

Untersuchung des Einflusses der Darmmikrobiota
auf das Transkriptom sinusoidaler
Leberendothelzellen im C57BL/6J Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Henning Formes

geb. in Wiesbaden

Mainz 2021

Für meine Familie

Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin Mainz

und

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

Dekan:

Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Ort, Datum

Henning Formes

Abstract

The gut microbiota affects host function but the impact on organotypic endothelial cell (EC) transcriptomes remains unexplored. The liver endothelium encounters microbiota-derived signals and metabolites via the portal circulation. To analyse how gut microbiota affect the hepatic sinusoidal endothelium, a magnetic cell sorting protocol, combined with fluorescence-activated cell sorting, was used to isolate hepatic sinusoidal endothelial cells from germ-free (GF) and conventionally raised (CONV-R) mice for transcriptomic analysis by RNA sequencing. This resulted in a map of microbiota-regulated hepatic endothelial-specific transcriptome profiles. Gene Ontology analysis showed many functional processes in the hepatic endothelium. The absence of microbiota influenced the expression of genes which were part of the cholesterol flux and angiogenesis. Mainly genes functioning in hepatic endothelial sphingosine metabolism and the sphingosine-1-phosphat showed an increased expression in GF samples. The present work analyses the role of the microbiota in the transcriptional landscape of the hepatic endothelium.

Zusammenfassung

Die Darmmikrobiota hat einen Einfluss auf die Organfunktion im menschlichen Organismus. Der Einfluss der Mikrobiota auf organotypische Endothelzellen (EC) ist zum aktuellen Zeitpunkt unerforscht. Das gesamte Leberendothel nimmt von der Darmmikrobiota abgegebene Signal und Metaboliten über den Pfortaderkreislauf auf. Um herauszufinden, wie das Darmmikrobiom die hepatischen sinusoidalen Leberendothelzellen beeinflusst, wurde ein magnetisches Zellsortierungsprotokoll mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung verwendet. Bei den untersuchten Versuchsgruppen handelte es sich um keimfreie (GF) und konventionell aufgewachsenen Mäusen (CONV-R) aus denen die Leber herauspräpariert und Endothelzellen isoliert wurden, um eine Transkriptomanalyse auf RNA Ebene durchzuführen. Die RNA-Sequenzierung führte zu einer großen Anzahl an hoch- und herunterregulierten Transkripten in den Versuchsgruppen GF und CONV-R. Eine Analyse der genetischen Ontologie ergab, dass mehrere funktionelle Prozesse im hepatischen Leberendothel betroffen waren. Das nicht vorhandensein der Mikrobiota beeinflusst die Expression von einzelnen Genen, die am Gallensäure-Cholesterin Metabolismus und an der Angiogenese beteiligt sind. Vor allem Gene, die im hepatischen endothelialen Sphingosin Stoffwechsel und Sphingosin-1-Phosphat vorhanden waren, zeigten eine erhöhte Expression in GF Mäusen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen eine besondere Rolle der Mikrobiota auf das hepatische Leberendothel.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Relevanz	14
2 Theoretische Grundlagen.....	15
2.1 Übersicht des Verdauungssystems	15
2.2 Mikrobiota – Besiedelung des Magen-Darm-Trakts.....	21
2.3 Einfluss von Mikroorganismen auf die angeborene Immunantwort	24
2.4 Die Leber.....	25
2.4.1 Die Pfortader – Versorgung der Leber	25
2.4.2 Funktion und Aufbau der Leber.....	25
2.4.3 Hepatozyten.....	29
2.4.4 Leberendothelzellen.....	30
2.5 Gnotobiotik	32
2.5.1 Morphologie keimfreier Mäuse	33
2.6 Next Generation Sequencing	34
2.6.1 RNA-Sequenzierung.....	35
3 Zielsetzung	37
4 Mäuse, Material und Methoden.....	38
4.1 Mauslinien	38
4.2 Geräte	38
4.3 Software	40

4.4	Verbrauchsmaterial	41
4.5	Kits	42
4.6	Puffer.....	43
4.7	Chemikalien.....	44
4.8	Medium.....	47
4.9	Antikörper	48
4.10	Bakterien	48
4.11	Primer.....	49
4.11.1	qPCR-Primer.....	49
4.12	Methoden	50
4.13	Mäuse.....	50
4.14	Mikrobenstämme	50
4.15	Entnahme der Mausleber	50
4.15.1	Isolierung von Leberendothelzellen über magnetische Zellseparation	51
4.16	RNA-Isolierung	52
4.16.1	Reverse Transkription/cDNA-Synthese.....	53
4.16.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	54
4.17	Transkriptomamplifizierung und RNA-Sequenzierung.....	55
4.18	Gene set enrichment Analyse	57
4.19	Western Blot.....	57
5	Ergebnisse	59
5.1	Untersuchung des Transkriptoms von Leberendothelzellen GF und CONV-R Mäusen mithilfe von FACS Sortierung	59
5.1.1	Hauptkomponentenanalyse zwischen GF und CONV-R.....	62

5.1.2	Untersuchung der differenziell exprimierten Gene (DEG) der Gruppen GF gegen CONV-R Mäuse.....	63
5.1.3	Gene set enrichment Analysis (GSEA) des Sphingosin Metabolismus (GSEA).....	72
5.1.4	Vergleichende Gen-Ontologie Analyse der Versuchsgruppen GF gegen CONV-R Mäuse.....	77
5.2	Untersuchung der relativen mRNA Expression für den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus und den Sphingosinmetabolismus in GF und CONV-R Mäusen	80
5.2.1	Untersuchung des Sphingolipid-Metabolismus und des Gallensäure-Cholesterin Metabolismus in kolonisierten Mäusen (CONV-D)	82
5.2.2	Untersuchung des Einflusses von <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> auf den Sphingosin-1-Phosphat Weg und den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus	84
5.3	Untersuchung des Proteins der lysosomal acid Lipase (LAL) in den Versuchsgruppen keimfrei und konventionell aufgewachsenen Mäusen.....	87
6	Diskussion	91
7	Fazit.....	99
8	Annex	101
8.1	Veröffentlichte Publikationen	101
8.2	Lebenslauf	103
9	Literatur	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht des Verdauungstrakts. Darstellung der einzelnen Bestandteile des Verdauungssystems	16
Abbildung 2 Aufbau des Dünndarms und Darstellung der einzelnen Schichten des Dünndarms.....	18
Abbildung 3 Aufbau und Verteilung der intestinalen Mikrobiota.....	22
Abbildung 4 Aufbau der Leber	29
Abbildung 5 Versuchsaufbau und eine Übersicht.....	59
Abbildung 6 Sortieren der Leberendothelzellen mit einem FACS.....	60
Abbildung 7 Darstellung der Anzahl an sortierten Zellen	61
Abbildung 8 Hauptkomponentenanalyse keimfrei (GF) gegen konventionell aufgewachsene Mäuse (CONV-R).	62
Abbildung 9 Vulkanplot von Keimfrei (GF) gegen Konventionell aufgewachsenen Mäusen (CONV-R), der signifikantesten regulierