit zökalem Inhalt kolonisiert. Ziel des Versuchs war es, die Auswirkung der Kolonisierung von ehemals keimfreien Versuchstieren auf die LPS-induzierte *in vitro* NETose zu untersuchen.

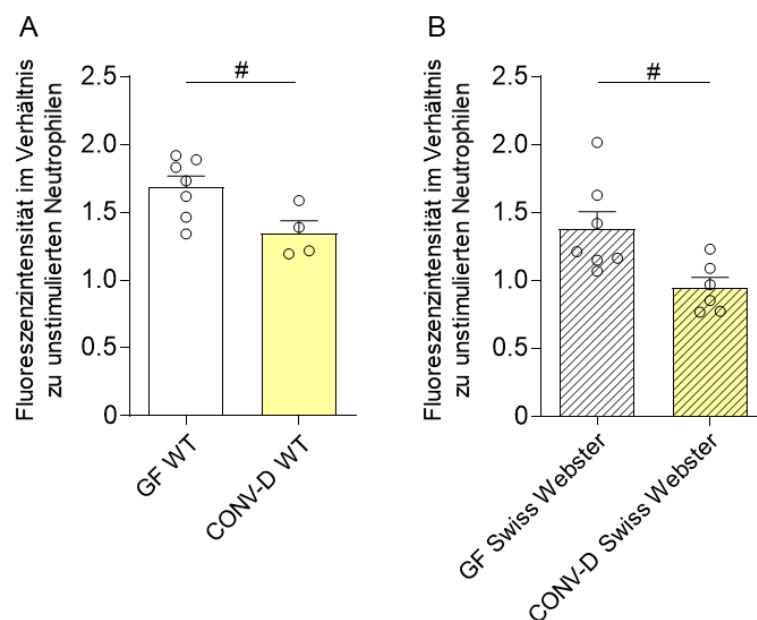


Abbildung 44: Untersuchung der Wirkung einer Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota auf die NET-Bildung. **A** Vergleich der LPS-induzierten NETose in GF WT (n=7) und CONV-D WT Mäusen (n=4). **B** Vergleich der LPS-induzierten NETose in GF Swiss Webster (n=7) und CONV-D Swiss Webster (n=7) Mäusen.

CONV-D Swiss Webster Mäusen ($n=4$). Die Verabreichung des zökalen Inhalts erfolgte über eine Schlundsonde. Die Besiedelung des Darms verlief über 14 Tage. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, $\#p<0.05$.

Die isolierten neutrophilen Granulozyten der konventionalisierten Mäuse (conventional-derived; CONV-D) wurden für 5 h mit LPS (Serotyp *E. coli* 0111:B4) stimuliert und anschließend die Signalintensität des an die NET gebundenen Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Orange ermittelt. Hierbei konnte in den CONV-D WT Mäusen im Vergleich zu den GF WT Kontrolltieren eine verringerte NET-Bildung detektiert werden (**Abbildung 44A**). Um sicherzustellen, dass das Ergebnis unabhängig von der eingesetzten Mauslinie ist, wurden zusätzlich keimfreie Swiss Webster Mäuse mit zökalem Inhalt kolonisiert. Auch die neutrophilen Granulozyten der konventionalisierten Swiss Webster Mäuse bildeten weniger NET-Strukturen als die GF Swiss Webster Kontrollgruppe (**Abbildung 44B**). Wie dem Graphen A aus der **Abbildung 36** zu entnehmen ist, neigten die neutrophilen Granulozyten der CONV-R WT Mäuse zu einer verminderten *in vitro* NETose. Dieser Mikrobiota-abhängige Effekt konnte durch den Kolonisierungsversuch bestätigt werden.

7.2 Einfluss der Darmmikrobiota auf die *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell

7.2.1 Einfluss der Darmmikrobiota auf das Adhäsionsverhalten von Leukozyten an das Endothel und die *in vivo* NETose

Im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell wurde die *Arteria mesenterica cranialis* der Maus (analog zur *Arteria mesenterica superior* im Menschen) für eine Stunde mittels einer atraumatischen Klemme abgeklemmt, wodurch ein ischämischer Zustand (die Unterbrechung der Blutversorgung) hervorgerufen wurde. Nach einer Stunde wurde die Klemme entfernt und der Zustand der Reperfusion, d.h. die Wiederherstellung der Durchblutung, zugelassen. Im Rahmen der Arbeit wurde die Leukozyten-Endothel-Interaktion sowie die *in vivo* NET-Bildung untersucht. Zu diesem Zweck wurden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe über einen Katheter in die *Vena*

jugularis externa appliziert. Die Leukozyten wurden mit Acridinorange (Anfärbung des Zellkerns) und die NETs mit SYTOX Orange (bindet an die extrazelluläre DNA) angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten über die Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie.

Zur Untersuchung der Rolle der Darmmikrobiota bei einer Ischämie-Reperfusionsschädigung wurden die Ergebnisse von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Wildtyp-Mäusen vor und nach der einstündigen Ischämie-Reperfusion miteinander verglichen.

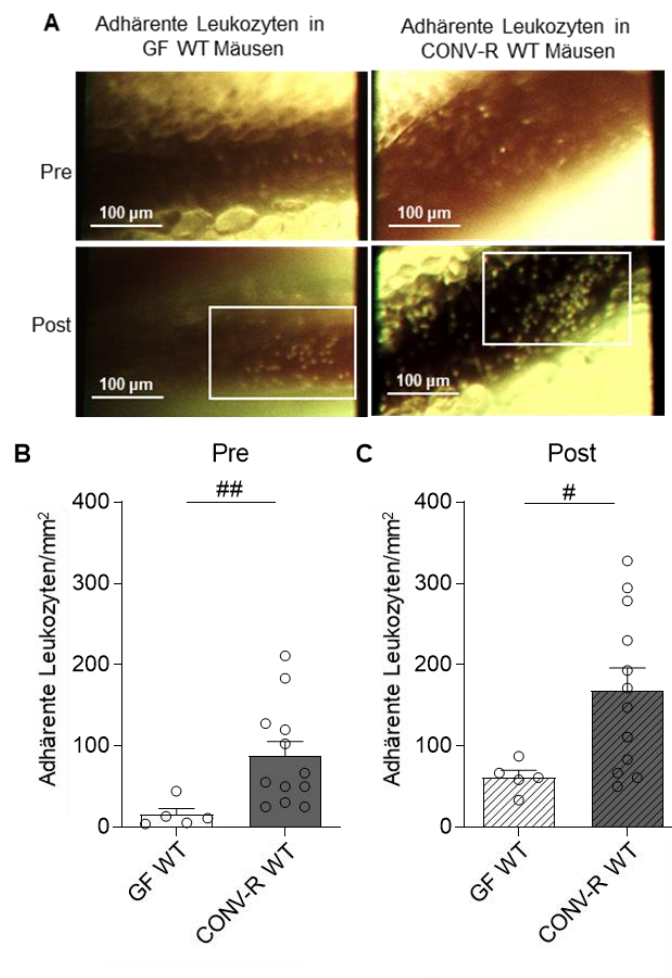


Abbildung 45: Einfluss der Darmmikrobiota auf die in vivo Leukozytenadhäsion. A Repräsentative Darstellung von adhärenenten Leukozyten vor (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT und CONV-R Mäusen. Adhärente Leukozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange angefärbt (grün) und gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 100 μm , adhärenente Leukozyten wurden repräsentativ mit einem weißen Rahmen markiert. **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-R WT-R Mäusen (n=12). **C** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen

wurden GF WT (n=5) mit CONV-R WT-R Mäusen (n=12). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, #p<0.05, ###p<0.01.

Vor der Ischämie (Pre) wurden in den konventionell aufgewachsenen Mäusen signifikant mehr ans Endothel adhärierende Leukozyten im Vergleich zu den keimfreien Mäusen detektiert (**Abbildung 45A** und **Abbildung 45B**). Nach der einstündigen Ischämie, dem Post-Zustand, wurden abermals mehr adhärenente Leukozyten in den CONV-R WT Tieren detektiert (**Abbildung 45A** und **Abbildung 45C**). Somit kam es in CONV-R WT Mäusen sowohl im pre- wie auch im post-ischämischen Zustand zu einer vermehrten Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Zusätzlich wurde neben der Leukozytenadhäsion die NET-Bildung in den GF WT und den CONV-R WT Mäusen untersucht.

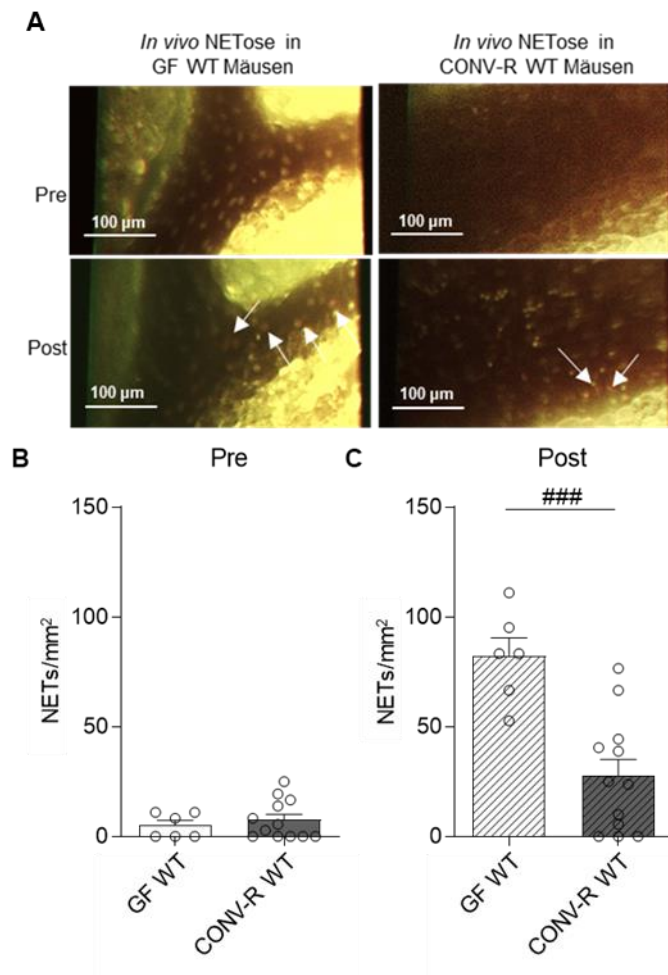


Abbildung 46: Einfluss der Darmmikrobiota auf die in vivo NETose. **A** Repräsentative Darstellung der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT und CONV-R WT Mäusen. Adhärenente Leukozyten wurden mit Acridinorange (grün) und NETs mit

SYTOX Orange (rot) angefärbt und gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 100 μm , NETs wurden repräsentativ mit weißen Pfeilen markiert. **B** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-R WT Mäusen (n=12). **C** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-R WT Mäusen (n=12). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, ####p<0.001.

Im pre-ischämischen Zustand wurde kein Unterschied in der NET-Bildung zwischen keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen detektiert. Generell wurden in den beiden Mausgruppen nur wenige NET-Strukturen detektiert (**Abbildung 46A** und **Abbildung 46B**). Dagegen kam es nach der einstündigen Ischämie in keimfreien Mäusen zu einer signifikant vermehrten NETose (**Abbildung 46A** und **Abbildung 46C**). Bereits in den vorhergehenden *in vitro* Versuchen konnte in keimfreien Tieren mehr LPS-induzierte NET-Bildung beobachtet werden (**Abbildung 36**). Somit schienen auch im Fall der *in vivo* NETose die Zellen, in diesem Fall die myeloiden Zellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Eosinophile), wesentlich sensitiver auf die Ischämie und anschließender Reperfusion zu reagieren.

7.2.2 Die Rolle der Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) in der *in vivo* NETose

PAD 4 ist ein Enzym, das nachweislich an der Bildung der NETs beteiligt ist.²⁴¹⁻²⁴³ Durch die Citrullinierung der Histone und der Dekondensation des Chromatins kommt es zur Ruptur der Zellmembran und Freisetzung der NET-Strukturen. Während bereits im *in vitro* Experiment nach LPS-Stimulierung der neutrophilen Granulozyten eine verminderte NETose detektiert werden konnte (**Abbildung 38**), wurde in diesem Experiment, im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsverletzungsmodell, der Einfluss einer Ischämie-Reperfusions-Schädigung in CONV-R WT Kontrollmäusen und in Mäusen, die *Pad4*-defizient sind, genauer untersucht.

Vor der Ischämie, im pre-ischämischen Zustand, kam es in den CONV-R WT Tieren verglichen zu den *Pad4*-defizienten Mäusen zu einer erhöhten Adhäsion der Leukozyten ans Endothel (P-Wert 0,066, **Abbildung 47A**). Auch nach der einstündigen Ischämie adhärten nach wie vor mehr Leukozyten an das Endothel als in den *Pad4*-defizienten Mäusen (**Abbildung 47B**). Die Anzahl an adhärierenden

Leukozyten nahm somit weiter zu, während in den *Pad4*-defizienten Mäusen die Zahl der adhärenierenden Zellen sich vor und nach der Ischämie nicht wesentlich veränderte.

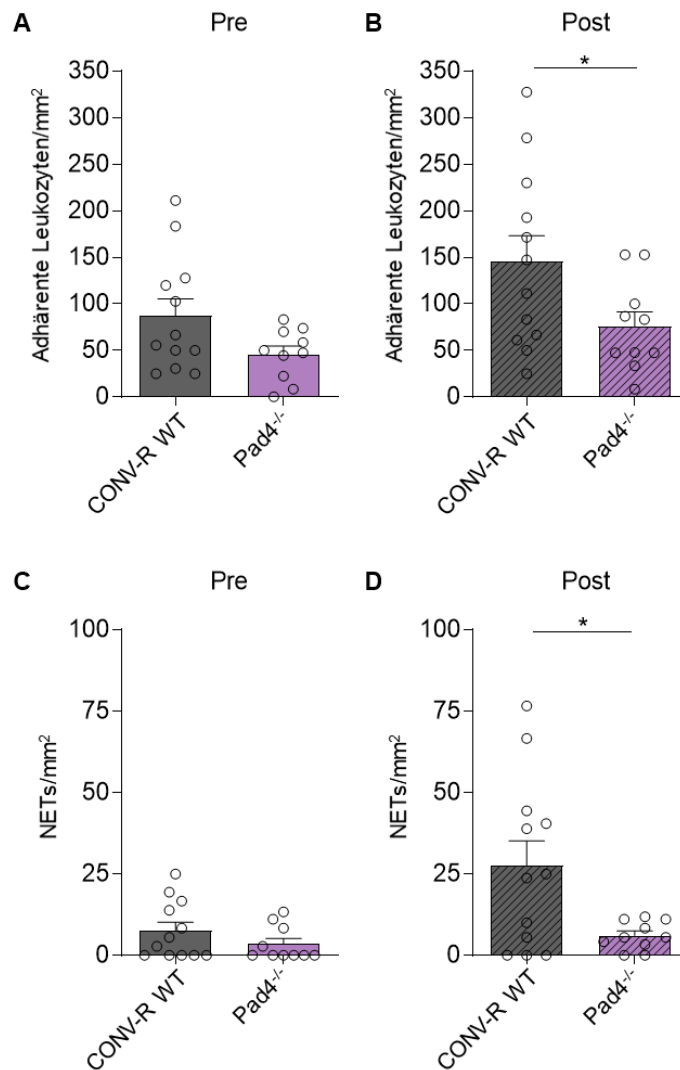


Abbildung 47: Untersuchung der Rolle der Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) in der in vivo NETose. **A** Anzahl der adhärenierenden Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Pad4*-defizienten Mäusen (n=10). **B** Anzahl der adhärenierenden Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Pad4*-defizienten Mäusen (n=10). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Pad4*-defizienten Mäusen (n=10). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Pad4*-defizienten Mäusen (n=10). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Student's-t-Test, *p<0.05.

Vor der Ischämie-Reperfusionsschädigung wurden in beiden Mausgruppen mittels Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie kaum NET-Strukturen detektiert (**Abbildung 47C**). Im Fall der *Pad4*-defizienten Mäuse änderte sich dieser Zustand auch nach der Ischämie nicht, während die *in vivo* NETose in den CONV-R Kontrolltieren zunahm (**Abbildung 47D**). Auch im Fall der *in vivo* NETose wurde die Relevanz des Enzyms PAD4 in der NET-Bildung dokumentiert.

7.2.3 Einfluss des TLR4 und dessen Adaptermoleküle MyD88 und TRIF auf die *in vivo* NETose

Da im *in vitro* Experiment neutrophile Granulozyten von *Tlr4*-defizienten Mäusen auf ihre Reaktivität bezüglich einer LPS-Stimulierung (**Abbildung 39**) untersucht wurden, sollte im Zuge des mesenterialen Verletzungsmodell die Abhängigkeit des TLR4-Rezeptors auf die *in vivo* NETose betrachtet werden.

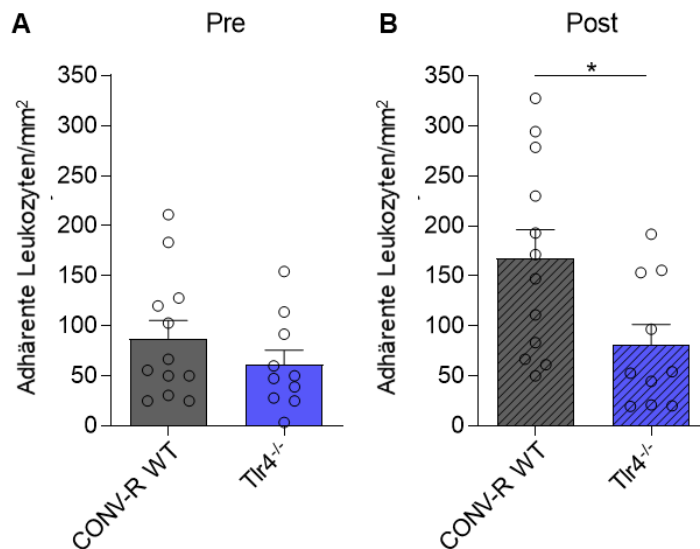


Abbildung 48: Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Leukozyten im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell. **A** Anzahl der adhärenen Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Tlr4*-defizienten Mäusen (n=10). **B** Anzahl der adhärenen Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Tlr4*-defizienten Mäusen (n=10). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Student's-t-Test, $^*p < 0.05$.

Die Anzahl der adhärierenden Leukozyten von konventionell aufgewachsenen WT und *Tlr4*-defizienten Mäusen wurde verglichen. Im Fall der Pre-Ischämie konnte kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion der Leukozyten zwischen CONV-R WT und CONV-R *Tlr4*-defizienten Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 48A**). Hingegen wurde nach der Ischämie und Reperfusion ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an adhärierenden Leukozyten am Endothel detektiert. Die Leukozyten in CONV-R WT Mäuse wiesen verglichen zu CONV-R *Tlr4*-defizienten Mäusen eine vermehrte Zelladhäsion auf (**Abbildung 48B**). Auch war zu beobachten, dass die Anzahl an adhärierenden Zellen in den *Tlr4*-defizienten Mäusen sich vor wie nach der Ischämie kaum veränderte.

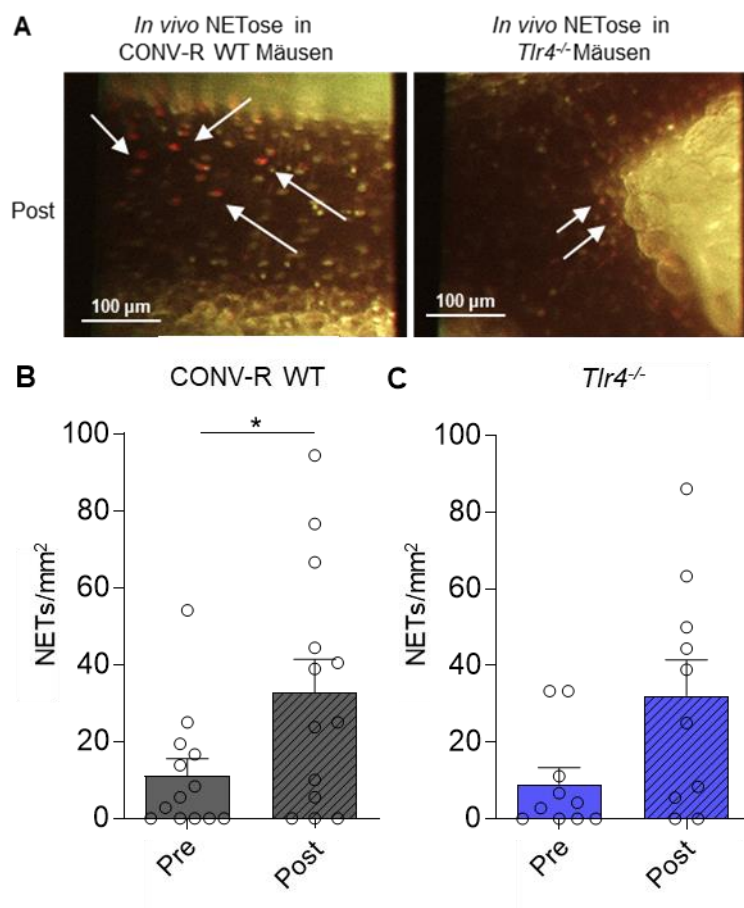


Abbildung 49: Untersuchung der in vivo NETose in Mäusen, die defizient für den TLR4-Signalweg sind. **A** Repräsentative Darstellung der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post) in CONV-R WT und *Tlr4*-defizienten Mäusen. Adhärente Leukozyten wurden mit Acridinorange (grün) und NETs mit SYTOX Orange (rot) angefärbt und gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 100 µm, NETs wurden repräsentativ mit weißen Pfeilen markiert. **B** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in CONV-R WT Mäusen (n=13). **C** Anzahl der

*NETs bzw. NET-positiven Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post) und nach einstündiger Ischämie (Post) in Tlr4-defizienten Mäusen (n=10). Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Student's-t-Test, *p<0.05.*

In konventionell aufgewachsenen WT Mäusen wurden nach der Ischämie, im post-ischämischen Zustand, eine signifikante Steigerung der *in vivo* NETose detektiert (**Abbildung 49A und Abbildung 49B**). Dagegen kam es nach der einstündigen Ischämie in den *Tlr4*-defizienten Tieren zu keinem signifikanten Anstieg der *in vivo* NETose (**Abbildung 49A und Abbildung 49C**). Wie bereits im *in vitro* Versuch festgestellt, führte die LPS-Stimulierung der neutrophilen Granulozyten der *Tlr4*-defizienten Mäuse zu keiner vermehrten NET-Bildung (**Abbildung 39**). Dies deutete darauf hin, dass auch für die Ischämie-Reperfusion-abhängige NET-Bildung ein intakter TLR4-Signalweg erforderlich ist.

Zur weiteren Validierung der Aussage, dass die *in vivo* NET-Bildung maßgeblich durch den TLR4-Signalweg gefördert wird, wurden *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* doppel-knockout Mäuse generiert. Bei diesen Tieren ist sowohl der TRIF- als auch der MyD88-abhängige Signalweg blockiert. Auch in diesem Experiment wurde das Adhäsionsverhalten der Leukozyten, sowie die NET-Bildung vor und nach der Ischämie und Reperfusion analysiert.

Im pre-ischämischen Zustand konnte kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion der Leukozyten zwischen CONV-R WT und den doppel-knockout Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 50A**). Erst nach der einstündigen Ischämie und anschließender Reperfusion adhärten in den CONV-R WT Tieren mehr Leukozyten an das Endothel als in den *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* Mäusen (**Abbildung 50B**). Hierbei war auch zu beobachten, dass sich die Anzahl an adhärierenden Leukozyten in den doppel-knockout Tieren nach der einstündigen Ischämie nicht veränderte.

Im Fall der *in vivo* NETose kam es auch hier zu keinem signifikanten Unterschied in der NET-Bildung. Pre-ischämisch wurden sowohl in den CONV-R wie auch in den *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* Tieren nur wenige NET-Strukturen detektiert (**Abbildung 50C**). Nach der einstündigen Ischämie wurden in den CONV-R WT Kontrolltieren eine signifikant vermehrte NETose detektiert (**Abbildung 50D**).

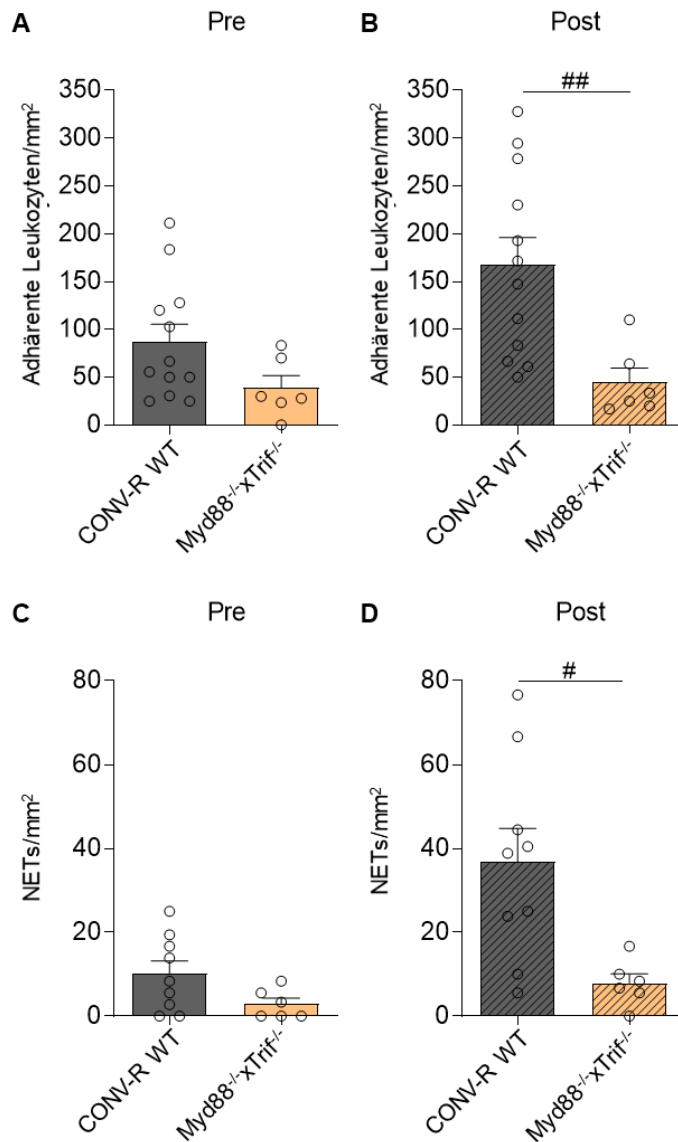


Abbildung 50: Untersuchung der *in vivo* NETose und des Adhäsionsverhalten der Leukozyten in *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* doppel-knockout Mäusen. **A Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* Mäusen (n=6). **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* Mäusen (n=6). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* Mäusen (n=6). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit *Myd88^{-/-}xTrif^{-/-}* Mäusen (n=6). Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, #p<0.05, ##p<0.01.**

Somit wurde die Aussage bestätigt, dass die *in vivo* NET-Bildung vom TLR4-Signalweg, sowie von seinen Adaptermolekülen MyD88 und TRIF abhängig ist.

7.2.4 Rolle der endothelialen TLR4-Expression in der *in vivo* NETose

Um zu untersuchen, ob der endotheliale TLR4-Rezeptor einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Leukozyten und die *in vivo* NETose hat, wurden im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell Leukozyten und NET-Strukturen mit den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen Acridinorange und SYTOX Orange angefärbt und das Zellverhalten im Intravital-Videofluoreszenzmikroskop analysiert. Hierbei wurde eine Mauslinie eingesetzt, in der die Expression des TLR4-Rezeptors in den Endothelzellen gewebespezifisch deletiert wurde.

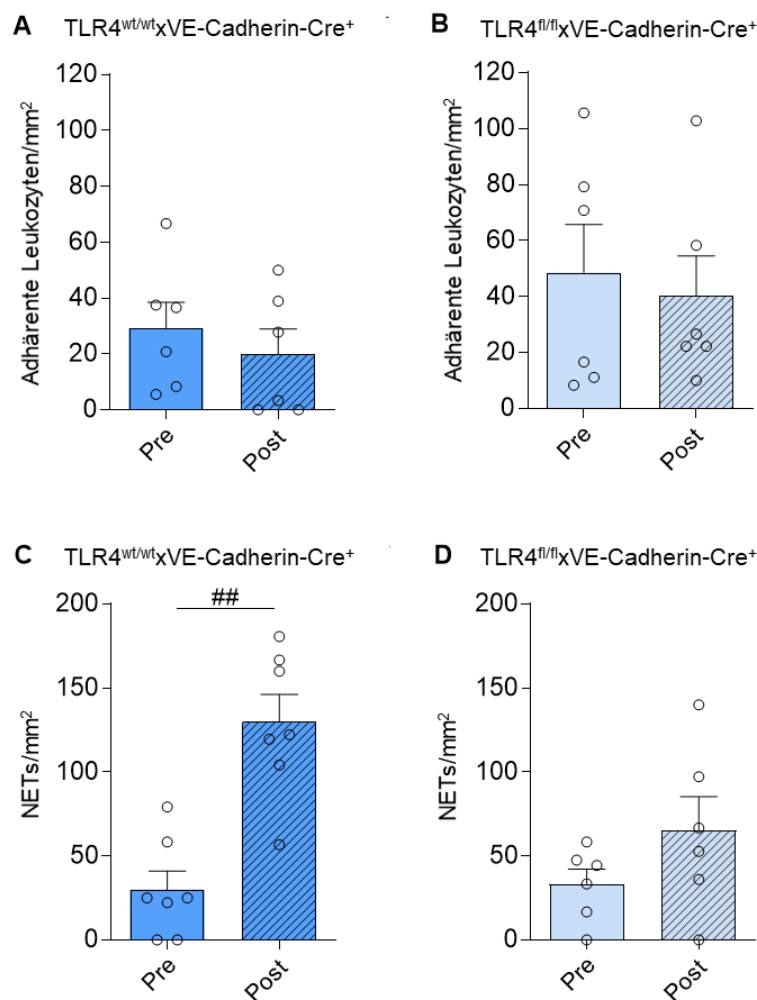


Abbildung 51: Untersuchung der Wirkung der endothelialen TLR4-Expression auf die *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell. **A** Anzahl der adhärenen Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in TLR4^{wt/wt}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mäusen (n=6). **B** Anzahl der adhärenen Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in TLR4^{fl/fl}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mäusen (n=6). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in TLR4^{wt/wt}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mäusen

(n=6). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in TLR4^{fl/fl}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mäusen (n=6). Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, ##p<0.01.

In der Kontrollgruppe, TLR4^{wt/wt}xVE-Cadherin-Cre⁺, konnte im pre- wie auch im post-ischämischen Zustand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an adhärenenten Leukozyten beobachtet werden (**Abbildung 51A**). In der TLR4^{fl/fl}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mausgruppe, die defizient für den endothelialen TLR4 ist, konnte vor wie auch nach der Ischämie kein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten beobachtet werden (**Abbildung 51B**). Allerdings wurden in den TLR4^{fl/fl}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mäusen mehr adhärierende Leukozyten detektiert als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Dies führte zu der Vermutung, dass der TLR4-Rezeptor bzw. der TLR4-Signalweg einen Einfluss auf die Adhäsion der Leukozyten im mesenterialen Verletzungsmodell hat.

Im Fall der *in vivo* NETose, kam es in der Kontrollgruppe nach einstündiger Ischämie zu einem signifikanten Anstieg der NET-Strukturen verglichen zum pre-ischämischen Zustand (**Abbildung 51C**). Die TLR4^{fl/fl}xVE-Cadherin-Cre⁺ Mäuse wiesen dagegen keinen signifikanten Unterschied in der *in vivo* NET-Bildung im pre- und post-ischämischen Zustand auf (**Abbildung 51D**). Somit kann festgehalten werden, dass die Deletion des endothelialen TLR4-Rezeptores keinen signifikanten Effekt auf die *in vivo* NETose hatte.

7.2.5 Einfluss der von-Willebrand-Faktor Defizienz auf die *in vivo* NETose

Der VWF ist eine wichtige Komponente der Hämostase. Bei einer Defizienz des VWF kann es zu einer gestörten Blutgerinnung kommen. Im folgenden Experiment wurde die Auswirkung der Ischämie-Reperfusionsschädigung in *Vwf*-defizienten Mäusen auf die Bildung der NET-Strukturen wie auch das Adhäsionsverhalten der Leukozyten untersucht.

Im pre-ischämischen Zustand, vor der Okklusion der *Arteria mesenterica cranialis*, konnten in den Kontrolltieren (*Vwf*^{+/+}) verglichen zu den *Vwf*-defizienten Mäusen eine vermehrte Adhäsion der Leukozyten detektiert werden (**Abbildung 52A**). Nach der einstündigen Ischämie kam es in der Kontrollgruppe zur Zunahme der Zahl an adhärierenden Leukozyten an das Endothel (**Abbildung 52B**). Verglichen zu den

Kontrolltieren kam es in den *Vwf*-defizienten Mäusen (Pre- und Post-Ischämie) zu keiner wesentlichen Änderung der adhärenierenden Leukozytenzahl am Endothel.

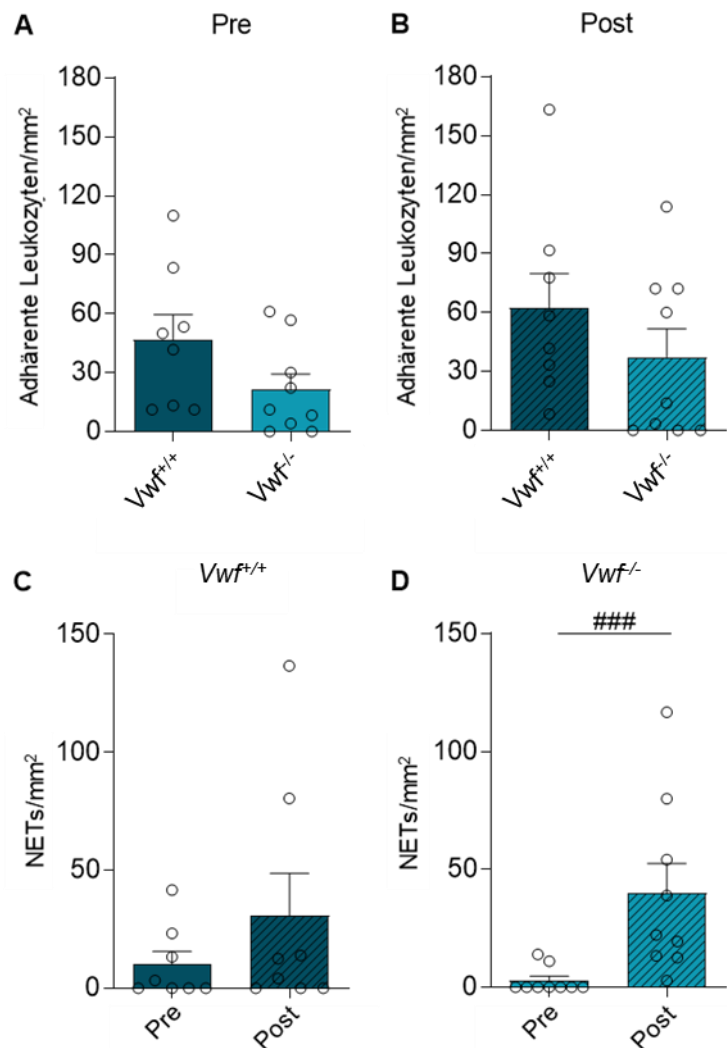


Abbildung 52: Einfluss des VWF auf die in vivo NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell. **A** Anzahl der adhärenierenden Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden *Vwf*^{+/+} (n=8) mit *Vwf*^{-/-} Mäusen (n=9). **B** Anzahl der adhärenierenden Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden *Vwf*^{+/+} (n=8) mit *Vwf*^{-/-} Mäusen (n=9). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in *Vwf*^{+/+} Mäusen (n=8). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in *Vwf*^{-/-} Mäusen (n=9). Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, ###p<0.001.

In Bezug auf die Bildung der NET-Strukturen, wurden in der VWF-Kontrollgruppe im post-ischämischen verglichen zum pre-ischämischen Zustand mehr *in vivo* NETs

detektiert (**Abbildung 52C**). Der gleiche Effekt, die vermehrte NET-Bildung, konnte auch in den *Vwf*-defizienten Tieren beobachtet werden. Hier kam es nach der einstündigen Ischämie zu einer vermehrten *in vivo* NETose (**Abbildung 52D**).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass es in Mäusen in denen der VWF aktiv ist, zu einer Zunahme adhärierender Leukozyten an das Endothel der Venolen kommt. Somit hatte der VWF einen Einfluss auf die Rekrutierung bzw. Adhäsion der Leukozyten.^{249, 250} Da es in der Kontrollgruppe sowie in den *Vwf*-defizienten Mäusen nach der mesenterialen Ischämie-Reperfusion zur Bildung der NET-Strukturen kam, scheint in diesem Experiment die Expression des VWF keinen wesentlichen Einfluss auf die *in vivo* NETose zu haben.

7.2.6 Wirkung der Antibiotika-Behandlung auf die *in vivo* NET-Bildung

Wie bereits im *in vitro* Vorversuch (**Abbildung 41**), wurde auch im *in vivo* Mausmodell der Einfluss einer Antibiotika-Behandlung (Dezimierung der Darmbakterien) auf die Bildung der NETs nach einer mesenterialen Ischämie genauer untersucht. Im ersten Versuchsabschnitt wurden CONV-R WT Mäuse mit einem Antibiotika-Cocktail bestehend aus Ampicillin, Neomycin, Vancomycin und Metranidazol für 14 Tage über das Trinkwasser behandelt. Das Adhäsionsverhalten der Leukozyten und die *in vivo* NET-Bildung wurden vor und nach der einstündigen Ischämie mittels der Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie dokumentiert.

Die Zahl an adhärenenten Leukozyten war in den CONV-R WT Mäusen verglichen zu den Antibiotika-behandelten Tieren vor der Arterienokklusion signifikant erhöht (**Abbildung 53A**). Nach der einstündigen Ischämie nahm die Anzahl an adhärierenden Leukozyten in den CONV-R Kontrolltieren weiter zu. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied in der Zelladhäsion beobachtet werden (**Abbildung 53B**).

Im Fall der *in vivo* NETose führte die durch Antibiotika hervorgerufene Depletion der Darmbakterien vor der Ischämie wie auch nach einstündiger Ischämie zu einer signifikant vermehrten NET-Bildung. In den behandelten CONV-R WT Mäusen wurden Pre- wie auch Post-Ischämie mehr NETs bzw. NET-positive Leukozyten detektiert (**Abbildung 53C** und **Abbildung 53D**).

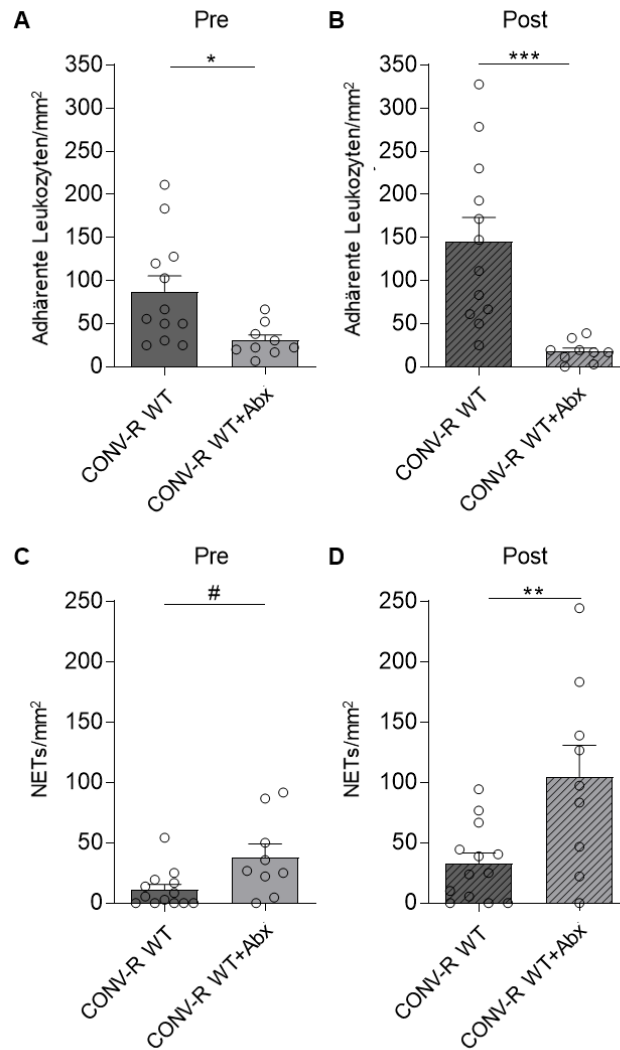


Abbildung 53: Untersuchung der Antibiotika-abhängigen NETose und Leukozytenadhäsion im in vivo Mausmodell der Ischämie-Reperfusionsschädigung. A Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=9). **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=9). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=9). **D** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden CONV-R WT (n=12) mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=9). CONV-R WT Mäuse wurden für 14 Tage mit einem Antibiotika-Cocktail (Abx) über das Trinkwasser behandelt. Antibiotika-Cocktail: 1 g/L Ampicillin, 1 g/L Neomycin, 0,5 g/L Vancomycin und 1 g/L Metronidazol. Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Student's-t-Test und den Mann-Whitney-Test, * / #p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Anhand der Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass die Dezimierung der Darmbakterien in CONV-R WT Mäusen zu einem verminderten Adhäsionsverhalten

der Leukozyten aber einer vermehrten *in vivo* NETose führte. Somit schienen die Leukozyten der Abx-behandelten Tiere, wie schon in den GF WT Mäusen, sensitiver auf das Verletzungsmodell zu reagieren.

Im zweiten Versuchsabschnitt der Antibiotika-Behandlung wurden die mit Altered Schaedler Flora (ASF) kolonisierten Mäuse (C57BL/6J Mäuse mit ASF kolonisiert) mit einem Antibiotika-Cocktail bestehend aus Ampicillin und Neomycin für 7 Tage behandelt. Durch die Behandlung von Ampicillin in Kombination mit Neomycin kam es zur Veränderung der Darmmikrobiota.^{251, 252} Auch in diesem Versuchsteil sollte in der mesenterialen Ischämie-Reperfusion der Einfluss einer Antibiotikabehandlung in Mäusen mit klar definierten Mikroorganismen (gnotobiotisches Mausmodell) auf die Leukozytenadhäsion und die *in vivo* NETose untersucht werden.

Vor der Ischämie wurde kein Unterschied in der Anzahl adhärenter Leukozyten zwischen GF WT und den mit Antibiotika-behandelten ASF Mäusen beobachtet (**Abbildung 54A**). Zwar nahm post-ischämisch die Anzahl an adhärenenden Leukozyten zu, jedoch konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl beobachtet werden (**Abbildung 54B**). Sowohl in den keimfreien Kontrolltieren (**Abbildung 54C**) als auch in den mit Antibiotika-behandelten Mäusen (**Abbildung 54D**) konnte nach der mesenterialen Ischämie signifikant mehr NETose in den Venolen detektiert werden.

Durch die Behandlung mit dem Antibiotika-Cocktail konnte in den ASF Mäusen zum einen eine verminderte Anzahl an adhärenenden Leukozyten am mikrovaskulären Endothel und zum anderen nach einstündiger Ischämie ein signifikanter Anstieg der detektierten NET-Strukturen beobachtet werden. Somit kann festgehalten werden, dass die Depletion der Bakterien in den mit ASF-kolonisierten Tieren funktioniert hatte. Mit Abx-behandelte Mäuse wiesen ein ähnliches Zellverhalten auf, wie die keimfreie Kontrollgruppe.

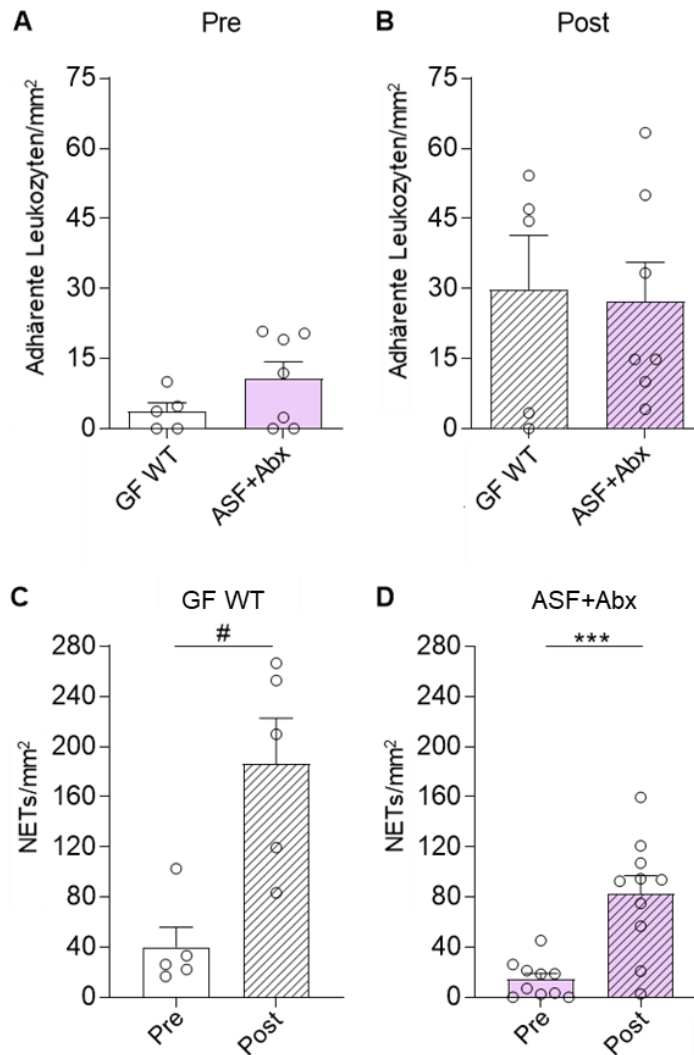


Abbildung 54: Wirkung der Dezimierung der Darmbakterien in ASF Tieren auf die in vivo NETose. **A** Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit Antibiotika-behandelten ASF Mäusen (n=7). **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit Antibiotika-behandelten ASF Mäusen (n=7). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT Mäusen (n=5). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in Antibiotika-behandelten ASF Mäusen (n=10). ASF Mäuse wurden für 7 Tage mit einem Antibiotika-Cocktail (Abx) über das Trinkwasser behandelt. Antibiotika-Cocktail: 1 g/L Ampicillin und 1 g/L Neomycin. Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Student's-t-Test und den Mann-Whitney-Test, #p<0.05, ***p<0.001.

7.2.7 Rolle der Endotoxin-Toleranz im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Endotoxin-Toleranz auf das Adhäsionsverhalten von Leukozyten und der *in vivo* NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell wurden keimfreie Mäuse für 7 Tage mit LPS (vom *E. coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4) über das Trinkwasser (ad libitum) behandelt. Das Zellverhalten wurde mittels Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie dokumentiert und ausgewertet.

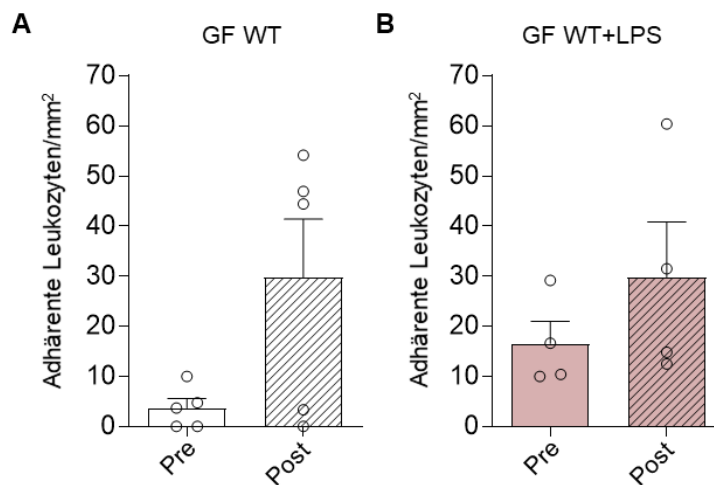


Abbildung 55: Untersuchung der Endotoxin-Toleranz auf das Verhalten adhärennder Leukozyten im *in vivo* Modell. **A** Anzahl der adhärennder Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT Mäusen (n=5). **B** Anzahl adhärennder Leukozyten vor der Ischämie (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in LPS-behandelten GF WT Mäusen (n=4). Das LPS vom *E. coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4 (Invivogen) wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL für 7 Tage über das Trinkwasser verabreicht. Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt.

In der keimfreien Kontrollgruppe kam es verglichen zum pre-ischämischen Zustand nach der einstündigen Ischämie (Post) zu einer vermehrten Adhäsion der Leukozyten an das Endothel (**Abbildung 55A**). Auch in den mit LPS-behandelten keimfreien Mäusen konnte nach Ischämie eine vermehrte Anzahl an adhärennder Leukozyten detektiert werden (**Abbildung 55B**). Allerdings ist festzustellen, dass post-ischämisch sowohl die Anzahl adhärennder Leukozyten in den GF WT wie auch in den LPS-behandelten Tieren annähernd gleich war. Somit veränderte sich durch die Endotoxin-Toleranz bzw. durch die Behandlung mit dem LPS über 7 Tage das Adhäsionsverhalten der Leukozyten nicht wesentlich.

Im Folgenden wurde die *in vivo* NETose in Abhängigkeit zur Endotoxin-Toleranz untersucht und bewertet.

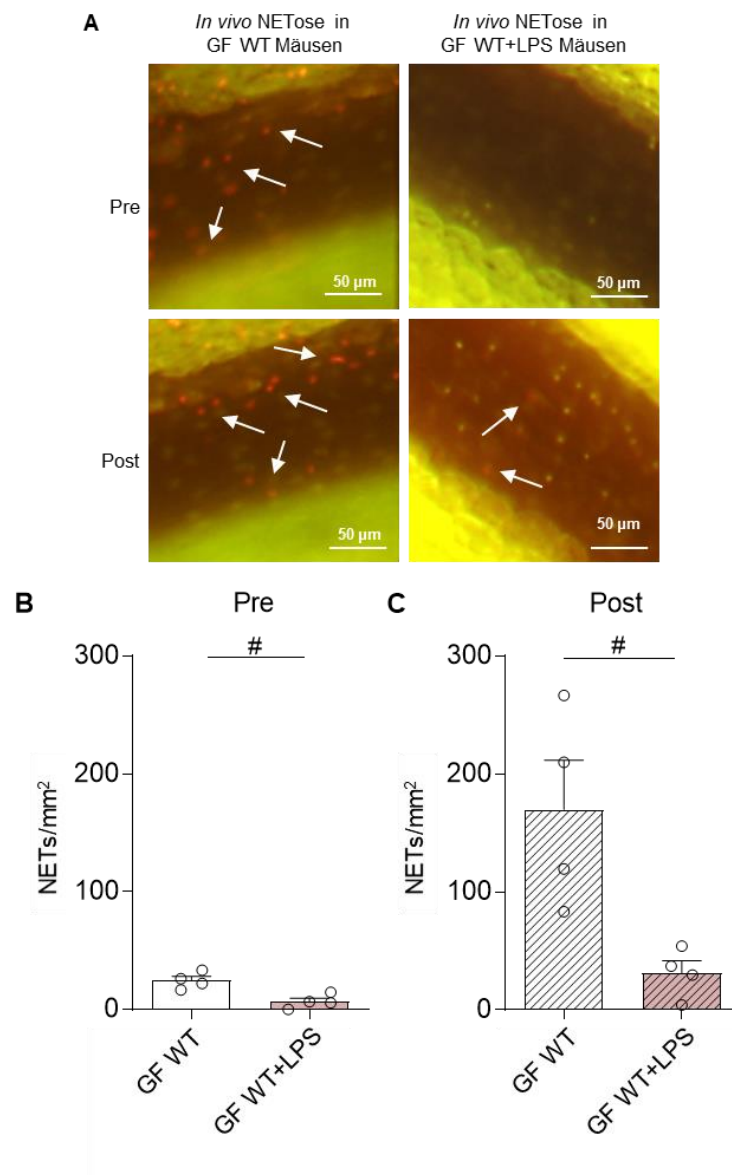


Abbildung 56: Untersuchung der Endotoxin-Toleranz auf die *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell. **A** Repräsentative Darstellung der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT und LPS-behandelten GF WT Mäusen. Adhärenente Leukozyten wurden mit Acridinorange (grün) und NETs mit SYTOX Orange (rot) angefärbt und gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 50 μ m, NETs wurden repräsentativ mit weißen Pfeilen markiert. **B** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=4) mit LPS-behandelten GF WT Mäusen (n=4). **C** Anzahl der adhärenente Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=4) mit LPS-behandelten GF WT Mäusen (n=4). Das LPS vom *E.coli* Serotyp *E.coli* 0111:B4 (Invivogen) wurde in einer Konzentration von 100 μ g/mL für 7 Tage über das Trinkwasser

verabreicht. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Mann-Whitney-Test, $\#p < 0.05$.

Vor der Ischämie wurde in den GF WT Mäusen im Vergleich zu LPS-behandelten GF WT Mäusen eine signifikant erhöhte NETose beobachtet (**Abbildung 56A** und **Abbildung 56B**). Dieser Effekt wurde nach der einstündigen Ischämie nochmals verstärkt. In den keimfreien Kontrolltieren wurden signifikant mehr NET-Strukturen detektiert (**Abbildung 56A** und **Abbildung 56C**). Somit lässt sich schließen, dass bereits nach einer Woche LPS-Behandlung eine Endotoxin-Toleranz erreicht werden konnte, da durch das Verletzungsmodell keine vermehrte NET-Bildung beobachtet werden konnte. Das Ergebnis des *in vitro* Experiments (verminderte *in vitro* NETose in LPS-behandelten Mäusen, **Abbildung 42**) wurde durch das *in vivo* Experiment bestätigt.

7.2.8 Wirkung der Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota, sowie der Monokolonisierung auf die *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell

Um zu untersuchen, inwiefern eine Kolonisierung keimfreier Mäuse sich auf die Bildung der NETs und auf das Adhäsionsverhalten der Leukozyten auswirkt, wurden ehemals keimfreie Mäuse über eine Schlundsonde mit einer komplexen Darmmikrobiota kolonisiert. Die Besiedelung des Darms erfolgte für 14 Tage. In diesem Zusammenhang wurden keimfreie WT Mäuse mit konventionalisierten Mäusen (CONV-D, ehemals keimfreie Mäuse) verglichen.

In den konventionalisierten Tieren konnte vor der Okklusion der *Arteria mesenterica cranialis* eine erhöhte Anzahl an adhätierenden Leukozyten verglichen zu den GF WT Mäusen detektiert werden (**Abbildung 57A**). Auch nach einstündiger Ischämie wurden in den CONV-D Mäusen tendenziell mehr adhärente Leukozyten am Endothel gezählt (**Abbildung 57B**).

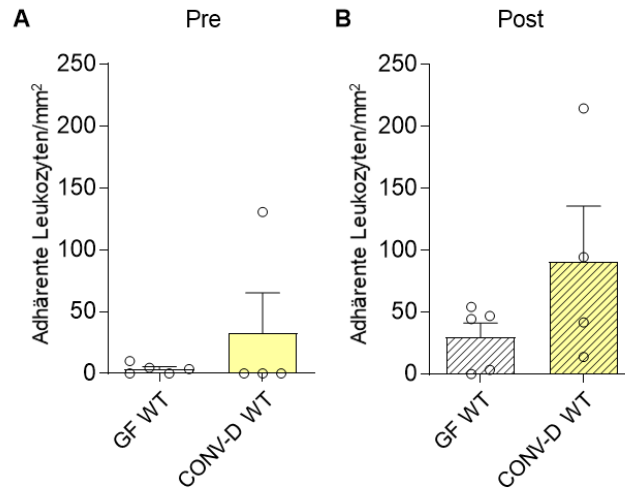


Abbildung 57: Untersuchung der Leukozytenadhäsion konventionalisierter Mäuse im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell. A Anzahl der adhärenen Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-D WT Mäusen (n=4). **B** Anzahl der adhärenen Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-D WT Mäusen (n=4). Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Im Fall der *in vivo* NETose kam es in den konventionalisierten Mäusen zu einer signifikant verringerten NET-Bildung in den mesenterialen Venolen (**Abbildung 58A** und **Abbildung 58B**). Auch nach der einstündigen Ischämie wurden signifikant mehr NET-Strukturen in den keimfreien Kontrolltieren detektiert (**Abbildung 58A** und **Abbildung 58C**). In den konventionalisierten Mäusen wurden post-ischämisch nur minimal mehr NETs im Vergleich zum pre-ischämischen Zustand gezählt.

Somit kam es bei einer Kolonisierung mit komplexer Darmmikrobiota zu einer vermehrten Anzahl an adhärenen Leukozyten ans Endothel aber einer signifikant verminderten *in vivo* NETose. Dieser Effekt, der reduzierten NET-Bildung wurde bereits im *in vitro* Experiment beobachtet und konnte im *in vivo* Modell der mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschädigung bestätigt werden (**Abbildung 44**).

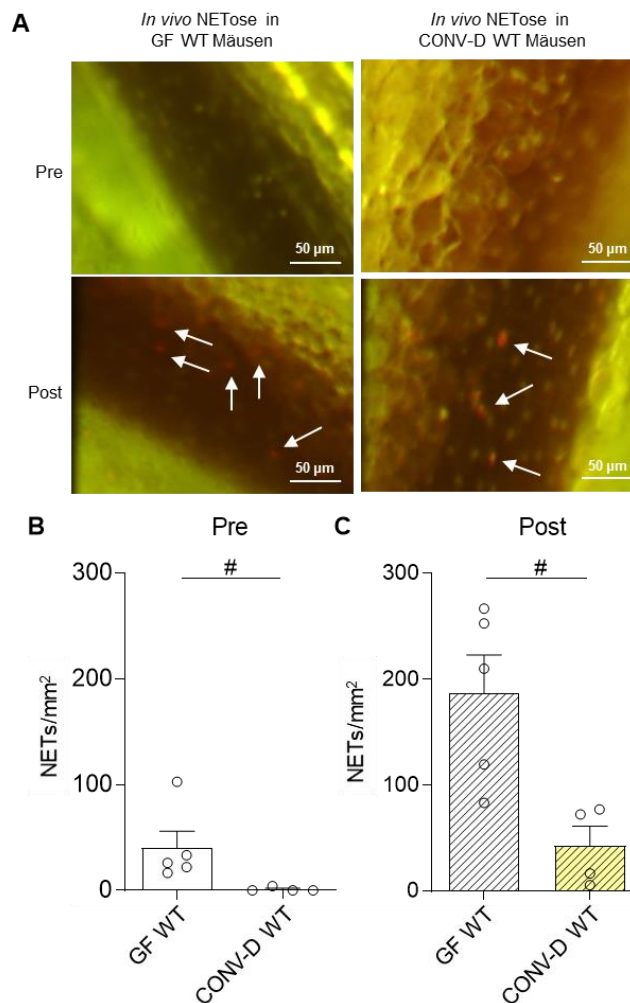


Abbildung 58: Untersuchung der Abhängigkeit der Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota auf die *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell. A Repräsentative Darstellung der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT und CONV-D WT Mäusen. Adhärenente Leukozyten wurden mit Acridinorange (grün) und NETs mit SYTOX Orange (rot) angefärbt und gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 50 μ m, NETs wurden repräsentativ mit weißen Pfeilen markiert. **B** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-D WT Mäusen (n=4). **C** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit CONV-D WT Mäusen (n=4). Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Mann-Whitney-Test, #p<0.05.

Durch Monokolonisierungsexperimente, durch die Kolonisierung mit nur einem Bakterienstamm, sollte die Wirkung einzelner Bakterienarten auf die Zelladhäsion sowie die *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell untersucht werden.

Zur Untersuchung der Wirkung einer gram-negativen Bakterienart auf das Adhäsionsverhalten der Leukozyten und der *in vivo* NETose, wurden keimfreie Mäuse mittels Schlundsonde mit dem fakultativ-anaeroben Bakterienstamm *E. coli* JP313 kolonisiert. *E. coli* ist sowohl im Dünndarm wie auch im Kolon zu finden. Die Besiedelung des Darms beläuft sich auf 14 Tage. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die kolonisierten Mäuse im Isolator gehalten. Zur Überprüfung des Kolonisierungsstatus wurden Kotproben von den monokolonisierten Tieren gesammelt, die Bakterien ausplattiert und die Zahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt.²⁵³ Die Bestimmung des Kolonisierungsstatus wurde von [REDACTED] durchgeführt.

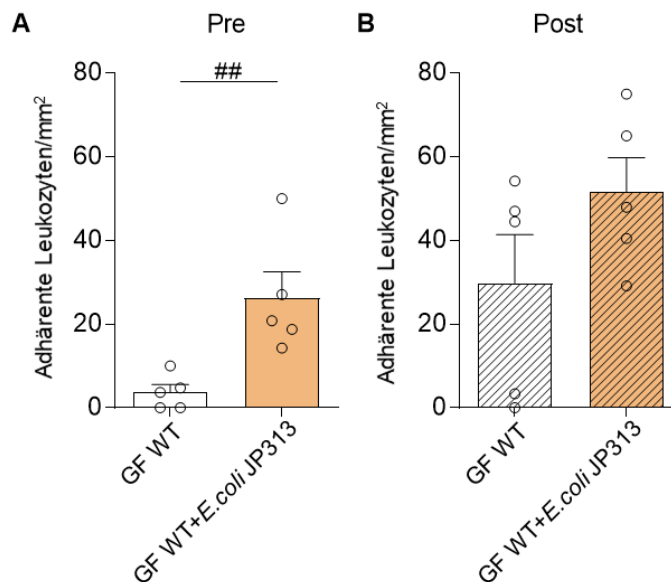


Abbildung 59: Untersuchung des Adhäsionsverhalten der Leukozyten *E. coli* monokolonisierter Mäuse im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell. **A** Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *E.coli* JP313 monokolonisierten GF WT Mäusen (n=5). **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *E.coli* JP313 monokolonisierten GF WT Mäusen (n=5). Die Monokolonisierung dauerte 14 Tage. Pro Tier wurden eine *E.coli*-Bakteriensuspension mit einer OD_{600nm} von 0,6 appliziert. Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, ##p<0.01.

Die mit *E. coli* JP313 monokolonisierten Tiere wiesen verglichen zu den GF WT Mäusen im pre-ischämischen Zustand eine signifikant erhöhte Adhäsion der Leukozyten am Endothel auf (**Abbildung 59A**). Nach der einstündigen Ischämie nahm

die Zahl der adhärierenden Leukozyten in den monokolonisierten Mäusen weiter zu (**Abbildung 59B**). Während in den monokolonisierten GF WT Mäusen eine vermehrte Anzahl an adhärierenden Leukozyten detektiert werden konnten, kam es nach der Ischämie zu einer tendenziell reduzierten *in vivo* NETose (**Abbildung 60A** und **Abbildung 60C**), obwohl vor der Ischämie mehr NETs in den monokolonisierten Tieren detektiert werden konnten (**Abbildung 60A** und **Abbildung 60B**).

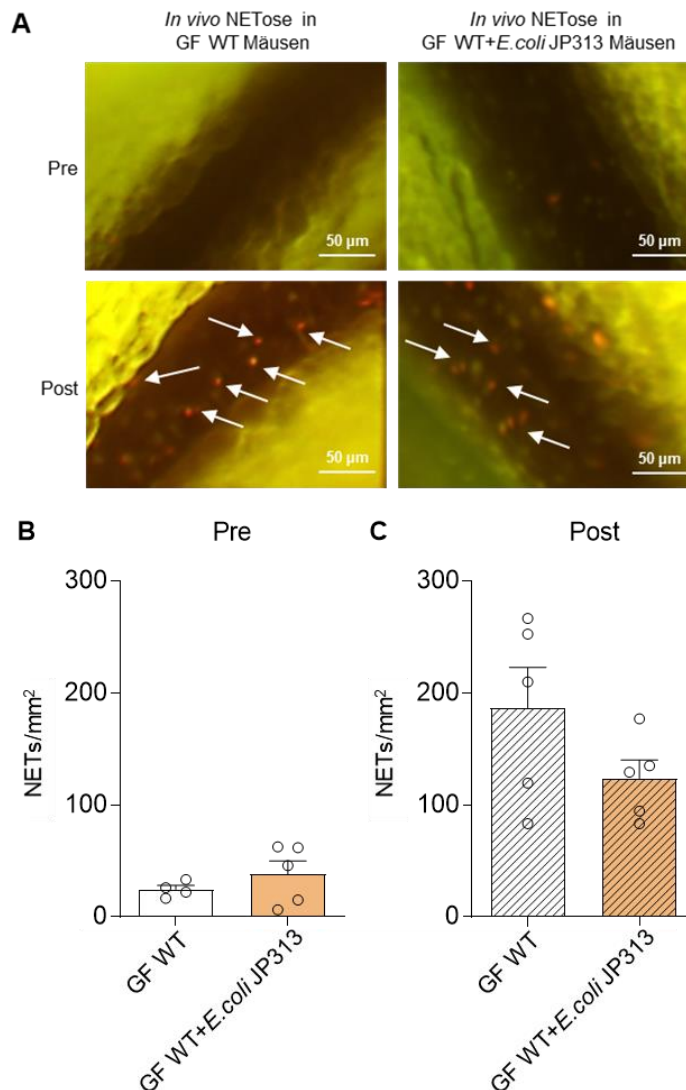


Abbildung 60: Untersuchung der *in vivo* NETose in mit *E. coli* JP313 monokolonisierten Mäusen im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell. A. Repräsentative Darstellung der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor (Pre) und nach einstündiger Ischämie (Post) in GF WT und *E.coli* JP313 monokolonisierten GF WT Mäusen. Adhärente Leukozyten wurden mit Acridinorange (grün) und NETs mit SYTOX Orange (rot) angefärbt und gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 50 μ m, NETs wurden repräsentativ mit weißen Pfeilen markiert. **B** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *E.coli*

JP313 monokolonisierten GF WT Mäusen (n=5). **C** Anzahl NETs bzw. NET-positiven Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *E.coli* JP313 monokolonisierten GF WT Mäusen (n=5). Die Monokolonisierung dauerte 14 Tage. Pro Tier wurden eine *E.coli*-Bakteriensuspension mit einer OD_{600nm} von 0,6 appliziert. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Somit schien es, dass bereits die Kolonisierung mit einem gram-negativen Bakterium die Adhäsion der Leukozyten verstärken und die *in vivo* NETose reduzieren konnte.

Zusätzlich wurden in einem weiteren Monokolonisierungsexperiment keimfreie Mäuse mit einem fakultativ anaeroben gram-positiven Bakterium der kommensalen Darmflora kolonisiert. Das hier verwendete *Bacillus subtilis* PY79, ist eine prototrophe Variante, welche aus dem *Bacillus subtilis* Wildtyp Stamm 168 kultiviert wurde. Zur anschließenden Überprüfung des Kolonisierungsstatus wurden Kotproben von den monokolonisierten Tieren gesammelt, die Bakterien ausplattiert und die Zahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt.²⁵³ Die Bestimmung des Kolonisierungsstatus wurde von [REDACTED] durchgeführt.

Die Monokolonisierung der keimfreien Mäuse mit *Bacillus subtilis* YP79 führte präischämisch zu einer signifikant vermehrten Adhäsion der Leukozyten an das Endothel (**Abbildung 61A**). Nach der einstündigen Ischämie, im Post-Zustand, nahm die Zahl der adhärierenden Leukozyten in den mit *B.subtilis* YP79 monokolonisierten Mäusen im Vergleich zu den keimfreien Kontrollgruppen zu (**Abbildung 61B**). Wie schon bei den mit *E. coli* JP313 kolonisierten Mäusen zu beobachten war, kam es in den mit *B. subtilis* YP79 monokolonisierten Tieren sowohl vor (**Abbildung 61C**) wie auch nach der Ischämie (**Abbildung 61D**) zu einer signifikanten Reduktion der *in vivo* NET-Bildung. Auch hier war die Kolonisierung mit einem einzelnen Bakterienstamm ausreichend, um eine verbesserte Adhäsion der Leukozyten und eine Reduktion der *in vivo* NET-Bildung zu bewirken.

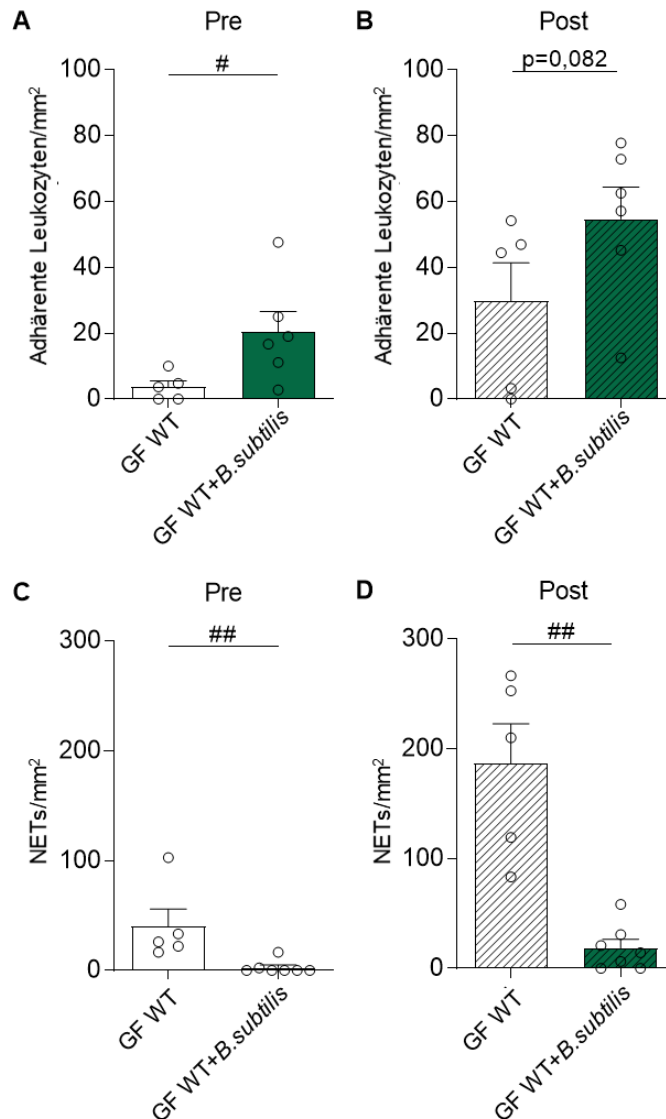


Abbildung 61: Untersuchung der Monokolonisierung mit *B.subtilis* auf die in vivo NETose und das Adhäsionsverhalten der Leukozyten im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell. A Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *B. subtilis* monokolonisierten GF WT Mäusen (n=6). **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *B.subtilis* monokolonisierten GF WT Mäusen (n=6). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *B.subtilis* monokolonisierten GF WT Mäusen (n=6). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit *B. subtilis* monokolonisierten GF WT Mäusen (n=6). Keimfreie Mäuse wurden mit dem *Bacillus subtilis* YP79, einer Variante des *Bacillus subtilis* Wildtypstamms 168, monokolonisiert. Die Monokolonisierung dauerte 14 Tage. Pro Versuchstier wurden 1.33×10^8 *Bacillus subtilis* Sporen in 200 μ L PBS gelöst und appliziert. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Mann-Whitney-Test, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

7.2.9 Altered Schaedler Flora (ASF) in der *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell

Um den Einfluss einer standardisierten Darmmikrobiota^{219, 220} auf die *in vivo* NETose und auf das Adhäsionsverhalten von Leukozyten im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell zu untersuchen, wurde die Altered Schaedler Flora von kommerziell erhältlichen C3H/HeNTac Mäusen isoliert und auf keimfreie C57BL/6J Mäuse übertragen.²²¹

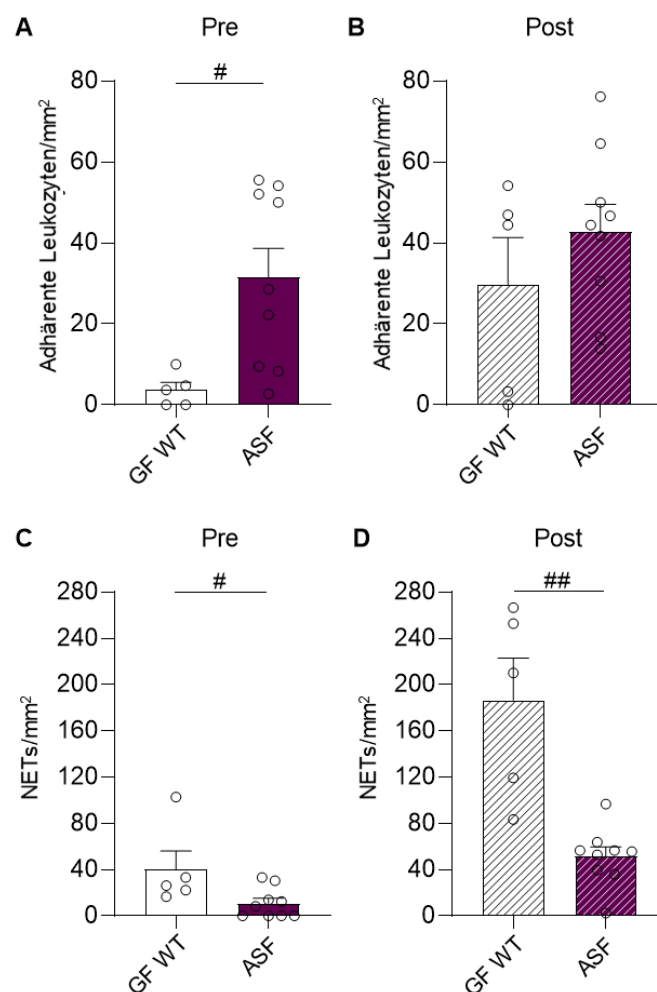


Abbildung 62: Untersuchung der Leukozytenadhäsion und der *in vivo* NETose in Altered Schaedler Flora (ASF) Tieren im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell. **A** Anzahl der adhärenenten Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit ASF Mäusen (n=9). **B** Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit ASF Mäusen (n=9). **C** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven Leukozyten vor der Ischämie (Pre). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit ASF Mäusen (n=9). **D** Anzahl der NETs bzw. NET-positiven

Leukozyten nach einstündiger Ischämie (Post). Verglichen wurden GF WT (n=5) mit ASF Mäusen (n=9). Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Mann-Whitney-Test, #p<0.05, ##p<0.01.

In ASF-kolonisierten Mäusen wurde verglichen zur keimfreien Kontrollgruppe sowohl vor der Ischämie (**Abbildung 62A**) als auch nach der einstündigen Ischämie (**Abbildung 62B**) eine verstärkte Adhäsion der Leukozyten ans Endothel beobachtet. Verglichen dazu wurden in den GF WT Mäusen vor (**Abbildung 62C**) und auch nach der Ischämie (**Abbildung 62D**) eine signifikant vermehrte Bildung von NETs detektiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Mäuse mit einer standardisierten Darmmikrobiota, wie dem minimalen mikrobiellen Konsortium Altered Schaedler Flora, ebenfalls eine Verminderung der *in vivo* NETose aufweisen. Wie schon in den Kolonisierungs- (CONV-D) und den Monokolonisierungsexperimenten (*E. coli* JP 313 und *B.subtilis* YP79) beobachtet, kam es auch in den ASF Mäusen zu einer vermehrten Adhäsion der Leukozyten in den mesenterialen Venolen.

7.3 Expression von TLR4 und L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse

Die Untersuchung der Expression des TLR4-Rezeptors und des L-Selektins erfolgte über die Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die Zellen aus dem Knochenmark und dem Blut (nach Lyse der Erythrozyten) mit Antikörpern markiert. Die für diese Versuche wichtigen Antikörper sind der CD284-PE, der den TLR4 auf den neutrophilen Granulozyten markiert und der CD62L-FITC. Dieser Antikörper markiert spezifisch das L-Selektin, welches ein Adhäsionsmolekül auf den neutrophilen Granulozyten ist und im Anfangsstadium der Leukozytenadhäsion an das Endothel maßgeblich beteiligt ist.²⁵⁴

Im Folgenden wird schematisch am Beispiel von Zellen des Knochenmarks, die Gating-Strategie erläutert und die dazugehörigen Dot Plots dargestellt (**Abbildung 63**). Im ersten Diagramm (A) wurden die Streulichtparameter, Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitenstreulicht (SSC) gegeneinander aufgetragen. Zur Markierung der Zellpopulation wurde ein entsprechend großes Gate gelegt, das eine definierte Region einrahmt. In diesem Bereich sind die Zellen des Knochenmarks zu finden, dieser

Bereich beinhaltet beispielsweise neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Zelltrümmer wurden aus dem Gate ausgeschlossen. Im nächsten Schritt, Diagramm B, wurde APC gegen DAPI aufgetragen. APC beinhaltete die Antikörper des APC-Cocktails (**Tabelle 15**), dieser Cocktail wurde verwendet, um die Lymphozyten, Monozyten sowie die neutrophilen Granulozyten im Knochenmark und Blut (nach Lyse der Erythrozyten) zu markieren. Dagegen wurde DAPI als Marker für die toten Zellen eingesetzt. Demzufolge wurde in Diagramm B die Vitalität der Zellen, somit die Anzahl an lebenden Zellen bestimmt.

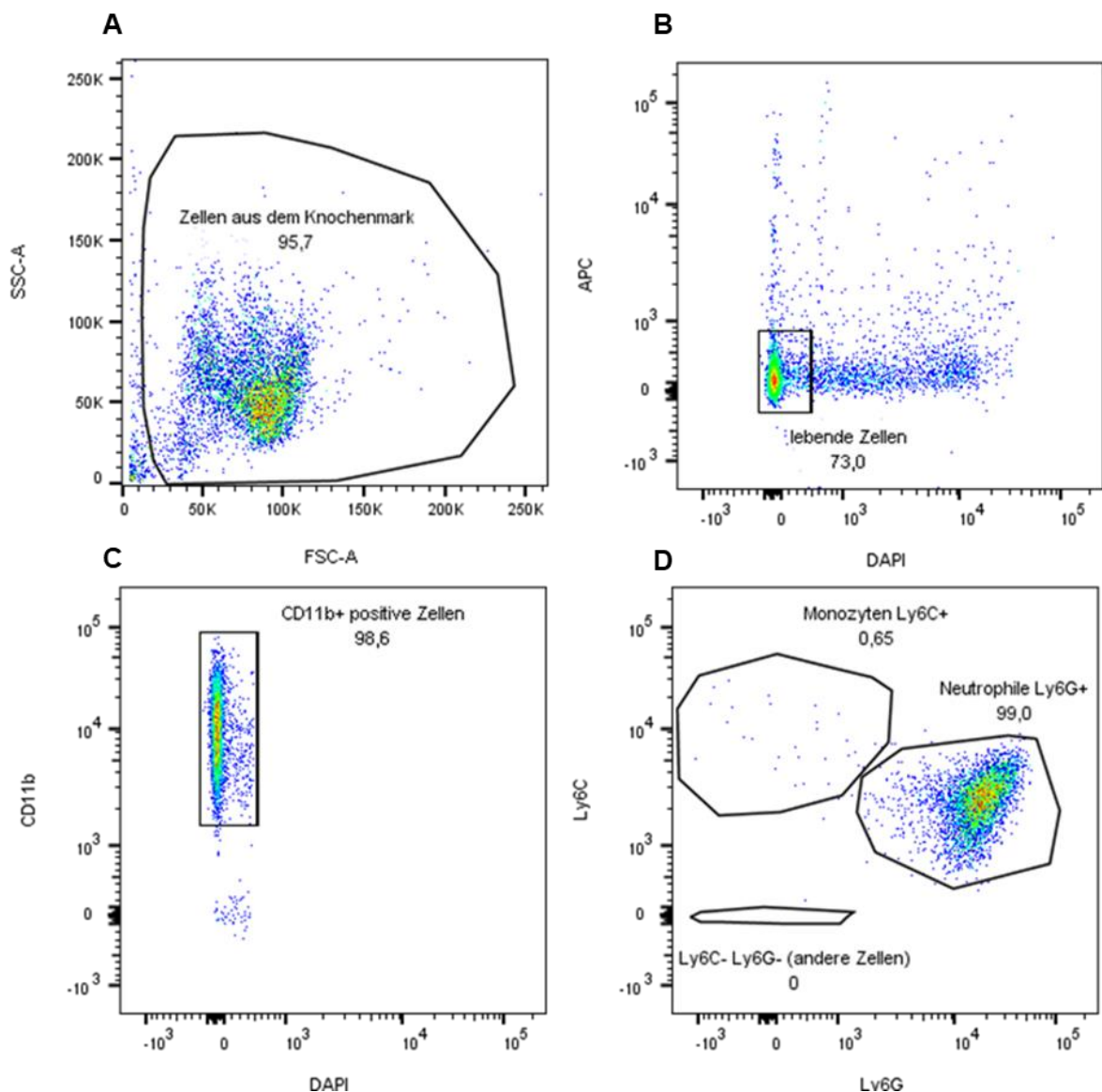


Abbildung 63: Darstellung der Dot Plots und der Gates. Die Vorbereitung des Gating-Schemas erfolgte durch die Unterstützung von [REDACTED].

Ausgehend von den lebenden Zellen war der nächste Schritt die Identifizierung der CD11b-positiven Zellen. Im Diagramm C wurde CD11b gegen DAPI aufgetragen. CD11b reguliert die Adhäsion von Leukozyten, ist an der Immunantwort beteiligt und wird auf den Oberflächen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Um festzustellen, wie hoch der Anteil an neutrophilen Granulozyten in der CD11b-positiven Zellpopulation war, wurde die Zellpopulation in drei Subpopulationen unterteilt. Im letzten Diagramm (D) wurde Ly6C gegen Ly6G aufgetragen. Mittels der Gating-Strategie konnten die Gates den drei Populationen Monozyten, neutrophile Granulozyten und andere Zellen, zugeteilt werden. Hierbei bildeten anteilig die neutrophilen Granulozyten (Ly6G-positive Zellen) die größte Zellpopulation. Anhand des Gates für die neutrophilen Granulozyten konnte anschließend die Zahl an CD284-positiven und CD62L-positiven Zellen bestimmt werden.

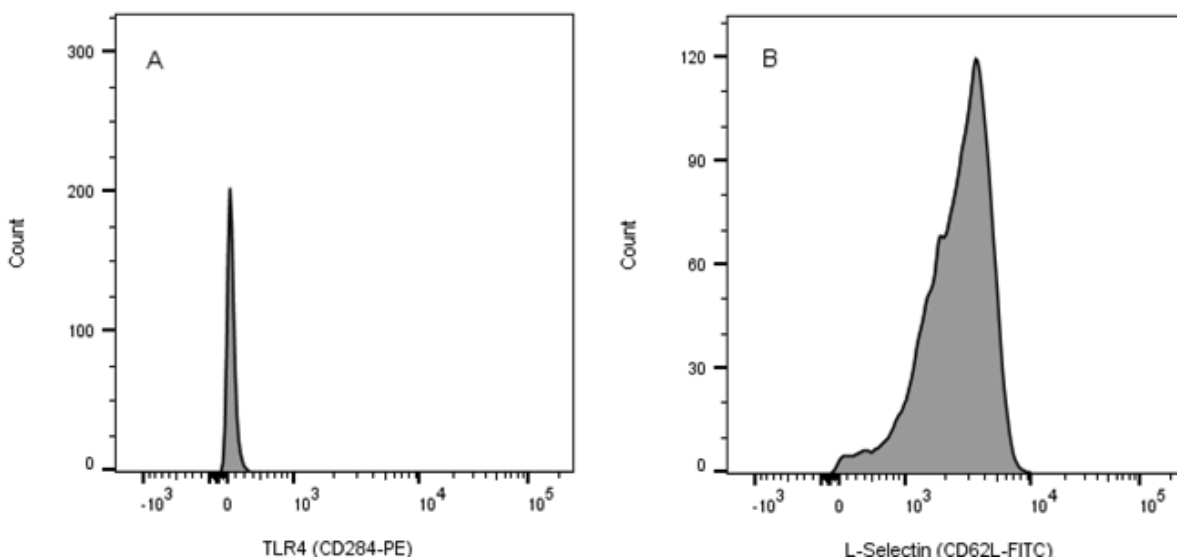


Abbildung 64: Darstellung der Histogramme der TLR4-positiven und L-Selektin-positiven Zellpopulation.

In **Abbildung 64** sind Histogramme der TLR4- und L-Selektin positiven Zellpopulationen dargestellt. In den Diagrammen A und B der **Abbildung 64** wurde die Intensität der Messung gegen die Zellzahl aufgetragen. Bei der Zellfärbung mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der Bindungsstellen.

7.3.1 Bestimmung der TLR4- und L-Selektin-Expression auf neutrophilen Granulozyten von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen

Im folgenden Abschnitt wurde die Oberflächenexpression des TLR4-Rezeptors und des Zelladhäsionsmoleküls L-Selektin auf Knochenmark-residenten neutrophilen Granulozyten untersucht.

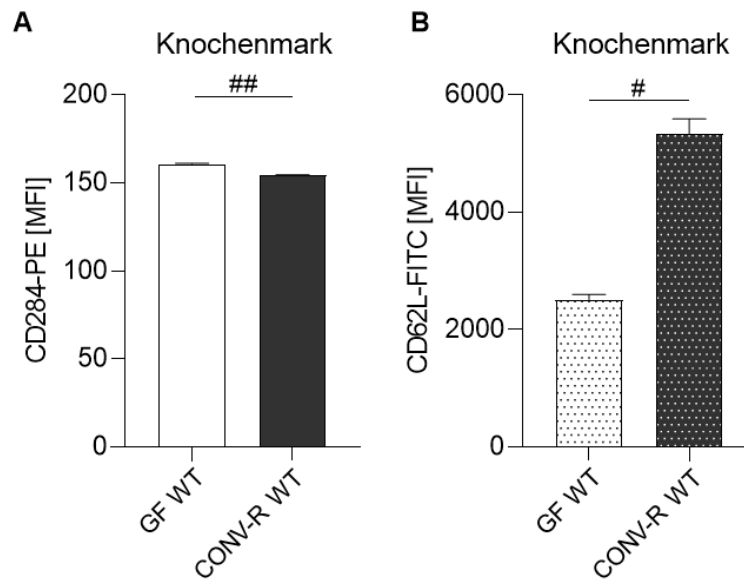


Abbildung 65: Mikrobiota-abhängige Regulation der Oberflächenexpression von TLR4- und L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten. **A** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von GF WT (n=6) und CONV-R WT Mäusen (n=6). **B** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD62L-FITC positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von GF WT (n=6) und CONV-R WT Mäusen (n=6). Zur Bestimmung der TLR4- und L-Selektin-Expression wurde eine unabhängige Messung durchgeführt. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Mann-Whitney-Test, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

Zur Bestimmung der Expression des TLR4-Rezeptors sowie des L-Selektins wurden die neutrophilen Granulozyten aus einer Knochenmark-Zellsuspension über die Magnetisch-aktivierte Zell Separation (MACS) isoliert. Mittels der Durchflusszytometrie wurden die Fluoreszenzsignale detektiert. Hierbei konnte auf den neutrophilen Granulozyten der keimfreien Mäuse ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal des TLR4 Rezeptors detektiert werden (**Abbildung 65A**). Dagegen wurden in den CONV-R WT Tieren ein signifikant stärkeres Signal des Adhäsionsmoleküls L-Selektin

gemessen (**Abbildung 65B**). Somit wurde auf neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse mehr TLR4 exprimiert, während auf den Neutrophilen der CONV-R Tiere signifikant mehr L-Selektin detektiert wurde.

7.3.2 Expression des TLR4 und L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten Antibiotika-behandelter CONV-R WT Mäuse

Zur Untersuchung der Abhängigkeit einer Antibiotikabehandlung (Dezimierung der Darmmikrobiota) auf die Expression des TLR4-Rezeptors und des L-Selektins wurden CONV-R WT Mäuse für 14 Tage mit einem Antibiotika-Cocktail, bestehend aus Ampicillin 1 g/L, Neomycin 1 g/L, Vancomycin 0,5 g/L und Metronidazol 1 g/L, über das Trinkwasser behandelt. Verglichen wurde die Oberflächenexpression des TLR4 und L-Selektins auf neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und Vollblut.

In Antibiotika-behandelten Mäusen konnte auf den neutrophilen Granulozyten des Knochenmarks ein signifikant stärkeres TLR4-abhängiges Fluoreszenzsignal detektiert werden (**Abbildung 66A**). Dagegen wurde auf den neutrophilen Granulozyten (Knochenmark) der CONV-R Mäuse mehr L-Selektin detektiert (**Abbildung 66B**). Vergleichbar zu Knochenmarksneutrophilen wurde auch auf den neutrophilen Granulozyten des Vollbluts Antibiotika-behandelter Mäuse ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal des TLR4 Rezeptors gemessen (**Abbildung 66C**). Die Expression des Adhäsionsmoleküls L-Selektin war in den CONV-R Kontrolltieren signifikant erhöht (**Abbildung 66D**). Anhand der Ergebnisse wurde festgestellt, dass kohärent zum keimfreien Mausmodell auch in den Antibiotika-behandelten Tieren die Expression des TLR4-Rezeptors auf den neutrophilen Granulozyten deutlich stärker war.

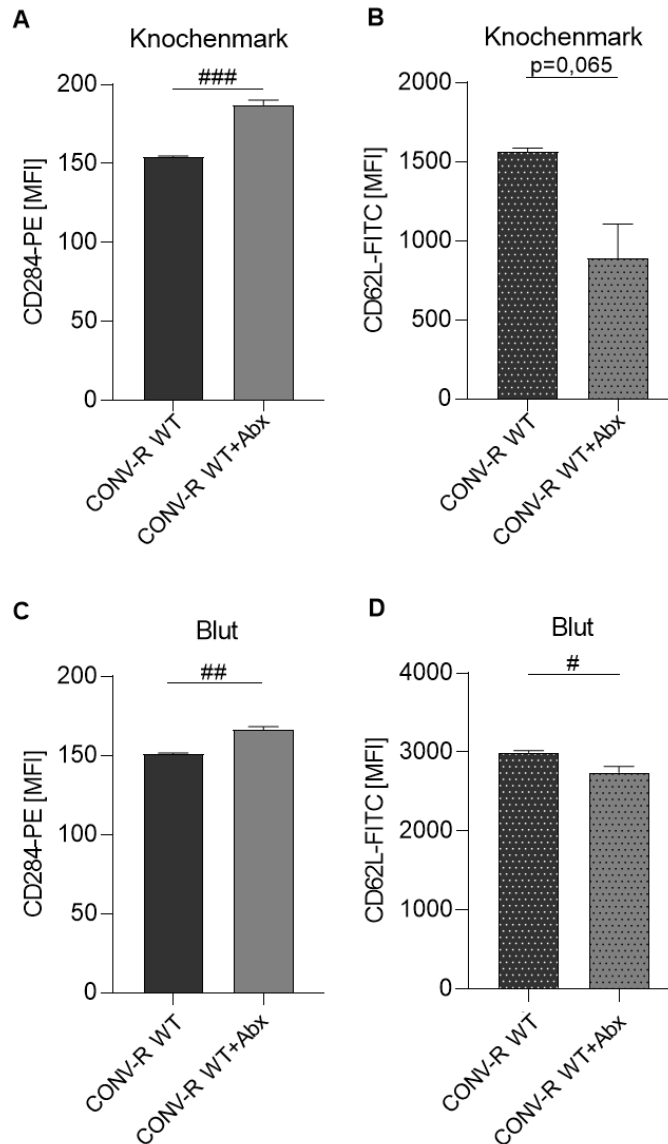


Abbildung 66: Expression des TLR4-Rezeptors und des L-Selektins auf neutrophilen Granulozyten Antibiotika-behandelter CONV-R Mäuse. **A** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von CONV-R WT (n=6) und mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=7). **B** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD62L-FITC positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von CONV-R WT (n=6) und mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=7). **C** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut von CONV-R WT (n=6) und mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=7). **D** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD62L-FITC positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut von CONV-R WT (n=6) und mit Antibiotika-behandelten CONV-R WT Mäusen (n=7). CONV-R WT Mäuse wurden für 14 Tage mit einem Antibiotika-Cocktail (Abx) über das Trinkwasser behandelt. Antibiotika-Cocktail: 1 g/L Ampicillin, 1 g/L Neomycin, 0,5 g/L Vancomycin und 1 g/L Metronidazol. Zur Bestimmung der TLR4- und L-Selektin-Expression wurde eine unabhängige

Messung durchgeführt. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Mann-Whitney-Test, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

7.3.3 Auswirkung der LPS-Behandlung auf die TLR4-Expression in Knochenmark-residenten neutrophilen Granulozyten und Neutrophilen im Vollblut

Zur Untersuchung des Einfluss der LPS-Behandlung auf die Expression des TLR4-Rezeptors in den neutrophilen Granulozyten wurden keimfreie Mäuse für eine Woche mit LPS (vom *E. coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4) über das Trinkwasser (ad libitum) behandelt.

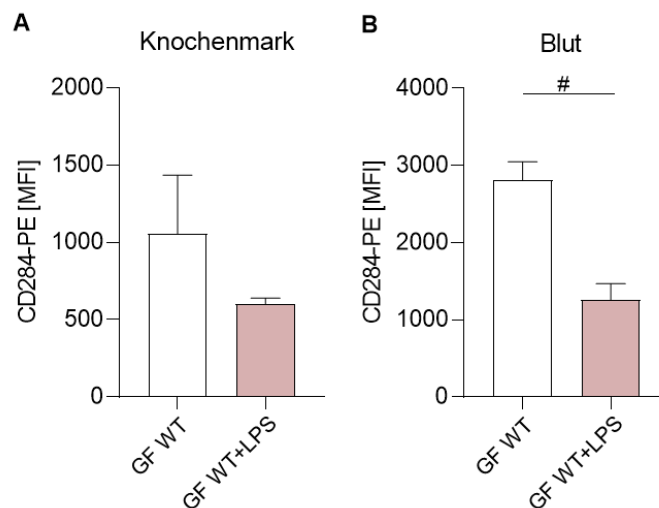


Abbildung 67: Einfluss der LPS-Behandlung auf die TLR4-Expression keimfreier Mäuse. A Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von GF WT ($n=4$) und mit LPS-behandelten GF WT Mäusen ($n=5$). **B** Darstellung der Mean Fluorescent Intensity [MFI] von CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut von GF WT ($n=4$) und mit LPS-behandelten GF WT Mäusen ($n=5$). Das LPS vom *E. coli* Serotyp *E. coli* 0111:B4 wurde in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für 7 Tage über das Trinkwasser verabreicht. Zur Bestimmung der TLR4-Expression wurde eine unabhängige Messung durchgeführt. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt über den Mann-Whitney-Test, # $p < 0.05$.

In keimfreien Mäusen wurde sowohl im Knochenmark als auch im Vollblut eine erhöhte (**Abbildung 67A**) bis signifikant verstärkte (**Abbildung 67B**) Fluoreszenzintensität des TLR4-Rezeptors auf den isolierten neutrophilen Granulozyten detektiert. Somit kam es im keimfreien Mausmodell im Fall der LPS-Behandlung zur nachweisbaren Verminderung des Fluoreszenzsignals des TLR4-Rezeptors auf den neutrophilen Granulozyten des Vollbluts und im Knochenmark.

8. Diskussion

8.1 Die intestinale Mikrobiota und NETose

Die intestinale Mikrobiota hat neben einer metabolischen, ernährungsbezogenen und einer immunologischen Funktion die Aufgabe, den Organismus vor eindringenden Pathogenen zu schützen.²⁵⁵⁻²⁵⁷ Durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel durch Ernährung oder Medikamenteneinnahme (Antibiotika), kann es allerdings zu einer Veränderung der Darmbesiedlung kommen.²⁵⁷ Eine Veränderung der intestinalen Mikrobiota konnte in Zusammenhang mit der Bildung entzündlicher Darmerkrankungen,^{258, 259} Darmkrebs^{260, 261} sowie Typ-2-Diabetes,^{262, 263} Atherosklerose^{264, 265} und arterieller Thrombose^{9, 266} gebracht werden.²⁶⁷

Ziel dieser Arbeit war es, anhand des keimfreien Mausmodells und Gnotobiotik zu untersuchen, ob die intestinale Mikrobiota die Ausprägung des Mesenterialinfarkts, einer für den Menschen lebensbedrohliche Erkrankung, beeinflusst. Der Mesenterialinfarkt oder die Ischämie des Darms, hervorgerufen durch den Verschluss einer mesenterialen Arterie (z.B. der *Arteria mesenterica superior*) resultiert in einer Hypoxie und der damit verbundenen Nekrose bestimmter Darmabschnitte (*Flexura* (Krümmung) *duodenojejunalis* bis hin zu der linken Kolonkrümmung). In der Reperfusionphase (Wiederherstellung des Blutflusses) kommt es zur Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen, wie beispielsweise LPS, aus dem Darm in die Blutbahn. Dadurch bedingt kann es zur Sepsis und im äußersten Fall zum multiplen Organversagen kommen.²⁶⁸⁻²⁷¹ Während des Mesenterialinfarkts kommt es zur Rekrutierung von Immunzellen an aktivierte Endothel der durch Ischämie-Reperfusion geschädigten Venolen. Die neutrophilen Granulozyten, die ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort sind, produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Obwohl ROS für die Immunantwort relevant ist, kann eine Überproduktion im Mesenterialinfarkt zu einer verstärkten Gewebeschädigung und Verlust der Barrierefunktion der Darmwand führen.²⁷²⁻²⁷⁵ Die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies induziert in den neutrophilen Granulozyten die Aktivierung des Enzyms PAD4. Durch anschließende Dekondensation des Chromatins und Citrullinierung des Proteins Histon H3 kommt es zur Ruptur der Zellmembran und Freisetzung der DNA-Strukturen und antimikrobieller Proteine (NETs).¹¹⁰⁻¹¹⁵ Da NETs

bereits im Myokardium und im Darm nach Ischämie-Reperfusion detektiert wurden, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell analysiert und diskutiert werden.^{253, 276, 277}

In diesem Zusammenhang wurden in Experimenten (Zellkultur) aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten mit dem TLR4-Agonist LPS (Serotyp *E. coli* 0111:B4) für 5 Stunden stimuliert. Die NET-Strukturen wurden mit dem extrazellulären DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Orange angefärbt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. In den *in vivo* Experimenten wurde durch einstündiges Abklemmen der *Arteria mesenterica cranialis* (analog zur *Arteria mesenterica superior* im Menschen) eine Ischämie induziert. Direkt nach der Okklusion der Arterie wurden mittels Intravital-Videofluoreszenzmikroskopie die Adhäsion der Leukozyten wie auch die *in vivo* NET-Bildung analysiert.

8.1.1 Die Beeinflussung der NETose durch die intestinale Mikrobiota

Zur Analyse der Auswirkung der Darmmikrobiota auf die *in vitro* und *in vivo* NETose wurden keimfreie Mäuse (Haltung im Isolator, keine intestinale Mikrobiota) mit konventionell aufgewachsenen Mäusen (spezifisch Pathogen-frei) verglichen. Da die unspezifische Immunabwehr eine zentrale Rolle in der mesenterialen Ischämie und Reperfusion spielt und der TLR4-Rezeptor nachweislich eine bedeutende Funktion in der Vermittlung proinflammatorischer Signale im Ischämie-Reperfusionsmodell hat,^{278, 290} wurden in *ex vivo* Experimenten die Reaktivität des TLR4-Rezeptors bzw. des TLR4-Signalweges in Bezug auf die NETose untersucht. Im Zellkulturexperiment wurde nach LPS-Stimulierung in GF WT Tieren ein signifikant verstärktes Fluoreszenzsignal (**Abbildung 36A**) der detektierten extrazellulären DNA (NETs) gemessen. Um eine Abhängigkeit des Mausstamms auszuschließen, wurde in einem weiteren Zellkulturexperiment neutrophile Granulozyten eines Auszucht-Stamms (Swiss Webster) mit LPS stimuliert und die NET-Fluoreszenzintensität von GF Swiss Webster im Vergleich zu CONV-R Swiss Webster Mäusen analysiert (**Abbildung 36C**). Auch hier war das Fluoreszenzsignal in den neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse signifikant erhöht. Somit kam es unabhängig vom Mausstamm nach LPS-Stimulierung von Neutrophilen aus Mäusen der keimfreien Haltung zu einer

vermehrten *in vitro* NETose. Zur Untersuchung ob Unterschiede in der Expression des TLR4 für eine verstärkte Reaktivität der neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse verantwortlich sind, wurde die Oberflächenexpression des TLR4-Rezeptors auf isolierten neutrophilen Granulozyten des Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurden in GF C57BL/6J gegenüber CONV-R C57BL/6J Mäusen (**Abbildung 65A**) ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal gemessen. Somit könnte die vermehrte NET-Bildung in keimfreien Mäusen auf eine verstärkte Reaktivität des TLR4-Signalweges zurückgeführt werden. Als Kontrollexperiment wurden aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten nach LPS-Stimulierung mit DNase behandelt (**Abbildung 36B**). DNase katalysiert die Hydrolyse der DNA-Fragmente, wodurch NET-Strukturen nachgewiesen werden können.^{279, 280} Da nach DNase-Behandlung das Fluoreszenzsignal im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert war, kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene Fluoreszenzintensität des mit SYTOX Orange angefärbten DNA-Gerüsts durch NETs verursacht wird.²⁷⁹⁻²⁸¹

Da Immunzellen, wie die Leukozyten einen durch Ischämie-Reperfusion herbeigeführten Schaden weiter verstärken können²⁸², sollte der Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf das Adhäsionsverhalten der Leukozyten im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden GF WT mit CONV-R WT Mäusen vor und nach einstündiger Ischämie verglichen. In keimfreien Mäusen wurde vor wie auch nach der Ischämie eine signifikant verringerte Anzahl an adhärenenten Leukozyten am Endothel der Venolen detektiert (**Abbildung 45B** und **Abbildung 45C**). Um das Adhäsionsverhalten der Zellen besser verstehen zu können, wurde in einem Experiment mittels der Durchflusszytometrie die Expression des Adhäsionsmolekül L-Selektin auf isolierten neutrophilen Granulozyten untersucht. In keimfreien Mäusen wurde eine reduzierte L-Selektin-Expression detektiert (**Abbildung 65B**). Da das L-Selektin als Adhäsionsmolekül ein wichtiger Bestandteil der Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel darstellt, könnte dies ein Grund für die verminderte Adhäsion der Zellen sein. Nach Komatsu *et al.* konnte im Mesenterium keimfreier Mäuse eine reduzierte Expression des intrazellulären Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), welches auf dem Endothel exprimiert wird, beobachtet werden.²⁸³ Somit könnte die reduzierte Expression an L-Selektin und ICAM-1 eine mögliche Erklärung für das verminderte Adhäsionsverhalten

der Leukozyten vor wie auch nach der einstündigen Ischämie in keimfreien C57BL/6J Mäusen sein. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Leukozytenadhäsion kam es nach der einstündigen Ischämie in den GF WT Mäusen zu einer vermehrten *in vivo* NETose (**Abbildung 46C**). Dies deutet darauf hin, dass die Granulozyten der keimfreien Mäuse verstärkt auf eine *ex vivo* LPS- und eine *in vivo* Ischämie-Reperfusion-induzierte Stimulation reagieren. Im Einklang mit diesen Befunden wurde in einer *ex vivo* Studie von Suriguga *et al.* gezeigt, dass die Abwesenheit der intestinalen Mikrobiota (in GF Mäusen) eine vermehrte LPS-vermittelte Entzündung in der Leber bewirkt.²⁸⁶ In einem anderen Versuchsmodell wurde die Auswirkung einer Endotoxin-Applikation auf den Verletzungsgrad einer Ischämie-Reperfusion in keimfreien Schweinen untersucht. Während in keimfreien Schweinen eine Ischämie-Reperfusion-induzierte Schädigung der Darmwand zu beobachten war, führte die Applikation von Endotoxin (induzierte Endotoxintoleranz) zu einer verminderten Schädigung der Darmwand nach Ischämie-Reperfusion.²⁸⁷ Nach van der Hoven *et al.* führte die Behandlung mit Endotoxin zur Desensibilisierung der Leukozyten (verringerte Beschädigung der Darmwand) und somit zu einer reduzierten Translokation größerer Moleküle und bakterieller Produkte (Endotoxin).²⁸⁸ Während in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der Mikrobiota-induzierten NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfuisionsmodell lag, wurden in den genannten Studien ein anderes Tiermodell (keimfreie Schweine), ein anderes Organsystem (Darm-Leber Achse) und eine andere Erkrankung (Entzündung der Leber) näher untersucht. Obwohl es Unterschiede zwischen den Studien und der angefertigten Arbeit gibt, stützen diese Erkenntnisse die Ergebnisse der Doktorarbeit. Sowohl durch *in vitro* LPS-Stimulierung wie auch im *in vivo* Experiment konnte in keimfreien Mäusen eine signifikant vermehrte NETose beobachtet werden.

Um festzustellen, welche Auswirkung die Kolonisierung keimfreier Mäuse mit einer komplexen Mikrobiota bzw. spezifischen Bakterienarten auf die *in vitro* und *in vivo* NETose hat, wurden ehemals keimfreie Tiere mit zökalem Inhalt konventionell-aufgewachsener SPF-Mäuse, mit der Altered Schaedler Flora und jeweils mit den Bakterienstämmen *E. coli* JP313 (gram-negativ) und *Bacillus subtilis* PY79 (gram-positiv) kolonisiert. Die LPS-induzierte *in vitro* NETose wurde ausschließlich in konventionalisierten (CONV-D) C57BL/6J und Swiss Webster Mäusen untersucht. Sowohl in den CONV-D WT wie auch in den CONV-D Swiss Webster Tieren wurde

nach 5-stündiger Stimulierung mit LPS eine signifikant verminderte NET-Bildung beobachtet (**Abbildung 44A** und **Abbildung 44B**). Durch die Konventionalisierung keimfreier Mäuse konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten der konventionalisierten Mäuse weniger sensitiv auf eine LPS-Stimulierung reagieren. Somit kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die intestinale Mikrobiota einen positiven und protektiven Effekt hat.

Werden die Ergebnisse der *in vivo* Experimente betrachtet, so wurde festgestellt, dass sowohl bei den Kolonisierungen mit zökalem Inhalt konventionell aufgewachsener SPF Mäuse (**Abbildung 57B**), ASF Mäuse (**Abbildung 62B**) und bei den Mäusen, die nur mit einem Bakterienstamm monokolonisiert wurden (**Abbildung 59B** und **Abbildung 61B**), die Anzahl an adhärenenten Leukozyten im Vergleich zu den keimfreien Kontrolltieren nach der einstündigen Ischämie erhöht waren. Dagegen konnte nach der mesenterialen Ischämie-Reperfusion in den konventionalisierten (**Abbildung 58D**) und mit ASF kolonisierten Mäusen (**Abbildung 62D**) wie auch monokolonisierten Mäusen (**Abbildung 60D** und **Abbildung 61D**) eine reduzierte *in vivo* NETose beobachtet werden. Diese Erkenntnisse werden in der Studie von Hu *et al.* bestätigt. Keimfreie Mäuse, die mit *Lactobacillus murinus* monokolonisiert wurden, wiesen nach der intestinalen Ischämie-Reperfusion eine reduzierte pathologische Darmschädigung auf.²⁸⁹ Da *Lactobacillus murinus* ein wichtiger Bestandteil der Altered Schaedler Flora ist, kann dies mit ein Grund für die verringerte *in vivo* NETose in ASF Mäusen sein. Anhand dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass bereits die Kolonisierung keimfreier Mäuse mit einem Bakterienstamm den Schaden einer mesenterialen Ischämie-Reperfusion reduzieren kann. In zukünftigen Experimenten sollten, bezogen auf die Adhäsion der Leukozyten und zur Bestätigung der Ergebnisse, Adhäsionsmarker wie L-Selektin oder ICAM-1 in den kolonisierten Tieren untersucht werden. Des Weiteren wäre es noch interessant, in den unterschiedlichen Kolonisierungsformen (komplexe Mikrobiota oder festgelegte Bakterienstämme) die Expression des TLR4- oder TLR2-Rezeptors auf den Granulozyten bzw. den neutrophilen Granulozyten zu analysieren. Da die Rezeptoren eine zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen spielen, wäre es wichtig, den Zusammenhang zwischen TLR4/TLR2 und der mesenterialen Ischämie-Reperfusion in Abhängigkeit zu den jeweiligen Kolonisierungsformen zu untersuchen.²⁹⁰ In einer Mausstudie wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Darmschädigung nach Ischämie-

Reperfusion und Freisetzung des Interleukin-10 (IL-10) aus Makrophagen durch den TLR2 erkannt.²⁸⁹

Umgekehrt zu den Kolonisierungsversuchen wurde durch eine Antibiotikabehandlung die Depletion der intestinalen Mikrobiota induziert. Hierzu wurden CONV-R C57BL/6J Mäuse mit einem Antibiotika-Cocktail bestehend aus Ampicillin, Neomycin, Vancomycin und Metronidazol für 14 Tage behandelt. Als ein zusätzliches Experiment mit einer standardisierten Mikrobiota wurden mit ASF-kolonisierte C57BL/6J Mäuse mit dem Antibiotika-Cocktail Neomycin und Ampicillin für eine Woche über das Trinkwasser behandelt. In den mit Antibiotika-behandelten CONV-R (**Abbildung 53A und Abbildung 53B**) und ASF Mäusen (**Abbildung 54A und Abbildung 54B**) wurde im mesenterialen Ischämie-Reperfuisionsmodell eine reduzierte Anzahl an adhärierenden Leukozyten beobachtet. Im Fall der ASF Tiere veränderte sich verglichen zu den GF Mäusen die Anzahl der an das mikrovaskuläre Endothel adhärierenden Leukozyten jedoch nicht (**Abbildung 54B**). Über Durchflusszytometrie konnte auf isolierten neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut und Knochenmark von Antibiotika behandelten konventionell aufgewachsenen Mäusen eine Reduktion des L-Selektin Signals detektiert werden (**Abbildung 66B und Abbildung 66D**). Im Maus- und Rattenmodell konnte nach Antibiotikabehandlung eine reduzierte ICAM-1 Expression am Endothel von Gefäßen (z.B. mesenteriale Venolen) und Organen (z.B. Zökum) detektiert werden.^{64, 283-285} Wie schon in den keimfreien Mäusen zu beobachten war, führte die Dezimierung der intestinalen Mikrobiota zu einer verringerten Leukozytenadhäsion sowie zur Reduktion des L-Selektin und des ICAM-1 Signals auf neutrophilen Granulozyten. *In vitro* wie *in vivo* konnte in den CONV-R (**Abbildung 41 und Abbildung 53D**) und ASF (**Abbildung 54D**) Mäusen eine durch Antibiotika-vermittelte gesteigerte NETose beobachtet werden. Mittels Durchflusszytometrie wurde die TLR4-Expression neutrophiler Granulozyten aus Antibiotika-behandelten C57BL/6J Mäuse bestimmt. Sowohl im Knochenmark wie auch im Vollblut konnte in den behandelten Tieren eine erhöhte Expression des TLR4-Rezeptors detektiert werden (**Abbildung 66A und Abbildung 66C**). Ähnlich wie in den keimfreien Mäusen kommt es auch in Antibiotika-behandelten Mäusen zu einer gesteigerten TLR4-vermittelten *in vitro* und *in vivo* NETose.

8.1.2 Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die entzündungsvermittelte NET-Bildung

Endotoxin (LPS) ist ein Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien. Eine Endotoxinexposition kann Entzündungen oder einen septischen Schock verursachen. Unter wiederholter Exposition mit LPS wird eine Endotoxintoleranz herbeigeführt, die eine geringere Ausprägung der inflammatorischen Immunantwort zur Folge hat.²⁴⁵ Hierbei konnte in verschiedenen Studien nach wiederholter Endotoxinexposition eine reduzierte Leukozytenadhäsion, eine verminderte Reaktion des TLR4-Signalweges, sowie ein erhöhter Schutz vor einer induzierten Ischämie-Reperfusionsschädigung beobachtet werden.²⁹¹⁻²⁹³ Für die *in vitro* wie *in vivo* Experimente wurden keimfreie C57BL/6J Mäuse über das Trinkwasser (*ad libitum*) für eine Woche mit LPS (Serotyp *E.coli* 0111:B4) behandelt. Nach LPS-Stimulierung wurde verglichen zu unbehandelten keimfreien Mäusen eine reduzierte *in vitro* NETose festgestellt (**Abbildung 42**). Die über Durchflusszytometrie ermittelte Oberflächenexpression des TLR4-Rezeptors auf isolierten neutrophilen Granulozyten ergab in Proben aus dem Vollblut wie auch aus dem Knochenmark ein verringertes Fluoreszenzsignal des TLR4 (**Abbildung 67**). Im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell wurde neben einer reduzierten Adhäsion der Leukozyten (verglichen zu konventionell aufgewachsenen C57BL/6J Mäusen) auch eine verminderte *in vivo* NETose beobachtet (**Abbildung 56**). Somit kann festgehalten werden, dass durch eine Endotoxinbehandlung die Reaktivität der Leukozyten nachhaltig verändert wird. Zusammenfassend bedeutet dies, dass neutrophile Granulozyten keimfreier Mäuse, die mit LPS behandelt wurden und eine verringerte TLR4-Oberflächenexpression aufweisen, weniger sensitiv auf eine LPS-Stimulierung reagieren.

Da die NET-Strukturen nicht nur als Abwehrmechanismus gegen Pathogene relevant sind, sondern auch in Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa¹³⁰ zu finden sind, wurde in diesem Zusammenhang die intestinale Mukositis in Abhängigkeit der Darmmikrobiota auf die *in vitro* NETose untersucht. Hierzu wurden GF C57BL/6J und CONV-R C57BL/6J Mäuse für 5 Tage mit einer 3,5%-igen Dextransulfat-Natriumsalz (DSS) Lösung behandelt. Das DSS induziert in diesem Experiment eine Colitis, wobei es zur Beeinträchtigung der Darmbarriere, der Translokation von Bakterien und einer somit verbunden Entzündung des Darms kommt.²⁴⁷ Nach LPS-

Stimulierung wurde nur in den mit DSS-behandelten konventionell aufgewachsenen Mäusen eine signifikant vermehrte *in vitro* NETose detektiert (**Abbildung 43B**).

In der Arbeit von Hernández-Chirlaque *et al.* führte eine DSS-Behandlung in keimfreien Mäusen zum Verlust der Darmbarrierefunktion, die in einer erhöhten Sterblichkeit, einer verstärkten Epithelverletzung und Blutung resultierte. Obwohl keimfreie Mäuse offensichtlich stärker auf die DSS-induzierte Colitis reagieren, zeigte das *Kolon* der keimfreien Mäuse nur wenige Anzeichen einer entzündlichen Veränderung.²⁹⁴ Im *in vitro* Modell konnte kein Unterschied in der NET-Bildung zwischen GF und mit DSS-behandelten GF WT Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 43A**). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass trotz einer induzierten Entzündung (DSS-Behandlung) die neutrophilen Granulozyten keimfreier Tiere nicht wesentlich sensitiver auf eine Stimulierung mit LPS reagieren bzw. dass eine Colitis auch bei Abwesenheit der intestinalen Mikrobiota induziert werden kann.²⁹⁵ An dieser Stelle wäre es interessant, die Expression des TLR4-Rezeptors auf den neutrophilen Granulozyten der behandelten Tiere zu analysieren, um weitere Aussagen über die Reaktivität der neutrophilen Granulozyten treffen zu können.

8.2 Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) und Von-Willebrand-Faktor (VWF) in der NETose

Durch die Umwandlung von positiv-geladenen Argininresten in Citrullin in den Histonen des Chromatins ist das Enzym PAD4 funktionell an der Bildung der NET-Strukturen beteiligt. Durch die dadurch bedingte Dekondensation der Chromatin-Strukturen kommt es zur Ruptur der Zellmembran und Freisetzung der NET-Strukturen in den extrazellulären Raum.²⁴¹⁻²⁴³ Mittels der Deletion des *Pad4*-Gens sollte die Abhängigkeit des Enzyms auf die *in vitro* und *in vivo* NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfuisionsmodell untersucht werden. Interessanterweise wurden in *Pad4*-defizienten Mäusen nach einstündiger Ischämie-Reperfusion eine verringerte Anzahl an adhärenenten Leukozyten verglichen zur CONV-R Kontrollgruppe beobachtet (**Abbildung 47B**). Sowohl in der *in vitro* (**Abbildung 38**) und in der *in vivo* NETose (**Abbildung 47D**) kam es zu einer signifikant reduzierten Bildung der NET-Strukturen. Diese Resultate bestätigen die von Martinod *et al.* in Mausexperimenten

nachgewiesene PAD4-Abhängigkeit der NET-Bildung.²⁴³ Eine vorhergehende Studie konnte zeigen, dass Mäuse mit einer *Pad4*-Defizienz auch vor einer myokardialen Ischämie-Reperfusion geschützt sind.²⁷⁷ Somit konnte im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell eine Abhängigkeit der NETose von der PAD4-Funktion gezeigt werden.

Studien von Kasuda *et al.* und Grässle *et al.* zeigten eine VWF-Abhängigkeit in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei einer Infektion, der Interaktion von VWF und Thrombozyten sowie VWF und NETs bzw. VWF und Histone in der venösen Thrombose. Des Weiteren konnte eine VWF-abhängige Adhäsion der Leukozyten ans Endothel nachgewiesen werden.^{249, 250} Da VWF in der Lage ist, mit den DNA-Strukturen der NETs eine Bindung einzugehen,²⁴⁹ sollte hier untersucht werden, inwiefern der VWF als Regulator der NETose bzw. der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell eine Rolle spielt. Das Glykoprotein von-Willebrand-Faktor (VWF) ist für die Hämostase von enormer Bedeutung. Bei einer *Vwf*-Defizienz kann es zu einer Blutungsneigung kommen. Dieses multimere Protein ist aber auch für die Ausprägung vaskulärer Entzündungsvorgänge relevant.²⁴⁸ Im Modell der mesenterialen Ischämie-Reperfusion wurden in *Vwf*-defizienten Mäusen nur eine geringe Anzahl an adhärenenten Leukozyten verglichen zur Kontrollgruppe detektiert (**Abbildung 52B**). In der Arbeit konnte das Ergebnis der verminderten Leukozytenadhäsion mit einer vorangegangenen Studie bestätigt werden.²⁵⁰ Dagegen konnte in der *in vivo* NETose kein Unterschied in der NET-Bildung zwischen Kontrolltieren und *Vwf*-defizienten Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 52C und Abbildung 52D**). Dies bedeutet, dass im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell die Leukozytenadhäsion aber nicht die *in vivo* NETose vom VWF abhängt.

8.3 Einfluss des Immunrezeptors TLR4 auf die NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell

Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) ist ein Transmembranprotein, das durch die Erkennung von LPS, einem Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien, eine Immunreaktion auslöst. Keimfreie Mäuse bzw. Mäuse deren Darmmikrobiota über eine Antibiotikanehandlung depletiert wurde, bildeten *in vitro* wie *in vivo* vermehrt NETs. Mittels Durchflusszytometrie konnte auf den isolierten neutrophilen Granulozyten beider Versuchsgruppen eine erhöhte TLR4-Expression detektiert werden. Zur Bestätigung der Annahme, dass eine erhöhte Reaktivität des TLR4-Signalweges die NETose in keimfreien Mäusen induziert, wurden neutrophile Granulozyten untersucht, die defizient für den TLR4-Signalweg waren. Hierzu wurde die LPS-induzierte NETose in *Tlr4*-, *Myd88*- und *Trif*-defizienten Mäusen untersucht (**Abbildung 39**). In den *Tlr4*- wie auch in den *Trif*-defizienten Tieren konnte eine reduzierte *in vitro* NETose beobachtet werden. Dies impliziert, dass die LPS-induzierte NETose von einem intakten TLR4-Signalweg abhängig ist. Dagegen wurde in *Myd88*-defizienten Mäusen ein ähnlich starkes Fluoreszenzsignal der NET-Strukturen wie in der Kontrollgruppe detektiert. Dies wiederum könnte darauf hinweisen, dass im Fall der Deletion des MyD88-Signalweges, in den *Myd88*-defizienten Tieren ein aktiver TRIF-Signalweg für die NET-Bildung verantwortlich ist. In einer Western Blot-Analyse (Ascher *et al.*) konnte in isolierten neutrophilen Granulozyten keimfreier Mäuse eine signifikant erhöhte Intensität der phosphorylierten Form des Interferon-Regulationsfaktors 3 (IRF3; phosphoryliert an Ser386)²⁹⁶ verglichen zu konventionell aufgewachsenen Tieren detektiert werden.²⁵³ Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch die Mikrobiota modulierte TLR4-Signalübertragung über den TLR4/TRIF-Signalweg reguliert ist.

Im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell wurde in den mesenterialen Venolen der *Tlr4*-defizienten Mäuse nach der einstündigen Ischämie eine signifikant reduzierte Adhäsion der Leukozyten beobachtet (**Abbildung 48**). Im Fall der *in vivo* NET-Bildung konnte nach der Ischämie eine Abhängigkeit der NETose vom intakten TLR4-Rezeptor festgestellt werden (**Abbildung 49**). In einem *in vivo* Experiment der *Myd88*- und *Trif*-defizienten Mäuse wurde nur in den *Myd88*^{-/-} Tieren nach einstündiger Ischämie eine

vermehrte Bildung der NET-Strukturen beobachtet.²⁵³ Wie bereits bei der LPS-induzierten *in vitro* NETose läuft die *in vivo* NETose über den TRIF-Signalweg ab.²⁹⁷

Zur Unterstützung der Annahme, dass für die *in vivo* NET-Bildung ein intakter TLR4-Signalweg relevant ist, welcher sowohl MyD88 als auch TRIF als Adaptermoleküle einsetzt, wurden spezielle *Myd88^{-/-}Trif^{-/-}* doppel-knockout Mäuse generiert. Bei diesen Tieren ist sowohl der TRIF- wie auch der MyD88-abhängige Signalweg blockiert. Nach einstündiger Ischämie, im post-ischämischen Zustand, wurde verglichen zu CONV-R WT Kontrolltieren eine verminderte Leukozytenadhäsion (**Abbildung 50B**) wie auch eine reduzierte NETose beobachtet (**Abbildung 50D**). Somit wurde die Annahme der TLR4-abhängigen NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell bestätigt.

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung des endothelialen TLR4-Rezeptors in der mesenterialen Ischämie-Reperfusion wurde die Leukozytenadhäsion wie auch die NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell betrachtet. Hierbei konnte nach der Ischämie eine vom endothelialen TLR4 abhängige Leukozytenadhäsion am mesenterialen Endothel beobachtet werden (**Abbildung 51B**). Dagegen konnte durch die Deletion des endothelialen TLR4-Rezeptors keine Abhängigkeit des TLR4-Rezeptors auf die *in vivo* NET-Bildung festgestellt werden. (**Abbildung 51D**).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die NETose von einem intakten TLR4-TRIF-Signalweg abhängt. Somit konnte gezeigt werden, dass die intestinale Mikrobiota den TLR4-TRIF Signalweg reguliert und so die *in vitro* und *in vivo* NETose steuert

8.4 Ausblick

Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, durch die Bildung der *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) in der Mikrozirkulation die Ausbreitung von pathogenen Mikroorganismen zu unterbinden. In der Arbeit konnte im keimfreien Mausmodell belegt werden, dass die intestinale Mikrobiota die Bildung der NETs in den *in vitro* (LPS-Stimulierung neutrophiler Granulozyten) und *in vivo* (mesenteriales Ischämie-Reperusionsmodell) Experimenten verhindert und damit Entzündungsreaktionen vorbeugen kann. Da die intestinale Mikrobiota die Immunantwort beeinflussen kann und der Stellenwert der Darmmikrobiota immer relevanter wird, könnten für künftige Experimente im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell die Bildung der NETs in Bezug auf ein induziertes Darmentzündungsmodell weiter untersucht werden. Hierzu könnten in Antibiotika-behandelten Mäusen eine Darmentzündung durch DSS-Behandlung induziert werden. Insbesondere der Aspekt der Anwendung von Antibiotika spielt in der heutigen Zeit eine wichtige Rolle, da sehr oft und sehr schnell Antibiotika eingesetzt werden. Des Weiteren könnte über das FACS Sorting und einer RNA-Sequenzierung in den neutrophilen Granulozyten die Signalwege, welche die NET-Bildung fördern oder unterbinden, genauer analysiert werden.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
ASF	Altered Schaedler Flora
BSA	Bovine Serum Albumin
CD14	Cluster of differentiation 14
cm	Zentimeter
CONV-D	Conventionally derived
CONV-R	Conventionally raised, konventionell aufgewachsen
CXCR2	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextransulfat Natriumsalz, Dextran sulfate sodium salt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESL-1	E-selectin ligand-1
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum
GF	Germ free, keimfrei
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IRF3	Interferon-Regulationsfaktor 3
IVM	Intravitalmikroskopie
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LB	Lysogeny broth (Nährmedium)
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich repeat
MAC-1	Macrophage-1 antigen
MACS	Magnetic Activated Cell Separation, Magnet-aktivierte Zellseparation
MBP	Major Basic Protein
MD2	Myeloid Differentiation Protein-2, Lymphozyten-Antigen 96
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NE	Neutrophile Elastase

NET	Neutrophil extracellular trap, Neutrophile Extrazelluläre Fallen
ng/mL	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase Typ IV
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pattern-recognition receptors
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RBC	Red Blood Cell (Lyse Puffer)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memoria Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TRIF	TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β
U/mL	Units pro Milliliter
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VWF	von-Willebrand Faktor
WT	Wildtyp

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gastrointestinaltrakts beim Menschen.	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Resorptionsvorgänge im Jejunum und Ileum	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mesenteriums. Veränderte Abbildung nach Schünke et al.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des Dünndarms	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bakterienverteilung im Magen, Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) und dem Kolon (Dickdarm).	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Isolators für die Haltung von keimfreien und assoziierten Versuchstieren.	12
Abbildung 7: Darstellung der Granulozyten im Blutausstrich (veränderte Abbildung nach Kühnel)	16
Abbildung 8: Vereinfachte schematische Darstellung der Rekrutierung und Transmigration am Beispiel eines neutrophilen Granulozyten.....	19
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Neutrophil Extracellular Traps (NETs). .	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung der NET-Bildung.....	22
Abbildung 11: Mechanismus der PAD4-katalysierten Reaktion (Ca^{2+} -abhängig) des Arginins in ein Citrullin.....	23
Abbildung 12: Vereinfachte Darstellung des strukturellen Aufbaus der Toll-like Rezeptoren.....	25
Abbildung 13: Vereinfachte schematische Darstellung des TLR4 Signalwegs.....	28
Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung des allgemeinen Aufbaus von LPS.....	31
Abbildung 15: Schematische Darstellung eines Intravitalmikroskops.	34
Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms der Fluoreszenz.	35
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Interkalation von Acridinorange (grüne Balken) zwischen den Basenpaaren der Doppelsträngigen-DNA.	36
Abbildung 18: Strukturformel von Acridinorange (Zinkchlorid Doppelsalz).	36
Abbildung 19: Struktur des LPS vom pathogenen Serotyp E. coli 0111:B4 nach Adam et al.	58

Abbildung 20: A Plexiglas-Kammer zur Betäubung von murinen Versuchstieren. B Schematische Darstellung der Betäubung eines Versuchstiers in einer Plexiglas-Kammer durch Inhalation von 5,0 Vol.% Isofluran bei einer O ₂ -Trägergas-Flussrate von 1 L/min.	62
Abbildung 21: Schematische Darstellung der intraperitonealen Injektion in eine Maus.	63
Abbildung 22: Schematische Darstellung einer narkotisierten Maus auf einer Wärmeplatte mit einer rektalen Thermometersonde und einer Gesichtsmaske mit Sauerstoffzufuhr.	64
Abbildung 23: Darstellung einer narkotisierten Maus. Die Haut der Halsunterseite ist entfernt worden. Das Fett und die Speicheldrüsen sind für weitere Arbeitsschritte freigelegt.	65
Abbildung 24: Darstellung der freipräparierten Vena jugularis (weißer Rahmen), des Haltefadens sowie der 3. Ligaturen, die zur Halterung des Katheters benötigt wurden. Die Stelle der 1 bis 2 mm großen Inzision wurde mit einem gelben Pfeil markiert und liegt zwischen der 1. und 2. Ligatur.	66
Abbildung 25: Darstellung des eingeführten Katheters in die Vena jugularis.	66
Abbildung 26: Darstellung des Katheters mit aspiriertem Blut.	67
Abbildung 27: Darstellung der Position des Bauchschnitts vor der Auslagerung des Darmkonvoluts.	67
Abbildung 28: Darstellung des Darmkonvoluts (gelber Rahmen). Ein Teil des Darmsegments wurde auf eine schwarze Plattform gelagert. Die mesenterialen Gefäßäste wurden mit einem weißen Rahmen markiert.	68
Abbildung 29: Beispielhafte Darstellung der mesenterialen Gefäßäste bzw. der Gefäßverzweigungen die vor wie auch nach der Ischämie und Reperfusion untersucht wurden.	69
Abbildung 30: Darstellung der Arteria mesenterica cranialis, die mit einer Micro-Klemme abgeklemmt wurde.	69
Abbildung 31: Beispielhafte Darstellung von geeigneten (weißer Pfeil) und ungeeigneten (gelber Pfeil) Gefäßästen für die Videoaufnahmen.	71
Abbildung 32: Repräsentative Abbildung von NETs (weiße Pfeile) und NET-positiven Leukozyten (grüne Pfeile) in einer mesenterialen Venole.	72

Abbildung 33: Repräsentative Darstellung von Leukozyten und NET-positiven Leukozyten.....	73
Abbildung 34: Repräsentative Darstellung von Leukozyten und NET-positiven Leukozyten.....	74
Abbildung 35: Repräsentative Darstellung von Leukozyten und NET-positiven Leukozyten.....	75
Abbildung 36: LPS-induzierte in vitro NETose isolierter neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark.	77
Abbildung 37: Repräsentative Bilder der in vitro NET-Strukturen in keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen.....	79
Abbildung 38: Untersuchung der Rolle der Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) auf die LPS-induzierte in vitro NETose.....	80
Abbildung 39: Untersuchung der in vitro NET-Bildung in Mäusen, die defizient für den TLR4-Signalweg sind.	81
Abbildung 40: Repräsentative Bilder der in vitro NET-Strukturen konventionell aufgewachsener, Myd88- und Trif-defizienter Mäuse.....	82
Abbildung 41: Untersuchung der Antibiotika-abhängigen in vitro NETose.	83
Abbildung 42: Untersuchung der Endotoxin-Toleranz in der LPS-induzierten in vitro NETose.	85
Abbildung 43: Untersuchung der Wirkung von DSS auf die LPS-induzierte NET-Bildung..	86
Abbildung 44: Untersuchung der Wirkung einer Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota auf die NET-Bildung.	87
Abbildung 45: Einfluss der Darmmikrobiota auf die in vivo Leukozytenadhärenz....	89
Abbildung 46: Einfluss der Darmmikrobiota auf die in vivo NETose.....	90
Abbildung 47: Untersuchung der Rolle der Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) in der in vivo NETose.	92
Abbildung 48: Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Leukozyten im mesenterialen Ischämie-Reperfusionmodell.....	93
Abbildung 49: Untersuchung der in vivo NETose in Mäusen, die defizient für den TLR4-Signalweg sind.	94
Abbildung 50: Untersuchung der in vivo NETose und des Adhäsionsverhalten der Leukozyten in Myd88 ^{-/-} xTrif ^{-/-} Doppelknockout Mäusen.....	96

Abbildung 51: Untersuchung der Wirkung der endothelialen TLR4-Expression auf die in vivo NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.	97
Abbildung 52: Einfluss des VWF auf die in vivo NET-Bildung im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.....	99
Abbildung 53: Untersuchung der Antibiotika-abhängigen NETose und Leukozytenadhäsion im in vivo Mausmodell der Ischämie-Reperfuionssschädigung.	101
Abbildung 54: Wirkung der Dezimierung der Darmbakterien in ASF Tieren auf die in vivo NETose..	103
Abbildung 55: Untersuchung der Endotoxin-Toleranz auf das Verhalten adhärerender Leukozyten im in vivo Modell.....	104
Abbildung 56: Untersuchung der Endotoxin-Toleranz auf die in vivo NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.	105
Abbildung 57: Untersuchung der Leukozytenadhäsion konventionalisierter Mäuse im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.	107
Abbildung 58: Untersuchung der Abhängigkeit der Kolonisierung mit einer komplexen Darmmikrobiota auf die in vivo NETose im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell	108
Abbildung 59: Untersuchung des Adhäsionsverhalten der Leukozyten E. coli monokolonisierter Mäuse im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.....	109
Abbildung 60: Untersuchung der in vivo NETose in mit E. coli JP313 monokolonisierten Mäusen im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.....	110
Abbildung 61: Untersuchung der Monokolonisierung mit B.subtilis auf die in vivo NETose und das Adhäsionsverhalten der Leukozyten im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell.	112
Abbildung 62: Untersuchung der Leukozytenadhäsion und der in vivo NETose in Altered Schaedler Flora (ASF) Tieren im mesenterialen Ischämie-Reperfuionsmodell	113
Abbildung 63: Darstellung der Dot Plots und der Gates.....	115
Abbildung 64: Darstellung der Histogramme der TLR4-positiven und L-Selektin-positiven Zellpopulation.	116
Abbildung 65: Mikrobiota-abhängige Regulation der Oberflächenexpression von TLR4- und L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten.	117

Abbildung 66: Expression des TLR4-Rezeptors und des L-Selektins auf neutrophilen Granulozyten Antibiotika-behandelter CONV-R Mäuse.....	119
Abbildung 67: Einfluss der LPS-Behandlung auf die TLR4-Expression keimfreier Mäuse..	120

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Charakteristika von keimfreien Gnotobioten im Vergleich zu konventionell aufgewachsenen Versuchstieren.....	14
Tabelle 2: Einfluss der Mikrobiota auf die Zellpopulation.....	15
Tabelle 3: Verteilung der Granulozyten im peripheren Blut im Menschen und der Maus.	17
Tabelle 4: Auflistung der Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden.....	27
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	39
Tabelle 6: Verwendete Software.....	40
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	41
Tabelle 8: Verwendete Instrumente.....	42
Tabelle 9: Verwendete Anästhesie.....	42
Tabelle 10: Verwendete Antibiotika.....	43
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.....	43
Tabelle 12: Verwendete Kits.....	44
Tabelle 13: Verwendete Pufferlösungen.....	45
Tabelle 14: Verwendete Immunfluoreszenzantikörper.....	45
Tabelle 15: Verwendeter APC Antikörper Cocktail.....	46
Tabelle 16: Verwendete Antikörper für Isotypen-Kontrollen.....	46
Tabelle 17: Verwendete Antikörper für Zielproteine.....	47
Tabelle 18: Verwendeter Antikörper zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen.....	47
Tabelle 19: Verwendete Antikörper für das Single Staining.....	47

9.4 Literaturverzeichnis

1. Kirsch J, May CA, Lorke D, Winkelmann A, Schwab W, Herrmann G, Funk R. Taschenlehrbuch Anatomie. *Thieme Verlag*. 2010. 1. Auflage.
2. Benninghoff A. und Drenckhahn D. Autoren: Drenckhahn D. und Waschke J. Taschenbuch Anatomie. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag*. 2008, 1. Auflage.
3. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Wurzinger LJ. Anatomie- Duale Reihe. *Thieme Verlag*. 2006, 1. Auflage.
4. Lippert H. und Polasek W. Anatomie kompakt. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 1994, 1. Auflage.
5. Zilles K. und Tillmann B. Anatomie. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*. 2010.
6. Hebgen E. Viszeralosteopathie-Grundlagen und Techniken. *Thieme Verlag*. 2018, 6. Auflage.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH. Prometheus-LernAtlas der Anatomie: Innere Organe. *Thieme Verlag*. 2015, 4. Auflage.
8. Bommas-Ebert U, Teubner P, Voß R. Kurzlehrbuch Anatomie. *Thieme Verlag*. 2011, 3. Auflage.
9. Ascher S. und Reinhardt C. The gut microbiota: An emerging risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. *Eur. J. Immunol.* 2018, 48(4):564-575.
10. Walter J und Hornef MW. A philosophical perspective on the prenatal in utero microbiome debate. *Microbiome*. 2021, 9(1):5.
11. Bajorek S, Parker L, Li N, Winglee K, Weaver M, Johnson J, Sioda M, Gauthier J, Lemas DJ, Jobin C et al. Initial microbial community of the neonatal stomach immediately after birth. *Gut Microbes*. 2019, 10(3):289-297.
12. Haller D. und Hörmannspurger G. Darmgesundheit und Mikrobiota: Ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit. *Springer Spektrum*. 2015.
13. Reinhardt C, Reigstad CS, Bäckhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2009, 48(3):249-256.

-
14. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015, 17(5):690-703.
 15. Hof H und Schlüter D. Medizinische Mikrobiologie. *Thieme Verlag*. 2022, 8. Auflage.
 16. Adlerberth I und Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr*. 2009, 98(2):229-238.
 17. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen AM, Härkönen T, Ryhänen SJ, Franzosa EA, Vlamakis H, Huttenhower C, Gevers D et al. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci. Transl. Med*. 2016, 8(343):343ra81.
 18. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 108 Suppl 1 (Suppl 1):4578-4585.
 19. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007, 5(7):e177.
 20. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães Vd, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet J-P. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009, 9:123.
 21. Clarke G, Sandhu K, Griffin BT, Dinan TG, Cryan JF, Hyland NP. Gut reactions: Breaking down xenobiotic-microbiome interactions. *Pharmacol Rev*. 2019, 71(2):198-224.
 22. Adak A und Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 2019, 76(3):473-493.
 23. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009, 457(7228):480-484.
 24. Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. 2015, 26:26164.
 25. Amato KR, Yeoman CJ, Cerda G, Schmitt CA, Cramer JD, Miller ME, Gomez A, Turner TR, Wilson BA, Stumpf RM et al. Variable responses of human and non-human primate gut microbiomes to a Western diet. *Microbiome*. 2015, 3:53.

-
26. Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* 2010, 4(2):232-241.
 27. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007, 56(7):1761-1772.
 28. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia.* 2007, 50(11):2374-2383.
 29. Khodamoradi Y, Kessel J, Vehreschild JJ, Vehreschild MJGT. The role of microbiota in preventing multidrug-resistant bacterial infections. *Dtsch Arztebl Int.* 2019, 116(40):670-676.
 30. Tirelle P, Breton J, Riou G, Déchelotte P, Coëffier M, Ribet D. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. *BMC Microbiol.* 2020, 20(1):340.
 31. de Kraker MEA und Lipsitch M. Burden of antimicrobial resistance: Compared to what? *Epidemiol Rev.* 2022, 43(1):53-64.
 32. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018, 11:1645-1658.
 33. Xu L, Surathu A, Raplee I, Chockalingam A, Stewart S, Walker L, Sacks L, Patel V, Li Z, Rouse R. The effect of antibiotics on the gut microbiome: a metagenomics analysis of microbial shift and gut antibiotic resistance in antibiotic treated mice. *BMC Genomics.* 2020, 21(1):263.
 34. Isaac S, Scher JU, Djukovic A, Jiménez N, Littman DR, Abramson SB, Pamer EG, Ubeda C. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J Antimicrob Chemother.* 2017, 72(1):128-136.
 35. Haak BW, Lankelma JM, Hugenholtz F, Belzer C, de Vos WM, Wiersinga WJ. Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazol on the gut microbiota in healthy humans. *J Antimicrob Chemother.* 2019, 74(3):782-786.

-
36. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 2007, 1(1):56-66.
 37. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology (Reading).* 2010, 156(Pt 11):3216-3223.
 38. Rashid M-U, Zaura E, Buijs MJ, Keijser BF, Crielaard W, Nord CE, Weintraub A. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods. *Clin Infect Dis.* 2015, 60 Suppl 2:S77-84.
 39. Laubitz D, Typpo K, Midura-Kiela M, Brown C, Barberán A, Ghishan FK, Kiela PR. Dynamics of gut microbiota recovery after antibiotic exposure in young and old mice (a pilot study). *Microorganisms.* 2021, 9(3):647.
 40. Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Liang S, Feng Q, Zhang C et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol.* 2018, 3(11):1255-1265.
 41. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, Loeff BG, Dormans T, van Melsen GC, Kluiters YC et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16(7):819-827.
 42. Baggs J, Jernigan JA, Halpin AL, Epstein LH, Hatfield KM, McDonald LC. Risk of subsequent sepsis within 90 days after a hospital stay by type of antibiotic exposure. *Clin Infect Dis.* 2018, 66(7):1004-1012.
 43. Kennedy EA, King KY, Baldrige MT. Mouse microbiota models: Comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Front Physiol.* 2018, 9:1534.
 44. Macpherson AJ und McCoy KD. Standardised animal models of host microbial mutualism. *Mucosal Immunol.* 2015, 8(3):476-486.
 45. Gordon HA und Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol Rev.* 1971, 35(4):390-429.

-
46. Inzunza J, Midtvedt T, Fartoo M, Norin E, Osterlund E, Persson A-K, Ahrlund-Richter L. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. *Lab Anim.* 2005, 39(4):421-427.
 47. Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Langella P. Gnotobiotic rodents: An in vivo model for the study of micobe-microbe interactions. *Front Microbiol.* 2016, 7:409.
 48. Trexler PC und Reynolds LI. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Appl Microbiol.* 1957, 5(6):406-412.
 49. Thompson GR und Trexler PC. Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut.* 1971, 12(3):230-235.
 50. Carter PB und Pollard M. Host responses to “normal” microbial flora in germ-free mice. *J Reticuloendothel Soc.* 1971, 9(6):580-587.
 51. Alam C, Bittoun E, Bhagwat D, Valkonen S, Saari A, Jaakkola U, Eerola E, Huovinen P, Hänninen A. Effects of germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia.* 2011, 54(6):1398-1406.
 52. Gabay O, Vicenty J, Smith D, Tiffany L, Ascher J, Curry T, Dennis J, Clouse KA. Using a model of germ-free animals to study the impact of gut microbiome in research: A step by step sterility setting and management. *Methods Protoc.* 2020, 3(1):18.
 53. Ellekilde M, Selfjord E, Larsen CS, Jakešević M, Rune I, Tranberg B, Vogensen FK, Nielsen DS, Bahl MI, Licht TR et al. Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Sci Rep.* 2014, 4:5922.
 54. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104(3):979-984.
 55. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lundén G, Petersen LC, Ruf W, Bäckhed F. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature.* 2012, 483(7391):627-631.
 56. Hill DA, Hoffmann C, Abt MC, Du Y, Kobuley D, Kirn TJ, Bushman FD, Artis D. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2010, 3(2):148-158.

-
57. Bayer F, Ascher S, Pontarollo G, Reinhardt C. Antibiotic treatment protocols and germ-free mouse models in vascular research. *Front Immunol.* 2019, 10:2174.
58. Clavel T, Gomes-Neto JC, Lagkouravdos I, Ramer-Tait AE. Deciphering interactions between the gut microbiota and the immune system via microbial cultivation and minimal microbiomes. *Immunol Rev.* 2017, 279(1):8-22.
59. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013, 54(9):2325-2340.
60. Luczynski P, McVey Neufeld K-A, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a bubble: Using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016, 19(8):pyw020.
61. Manca C, Boubertakh B, Leblanc N, Deschênes T, Lacroix S, Martin C, Houde A, Veilleux A, Flamand N, Muccioli GG et al. Germ-free mice exhibit profound gut microbiota-dependent alterations of intestinal endocannabinoidome signaling. *J Lipid Res.* 2020, 61(1):70-85.
62. Nowacki MR. Cell proliferation in colonic crypts of germ-free and conventional mice – preliminary report. *Folia Histochem Cytobiol.* 1993, 31(2):77-81.
63. Hashimoto H, Ebukuro S, Nozu R, Ueno M, Arai T, Kawai K, Hirata H, Ogawa M, Mizusawa T, Imai K et al. Vinyl isolator breeding induces insulin resistance in C57BL/6JJcl mice. *Exp Anim.* 2011, 60(5):497-508.
64. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang J-E, Scheiermann C et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature.* 2015, 525(7570):528-532.
65. Zhang D und Frenette PS. Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood.* 2019. 133(20):2168-2177.
66. Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lundén GÖ, Cani PD, Bäckhed F. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut.* 2012, 61(12):1701-1707.
67. Sumi Y, Miyakawa M, Kanzaki M, Kotake Y. Vitamin B-6 deficiency in germfree rats. *J Nutr.* 1977. 107(9):1707-1714.

-
68. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol.* 2011, 2:94.
69. Høverstad T und Midtvedt T. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J Nutr.* 1986, 116(9):1772-1776.
70. Rodrigues RR, Greer RL, Dong X, D'Souza K, Gurung M, Wu JY, Morgun A, Shulzhenko N. Antibiotic-induced alterations in gut microbiota are associated with changes in glucose metabolism in healthy mice. *Front Microbiol.* 2017, 8:2306.
71. Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, Knight R, Panda S. Antibiotic-induced microbiome depletion alters homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat Commun.* 2018, 9(1):2872.
72. Ding Z-C, Aboeella NS, Bryan L, Shi H, Zhou G. The monocytes that repopulate in mice after cyclophosphamide treatment acquire a neutrophil precursor gene signature and immunosuppressive activity. *Front Immunol.* 2021, 11:594540.
73. Chen Q, Nair S, Ruedl C. Microbiota regulates the turnover kinetics of gut macrophages in health and inflammation. *Life Sci Alliance.* 2021, 5(1):e202101178.
74. Honda M, Surewaard BGJ, Watanabe M, Hedrick CC, Lee W-Y, Brown K, McCoy KD, Kubes P. Perivascular localization of macrophages in the intestinal mucosa is regulated by Nr4a1 and the microbiome. *Nat Commun.* 2020, 11(1):1329.
75. Dessein R, Bauduin M, Grandjean T, Le Guern R, Figeac M, Beury D, Faure K, Faveeuw C, Guery B, Gosset P et al. Antibiotic-related gut dysbiosis induces lung immunodepression and worsens lung infection in mice. *Crit Care.* 2020, 24:611.
76. Hill DA, Siracusa MC, Abt MC, Kim BS, Kobuley D, Kubo M, Kambayashi T, LaRosa DF, Renner ED, Orange JS et al. Commensal bacterial-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat Med.* 2012, 18(4):538-546.
77. Jiménez-Saiz R, Anipindi VC, Galipeau H, Ellenbogen Y, Chaudhary R, Koenig JF, Gordon ME, Walker TD, Mandur TS, Abed S et al. Microbial regulation of enteric eosinophils and its impact on tissue remodeling and Th2 immunity. *Front Immunol.* 2020, 11:155.

-
78. Oh JE, Kim B-C, Chang D-H, Kwon M, Lee SY, Kang D, Kim JY, Hwang I, Yu J-W, Nakae S et al. Dysbiosis-induced IL-33 contributes to impaired antiviral immunity in the genital mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016, 113(6):E762-E771.
79. Josefsson KS, Baldrige MT, Kadmon CS, King KY. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. *Blood*. 2017, 129(6):729-739.
80. Hrnčir T, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: Studies in germ-free mice. *BMC Immunol*. 2008, 9:65.
81. Ekmekci I, von Klitzing E, Fiebiger U, Escher U, Neumann C, Bacher P, Scheffold A, Kühl AA, Bereswill S, Heimesaat MM. Immune responses to broad-spectrum antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. *Front Immunol*. 2017, 8:397.
82. Walton KLW, He J, Kelsall BL, Sartor RB, Fisher NC. Dendritic cells in germ-free and specific pathogen-free mice have similar phenotypes and in vitro antigen presenting function. *Immunol Lett*. 2006, 102(1):16-24.
83. Königshoff M und Brandenburger T. Kurzlehrbuch Biochemie. *Thieme Verlag*. 2012, 3. Auflage.
84. Gabrisch K und Zwart P. Krankheiten der Heimtiere. *Schlütersche Verlagsgesellschaft*. 2008, 7. Auflage.
85. Toyama S, Okada N, Matsuda A, Morita H, Saito H, Fujisawa T, Nakae S, Karasuyama H, Matsumoto K. Human eosinophils constitutively express a unique serine protease, PRSS33. *Allergol Int*. 2017, 66(3):463-471.
86. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 2013, 7. Auflage.
87. Kühnel W. Taschenatlas Histologie. *Thieme Verlag*. 2014, 13. Auflage.
88. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W et al. Duale Reihe Anatomie. *Thieme Verlag*. 2020, 5. Auflage.
89. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. The laboratory mouse (A volume in the laboratory animal pocket reference series). *CRC Press*. 2001

-
90. Lüllmann-Rauch R und Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme Verlag*. 2019. 6. Auflage.
91. Ulfing N. Kurzlehrbuch Histologie. *Thieme Verlag*. 2019, 5. Auflage.
92. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted function of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014, 9:181-218.
93. Li N, Mao D, Lü S, Tong C, Zhang Y, Long M. Distinct binding affinities of Mac-1 and LFA-1 in neutrophil activation. *J Immunol*. 2013, 190(8):4371-4381.
94. Boxio R, Bossenmeyer-Pouricé C, Steinckwich N, Dournon C, Nüsse O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2004, 75(4):604-611.
95. Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*. 2007, 26(4):477-489.
96. Mebius RE, Dowbenko D, Williams A, Fennie C, Lasky LA, Watson SR. Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin, is affected by afferent lymphatic flow. *J Immunol*. 1993, 151(12):6769-6776.
97. Stadtmann A, Germena G, Block H, Boras M, Rossaint J, Sundd P, Lefort C, Fisher CI, Buscher K, Gelschefarth B et al. The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow. *J Exp Med*. 2013, 210(11):2171-2180.
98. Seo SM, McIntire LV, Smith CW. Effects of IL-8, Gro-alpha, and LTB(4) on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001, 281(5):C1568-1578.
99. DiVietro JA, Smith MJ, Smith BR, Petruzzelli L, Larson RS, Lawrence MB. Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*. 2001, 167(7):4017-4025.
100. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004, 303(5663):1532-1535.
101. Brinkmann V und Zychlinsky A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007, 5(8):577-582.

-
102. Phillipson M und Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011, 17(11):1381-1390.
 103. Kaplan MJ und Radic M. Neutrophil extracellular traps: Double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 2012, 189(6):2689-2695.
 104. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007, 176(2):231-241.
 105. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers Jr DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(36):15880-15885.
 106. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, von Bernuth H, Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017, 6:e24437.
 107. Sofoluwe A, Bacchetta M, Badaoui M, Kwak BR, Chanson M. ATP amplifies NADPH-dependent and -independent neutrophil extracellular trap formation. *Sci Rep.* 2019, 9(1):16556.
 108. Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, van Wamel WJB, van Beusekom HMM, van Neck JW, de Maat MPM. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS One.* 2017, 12(5):e0176472.
 109. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010, 185(12):7413-7425.
 110. Sørensen OE und Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* 2016, 126(5):1612-1620.
 111. Van Avondt K und Hartl D. Mechanisms and disease relevance of neutrophil extracellular trap formation. *Eur J Clin Invest.* 2018, 48 Suppl 2:e12919.
 112. Khan U, Chowdhury S, Billah MM, Islam KMD, Thorlacius H, Rahman M. Neutrophil extracellular traps in colorectal cancer progression and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(14):7260.

-
113. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 2014, 8(3):883-896.
114. Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol.* 2012, 3:360.
115. Wong SL und Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: A nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory disease and aging. *FASEB J.* 2018, 32(12):fj201800691R.
116. Li M, Lin C, Leso A, Nefedova Y. Quantification of citrullinated histone H3 bound DNA for detection of neutrophil extracellular traps. *Cancers (Basel).* 2020, 12(11):3424.
117. Tsourouktsoglou T-D, Warnatsch A, Ioannou M, Hoving D, Wang Q, Papayannopoulos V. Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4. *Cell Rep.* 2020, 31(5):107602.
118. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, Senger-Sander S, Geisler C, Egner A, Schön MP et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun.* 2018, 9(1):3767.
119. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, D'Atri LP, Gómez RM, Schattner M. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol.* 2016, 99(1):153-162.
120. Tripathi S, Verma A, Kim E-J, White MR, Hartshorn KL. LL-37 modulates human neutrophil response to influenza A virus. *J Leukoc Biol.* 2014, 96(5):931-938.
121. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kazoki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012, 12(1):109-116.

-
122. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009, 114(13):2619-2622.
123. Camicia G, Pozner R, de Larrañaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*. 2014, 42(4):286-294.
124. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV, Melo PH, Scortegagna GT, Silva RL, Barroso-Sousa R, Souto FO et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS One*. 2016, 11(2):e0148142.
125. Bruschi M, Bonanni A, Petretto A, Vaglio A, Pratesi F, Santucci L, Migliorini P, Bertelli R, Galetti M, Belletti S. et al. Neutrophil extracellular traps profiles in patients with incident systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *J Rheumatol*. 2020, 47(3):377-386.
126. Shao S, Fang H, Dang E, Xue K, Zhang J, Li B, Qiao H, Cao T, Zhuang Y, Shen S et al. Neutrophil extracellular traps promote inflammatory responses in psoriasis via activating epidermal TLR4/IL-36R crosstalk. *Front Immunol*. 2019, 10:746.
127. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013, 5(178):178ra40.
128. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, Kahn CR, Wagner DD. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which severely impairs wound healing. *Nat Med*. 2015, 21(7):815-819.
129. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, Drosos GI, Boumpas DT, Ritis K. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*. 2011, 6(12):e29318.
130. Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, Laudisi F, Franzè E, Di Grazia A, Figliuzzi MM, Caprioli F, Stolfi C, Monteleone I, Monteleone G. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*. 2019, 13(6):772-784.

-
131. D'Abbondanza M, Martorelli EE, Ricci MA, De Vuono S, Migliola EN, Godino C, Corradetti S, Siepi D, Paganelli MT, Maugeri N et al. Increased plasmatic NETs by-products in patients in severe obesity. *Sci Rep.* 2019, 9(1):14678.
 132. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science.* 2015, 349(6245):316-320.
 133. Knight JS, Luo W, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Subramanian V, Guo C, Grenn RC, Thompson PR, Eitzman DT et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune response in murine models of atherosclerosis. *Circ Res.* 2014, 114(6):947-956.
 134. Liu Y, Carmona-Rivera C, Moore E, Seto NL, Knight JS, Pryor M, Yang Z-H, Hemmers S, Remaley AT, Mowen KA et al. Myeloid-specific deletion of peptidylarginine deiminase 4 mitigates atherosclerosis. *Front Immunol.* 2018, 9:1680.
 135. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The emerging role of NETs in venous thrombosis and immunothrombosis. *Front Immunol.* 2016, 7:236.
 136. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, Stürzl M, Staats L, Mahajan A, Schauer C. et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine.* 2020, 58:102925.
 137. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, Blair C, Weber A, Barnes BJ, Egeblad M et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight.* 2020, 5(11):e138999.
 138. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure.* 2011, 19(4):447-459.
 139. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory disease: A journey from molecular to nano therapeutics. *Front Physiol.* 2017, 8:508.
 140. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006, 124(4):783-801.
 141. Kawai T und Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010, 11(5):373-384.

-
142. Fore F, Indriputri C, Mamutse J, Nugraha J. TLR10 and its unique anti-inflammatory properties and potential use as a target in therapeutics. *Immune Netw.* 2020, 20(3):e21.
143. Henrick BM, Yao X-D, Zahoor MA, Abimiku A, Osawe S, Rosenthal KL. TLR10 senses HIV-1 proteins and significantly enhances HIV-1 infections. *Front. Immunol.* 2019, 10:482.
144. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003, 21:335-376.
145. Hopkins PA und Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: To immunity and beyond. *Clin Exp Immunol.* 2005, 140(3):395-407.
146. Frantz S, Kobzik L, Kim D, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999, 104(3):271-280.
147. Katara PB, Nizami HL, Paramesha B, Dinda AK, Banerjee SK. Activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) promotes cardiomyocyte apoptosis through SIRT2 dependent p53 deacetylation. *Sci Rep.* 2020, 10(1):19232.
148. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med.* 2010, 48(9):1121-1132.
149. Coats SR, Pham T-TT, Bainbridge BW, Reife RA, Darveau RP. MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize Escherichia coli lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. *J Immunol.* 2005, 175(7):4490-4498.
150. Taghanemt A, Zhang D, Levis EN, Weiss JP, Gioannini TL. Molecular basis reduced potency of underacylated endotoxins. *J Immunol.* 2005, 175(7):4669-4676.
151. Hatai H, Lepelley A, Zeng W, Hayden MS, Gosh S. Toll-like receptor 11 (TLR11) interacts with flagellin and profilin through disparate mechanisms. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0148987.
152. Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2011, 286(5):3307-3314.
153. Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Gosh S. Recognition of profilin by Toll-like receptor

-
- 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2013, 38(1):119-130.
154. Signorino G, Mohammadi N, Patanè F, Buscetta M, Venza M, Venza I, Mancuso G, Midiri A, Alexopoulou L, Teti G et al. Role of Toll-like receptor 13 in innate immune recognition of group B streptococci. *Infect Immun*. 2014, 82(12):5013-5022.
155. Wang J, Chai J, Wang H. Structure of the mouse Toll-like receptor 13 ectodomain in complex with a conserved sequence from bacterial 23S ribosomal RNA. *FEBS J*. 2016, 283(9):1631-1635.
156. Roh JS und Sohn DH. Damage-associated molecular patterns in inflammatory disease. *Immune Netw*. 2018, 18(4):e27.
157. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Front Immunol*. 2014, 5:367.
158. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 2002, 169(1):10-14.
159. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001, 413(6857):732-738.
160. Hu Y, Cong X, Chen L, Qi J, Wu X, Zhou M, Yoo D, Li F, Sun W, Wu J et al. Synergy of TLR3 and 7 ligands significantly enhances function of DCs to present inactivated PRRSV antigen through TRIF/MyD88-NF-κB signaling pathway. *Sci Rep*. 2016, 6:23977.
161. Frank-Bertoncelj M, Pisetsky DS, Kolling C, Michel BA, Gay RE, Jüngel A, Gay S. TLR3 ligand Poly (I:C) exerts distinct actions in synovial fibroblasts when delivered by extracellular vesicles. *Front Immunol*. 2018, 9:28.
162. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001, 410(6832):1099-1103.
163. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 2001, 13(7):933-940.

-
164. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single stranded RNA. *Science*. 2004, 303(5663):1529-1531.
165. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Sato R, Shukla NM, David SA, Isobe T, Miyake K et al. Structural analyses of toll-like receptor 7 reveal detailed RNA sequence specificity and recognition mechanism of agonistic ligands. *Cell Rep*. 2018, 25(12):3371-3381.e5.
166. Cervantes JL, Weinerman B, Basole C, Salazar JC. TLR8: The forgotten relative revindicated. *Cell Mol Immunol*. 2012, 9(6):434-438.
167. Bergström B, Aune MH, Awuh JA, Kojen JF, Blix KJ, Ryan L, Flo TH, Mollnes TE, Espevik T, Stenvik J. TLR8 senses *Staphylococcus aureus* RNA in human primary monocytes and macrophages and induces IFN- β production via a TAK1-IKK β -IRF5 signaling pathway. *J Immunol*. 2015, 195(3):1100-1111.
168. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000, 408(6813):740-745.
169. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*. 2009, 420(1):1-16.
170. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Gosh S. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004, 303(5663):1522-1526.
171. Bao W, Xia H, Liang Y, Ye Y, Lu Y, Xu X, Duan A, He J, Chen Z, Wu Y et al. Toll-like receptor 9 can be activated by endogenous mitochondrial DNA to induce podocyte apoptosis. *Sci Rep*. 2016, 6:22579.
172. Ohto U, Ishida H, Shibata T, Sato R, Miyake K, Shimizu T. Toll-like receptor 9 contains two DNA binding sites that function cooperatively to promote receptor dimerization and activation. *Immunity*. 2018, 48(4):649-658.e4.
173. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Gosh S et al. TLR11 activation of dendritic cells by protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005, 308(5728):1626-1629.

-
174. Hatai H, Lepelley A, Zeng W, Hayden MS, Ghosh S. Toll-like receptor 11 (TLR11) interacts with flagellin and profilin through disparate mechanisms. *PLoS One*. 2016, 11(2):e0148987.
175. Hochrein H und Kirschning CJ. Bacteria evade immune recognition via TLR13 and binding of their 23S rRNA by MLS antibiotics by the same mechanisms. *Oncoimmunology*. 2013, 2(3):e23141.
176. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol*. 2012, 3:79.
177. Takeda K und Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005, 17(1):1-14.
178. Wright SD, Ramos SA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990, 249(4975):1431-1433.
179. Park BS und Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013, 45(12):e66.
180. Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The role of Toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016, 2016:6978936.
181. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008, 42(2):145-151.
182. Gangloff M. Different dimerization mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends Biochem Sci*. 2012, 37(3):92-98.
183. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nat Immunol*. 2008, 9(4):361-368.
184. Steimle A, Autenrieth IB, Frick J-S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2016, 306(5):290-301.
185. Raetz CRH und Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002, 71:635-700.
186. Mattsby-Baltzer I, Mielniczuk Z, Larsson L, Lindgren K, Goodwin S. Lipid A in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1992, 60(10):4383-4387.

-
187. Moran AP, Lindner B, Walsh EJ. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough-and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol.* 1997, 179(20):6453-6463.
188. Leone S, Molinaro A, Pessione E, Mazzoli R, Giunta C, Sturiale L, Garozzo D, Lanzetta R, Parrilli M. Structural elucidation of the core-lipid A backbone from lipopolysaccharide of *Acinetobacter radioresistens* S13, an organic solvent tolerant gram-negative bacterium. *Carbohydr Res.* 2006, 341(5):582-590.
189. López-Collazo E und del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: Mechanisms and clinical consequences. *Crit Care.* 2013, 17(6):242.
190. Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, Philipp T. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: Possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol.* 2000, 156(1):287-293.
191. Colletti LM, Remick DG, Cambell Jr DA. LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res.* 1994, 57(3):337-343.
192. Li J, Lai X, Chen Y, Niu B, Gong J. Endotoxin tolerance attenuates liver ischemia/reperfusion injury by down-regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in kupffer cells. *Transplant Proc.* 2011, 43(7):2531-2535.
193. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: A clinical review. *Arch Intern Med.* 2004, 164(10):1054-1062.
194. Wetsch WA, Hinkelbein J, Spöhr F. Kurzlehrbuch Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie. *Thieme Verlag.* 2018, 2. Auflage.
195. Kröger J-C und Hauenstein K. Akute mesenteriale Ischämie: Management und radiologische Intervention in der Therapie akuter arterieller Verschlüsse und venöser Thrombose. *Chir Gastroenterol.* 2006, 22:17-24.
196. Bala M, Kashuk J, Moore EE, Kluger Y, Biffi W, Gomes CA, Ben-Ishay O, Rubinstein C, Balogh ZJ, Civil I et al. Acute mesenteric ischemia: Guidelines of the world society of emergency surgery. *World J Emerg Surg.* 2017, 12:38.
197. Luther B, Mamopoulos A, Lehmann C, Klar E. The ongoing challenge of acute mesenteric ischemia. *Visc Med.* 2018, 34(3):217-223.

-
198. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999, 94(11):3829-3838.
 199. Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. Ischemia/reperfusion: A clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg*. 2005, 40(3):470-477.
 200. Zabala V, Boylan JM, Thevenot P, Frank A, Senthoo D, Iyengar V, Kim H, Cohen A, Gruppuso PA, Sanders JA. Transcriptional changes during hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *PLoS One*. 2019, 14(12):e0227038.
 201. Wei Q und Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: Technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012, 303(11):F1487-1494.
 202. Horii M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Nakamura K, Wada Y, Tschuikawa D, Yoshikawa A, Tamaki K, Shioda S. Unraveling the ischemic brain transcriptome in a permanent middle cerebral artery occlusion mouse model by DNA microarray analysis. *Dis Model Mech*. 2012, 5(2):270-283.
 203. Xu Z, McElhanon KE, Beck EX, Weisleder N. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Methods Mol Biol*. 2018, 1717:145-153.
 204. Carden DL und Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000, 190(3):255-266.
 205. Granger DN und Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015, 6:524-551.
 206. den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: A molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010, 299(5):H1283-1299.
 207. Walle AJ und Wong GY. Binding of acridine orange to DNA in situ of cells from patients with acute leukemia. *Cancer Res*. 1989, 49(13):3692-3695.
 208. Byvaltsev VA, Bardanova LA, Onaka NR, Polkin RA, Ochkal SV, Shepelev VV, Aliyev MA, Potapov AA. Acridine orange: A review of novel applications for surgical cancer imaging and therapy. *Front Oncol*. 2019, 9:925.

-
209. Yan X, Habbersett RC, Cordek JM, Nolan JP, Yoshida TM, Jett JH, Marrone BL. Development of mechanism-based, DNA staining protocol using SYTOX orange nucleic acid stain and DNA fragment sizing flow cytometry. *Anal Biochem.* 2000, 286(1):138-148.
210. Backer AS, Lee MY und Moerner WE. Enhanced DNA imaging using super-resolution microscopy and simultaneous single-molecule orientation measurements. *Optica.* 2016, 3(6):3-6.
211. Ludwig M, Rieger J, Ruppert V. Gefäßmedizin in Klinik und Praxis. *Thieme Verlag.* 2010. 2. Auflage.
212. Salomon F-V, Geyer H, Gille U. Anatomie der Tiermedizin. *Enke Verlag.* 2015, 3. Auflage.
213. The Jackson Laboratory: jax.org/strain/000664 (abgerufen am 10.04.2022).
214. Taconic: taconic.com/mouse-model/swiss-webster (abgerufen am 10.04.2022).
215. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS ONE.* 2011, 6(7):e22043.
216. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999, 162(7):3749-3752.
217. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 1998, 9(1):143-150.
218. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 2003, 424(6950):743-748.
219. Dewhirst FE, Chien CC, Paster BJ, Ericson RL, Orcutt RP, Schauer DB, Fox JG. Phylogeny of the defined murine microbiota: Altered Schaedler flora. *Appl Environ Microbiol.* 1999, 65(8):3287-3292.
220. Wymore Brand M, Wannemuehler MJ, Phillips GJ, Proctor A, Overstreet A-M, Jergens AE, Orcutt RP, Fox JG. The altered Schaedler flora: Continued

-
- applications of a defined murine microbial community. *ILAR J.* 2015, 56(2):169-178.
221. Bayer F, Ascher S, Kiouptsi K, Kittner JM, Stauber RH, Reinhardt C. Colonization with altered Schaedler flora impacts leukocyte adhesion in mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Microorganisms.* 2021, 9(8):1601.
222. Kiouptsi K und Reinhardt C. Physiological roles of the von Willebrand factor-factor VIII interaction. *Subcell Biochem.* 2020, 94:437-464.
223. Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Culleré M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95(16):9524-9529.
224. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, Carmeliet P, Iruela-Arispe ML. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn.* 2006, 235(3):759-767.
225. Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, Feng G, Wu M, Zhou X, Lafyatis R, Lee J, Hinchcliff M, Feghali-Bostwick C et al. Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat Commun.* 2016, 7:11703.
226. The Jackson Laboratory: jax.org/strain/024872 (abgerufen am 10.04.2022).
227. Viljanen MK, Peltola T, Junnila SY, Olkkonen L, Järvinen H, Kuistila M, Huovinen P. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* 0111:B4 in schoolchildren and adults: Association on Vi antigen-like reactivity. *Lancet.* 1990, 336(8719):831-834.
228. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004, 118(2):229-241.
229. Chen L-W, Chang W-L, Chen P-H, Hsu C-M. Commensal microflora induce host defense and decrease bacterial translocation in burn mice through Toll-like receptor 4. *J Biomed Sci.* 2010, 17(1):48.
230. Hörmann N, Brandão I, Jäckel S, Ens N, Lillich M, Walter U, Reinhardt C. Gut microbial colonization orchestrates TLR2 expression, signaling and epithelial proliferation in the small intestinal mucosa. *PLoS One.* 2014, 9(11):e113080.

-
231. Schroeder JW und Simmons LA. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain PY79. *Genome Announc.* 2013, 1(6):e01085-13.
232. Hong HA, Khaneja R, Tam NM, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol.* 2009, 160(2):134-143.
233. Nicholson WL und Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood C, Cutting S, editors, Molecular biological methods for *Bacillus*. *John Wiley and Sons.* 1990, 391-450.
234. Saffarzadeh M, Cabrera-Fuentes HA, Veit F, Jiang D, Scharffetter-Kochanek K, Gille CG, Rooijackers SHM, Hartl D, Preissner KT. Characterization of rapid neutrophil extracellular trap formation and its cooperation with phagocytosis in human neutrophils. *Discoveries.* 2014, 2(2):e19.
235. Luo Y und Dorf ME. Isolation of mouse neutrophils. *Curr Protoc Immunol.* 2001, 22:3.20.1-3.20.6.
236. Grill A, Kiouptsi K, Karwot C, Jurk K, Reinhardt C. Evaluation of blood collection methods and anticoagulants for platelet function analyses on C57BL/6J laboratory mice. *Platelets.* 2020, 31(8):981-988.
237. Adams PG, Lamoureux L, Swingle KL, Mukundan H, Montaña GA. Lipopolysaccharide-induced dynamic lipid membrane reorganization: Tubules, perforations, and stacks. *Biophys J.* 2014, 106(11):2395-2407.
238. Huppelsberg J und Walter K. Kurzlehrbuch Physiologie. *Thieme Verlag.* 2009, 3. Auflage.
239. Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, Klöcker N, Baumann R, Marti H. Taschenlehrbuch Physiologie. *Thieme Verlag.* 2010. 1. Auflage.
240. Eid M, Gollwitzer M, Schmitt M. Statistik und Forschungsmethoden. *Beltz Verlag.* 2017. 5. Auflage.
241. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010, 207(9):1853-1862.
242. Martinod K, Fuchs TA, Zitomersky NL, Wong SL, Demers M, Gallant M, Wang Y, Wagner DD. PAD4-deficiency does not affect bacteremia in

-
- polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood*. 2015, 125(12):1948-1956.
243. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, Hu J, Wang Y, Wagner DD. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013, 110(21):8674-8679.
244. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MKB. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*. 2003, 170(10):5268-5275.
245. Lotz M, Gütle D, Walther S, Ménard S, Bogdan C, Hornef MW. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2006, 203(4):973-984.
246. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy MJ, Salcedo R, Kastenmuller W, Deming C, Quinones M, Koo L, Conlan S et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*. 2012, 337(6098):1115-1119.
247. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol*. 2014, 104:15.25.1-15.25.14.
248. Denis CV, André P, Saffaripour S, Wagner DD. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(7):4072-4077.
249. Grässle S, Huck V, Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Aponte-Santamaría C, Baldauf C, Gräter F, Schneppenheim R, Obser T, Schneider SW. Von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014, 34(7):1382-1389.
250. Kasuda S, Matsui H, Ono S, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Hatake K, Sugimoto M. Relevant role of von Willebrand factor in neutrophil recruitment in a mouse sepsis model involving cecal ligation and puncture. *Haematologica*. 2016, 101(2):e52-4.
251. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced

-
- inflammation in high-fat-diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008, 57(6):1470-1481.
252. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, Corthesy I, Macé K, Chou CJ. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J*. 2008, 22(7):2416-2426.
253. Ascher S, Wilms E, Pontarollo G, Formes H, Bayer F, Müller M, Malinarich F, Grill A, Bosmann M, Saffarzadeh M et al. Gut microbiota restricts NETosis in acute mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020, 40(9):2279-2292.
254. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front Immunol*. 2019, 10:1068.
255. Thursby E und Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017, 474(11):1823-1836.
256. Kho ZY und Lal SK. The human gut microbiome-a potential controller of wellness and disease. *Front Microbiol*. 2018, 9:1835.
257. Zok C. The importance of the human intestinal microbiota. *Dtsch Med Wochenschr*. 2014, 139(24):1282-1283.
258. Schaubeck M, Clavel T, Calasan J, Lagkouvardos I, Haange SB, Jehmlich N, Basic M, Dupont A, Hornef M, von Bergen M et al. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut*. 2016, 65(2):225-237.
259. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018, 11(1):1-10.
260. Cheng Y, Ling Z, Li L. The intestinal microbiota and colorectal cancer. *Front Immunol*. 2020, 11:615056.
261. Yang Y, Du L, Shi D, Kong C, Liu J, Liu G, Li X, Ma Y. Dysbiosis of human gut microbiome in young-onset colorectal cancer. *Nat Commun*. 2021, 12(1):6757.
262. Sikalidis AK und Maykish A. The gut microbiome and typ 2 diabetes mellitus: Discussing a complex relationship. *Biomedicines*. 2020, 8(1):8.

-
263. Das T, Jayasudha R, Chakravarthy S, Prashanthi GS, Bhargava A, Tyagi M, Rani PK, Pappuru RR, Sharma S, Shivaji S. Alterations in the gut bacterial microbiome in people with type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2021, 11(1):2738.
264. Ma J und Li H. The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Front Pharmacol.* 2018, 9:1082.
265. Anto L und Blesso CN. Interplay between diet, the gut microbiome, and atherosclerosis: Role of dysbiosis and microbial metabolites on inflammation and disordered lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 2022, 105:108991.
266. Lässig-Herfurth A, Pontarollo G, Grill A, Reinhardt C. The gut microbiota in cardiovascular disease and arterial thrombosis. *Microorganisms.* 2019, 7(12):691.
267. Schroeder BO und Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med.* 2016, 22(10):1079-1089.
268. Largiadèr F, Saeger H-D, Keel M, Bruns C. Checkliste Chirurgie. *Thieme Verlag.* 2016, 11. Auflage.
269. Walker TG. Mesenteric ischemia. *Semin Intervent Radiol.* 2009, 26(3):175-183.
270. Harward TR, Brooks DL, Flynn TC, Seeger JM. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. *J Vasc Surg.* 1993, 18(3):459-467.
271. Cicalese L, Billiar TR, Rao AS, Bauer AJ. Interaction between ischemia/reperfusion-induced leukocyte emigration and translocating bacterial enterotoxins on enteric muscle function. *Transplant Proc.* 1997, 29(3):1815.
272. Kvietys PR und Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2012, 52(3):556-592.
273. Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017, 7:373.
274. Tahir M, Arshid S, Fontes B, Castro MS, Luz IS, Botelho KLR, Sidoli S, Schwämmle V, Roepstorff P, Fontes W. Analysis of the effect of intestinal

-
- ischemia and reperfusion on the rat neutrophils proteome. *Front Mol Biosci.* 2018, 5:89.
275. Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, Otani K, Tanigawa T, Fujiwara Y. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr.* 2018, 63(1):26-32.
276. Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, Jiménez-Alcázar M, Klinke M, Vincent D, Tiemann B, Bergholz R, Reinshagen K, Fuchs TA. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Sci Rep.* 2017, 7(1):15377.
277. Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, De Meyer SF, Gallant M, Erpenbeck L, Brill A, Wang Y, Wagner DD. VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood.* 2014, 123(1):141-148.
278. Kaczorowski DJ, Nakao A, Vallabhaneni R, Mollen KP, Sugimoto R, Kohmoto J, Zuckerbraun BS, McCurry K, Billiar TR. Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart. *Transplantation.* 2009, 87(10):1455-1463.
279. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012, 10(1):136-144.
280. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, Bilyy R, Krenn V, Renné C, Renné T et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 2017, 358(6367):1202-1206.
281. Santocki M und Kolaczowska E. On neutrophil extracellular trap (NET) removal: What we know thus far and why so little. *Cells.* 2020, 9(9):2079.
282. Brown MF, Ross 3rd AJ, Dasher J, Turley DL, Ziegler MM, O'Neill Jr JA. The role of leukocytes in mediating mucosal injury of intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg.* 1990, 25(2):214-216.
283. Komatsu S, Berg RD, Russell JM, Nimura Y, Granger DN. Enteric microflora contribute to constitutive ICAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000, 279(1):G186-91.

-
284. Arndt H, Palitzsch KD, Grisham MB, Granger DN. Metronidazol inhibits leukocyte-endothelial cell adhesion in rat mesenteric venules. *Gastroenterology*. 1994, 106(5):1271-1276.
285. Komatsu S, Panés J, Grisham MB, Russell JM, Mori N, Granger DN. Effects of intestinal stasis on intercellular adhesion molecule 1 expression in the rat: Role of enteric bacteria. *Gastroenterology*. 1997, 112(6):1971-1978.
286. Suriguga S, Luangmonkong T, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P. Host microbiota dictates the proinflammatory impact of LPS in the murine liver. *Toxicol In Vitro*. 2020, 67:104920.
287. van der Hoven B, Nabuurs M, van Leengoed LA, Groeneveld AB, Thijs LG. Gut luminal endotoxin reduces ischemia-reperfusion injury of the small gut in germ-free pigs. *Shock*. 2001, 16(1):28-32.
288. van der Hoven B, Groeneveld ABJ, Thijs LG. Luminal endotoxin modifies reaction to gut ischaemia-reperfusion injury in the pig. *Br J Surg*. 2000, 87(7):961-962.
289. Hu J, Deng F, Zhao B, Lin Z, Sun Q, Yang X, Wu M, Qiu S, Chen Y, Yan Z et al. Lactobacillus murinus alleviate intestinal ischemia/reperfusion injury through promoting the release of interleukin-10 from M2 macrophages via Toll-like receptor 2 signaling. *Microbiome*. 2022, 10:38.
290. Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators Inflamm*. 2010, 2010:704202.
291. Fernández ED, Flohé S, Siemers F, Nau M, Ackermann M, Ruwe M, Schade FU. Endotoxin tolerance protects against local hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Endotoxin Res*. 2000, 6(4):321-328.
292. Cavaillon J-M und Adib-Conquy M. Bench-to-beside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006, 10(5):233.
293. Ogawa H, Rafiee P, Heidemann J, Fisher PJ, Johnson NA, Otterson MF, Kalyanaraman B, Pritchard Jr KA, Binion DG. Mechanisms of endotoxin tolerance in human intestinal microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2003, 170(12):5956-5964.
294. Hernández-Chirlaque C, Aranda CJ, Ocón B, Capitán-Cañadas F, Ortega-González M, Carrero JJ, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina

-
- F, Martínez-Augustín O. Germ-free and antibiotic-treated mice are highly susceptible to epithelial injury in DSS colitis. *J Crohn Colitis*. 2016, 10(11):1324-1335.
295. Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IqI/Jic mice. *Exp Anim*. 2001, 50(5):387-395.
296. Kawai T und Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther*. 2005, 7(1):12-19.
297. Wang J, He G-Z, Wang Y-K, Zhu Q-K, Chen W, Guo T. TLR4-HMGB1-, MyD88- and TRIF-dependent signaling in mouse intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2015, 21(27):8314-8325.





Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Materialien) in der Arbeit angegeben.

Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ort, Datum

Stefanie Anna Ascher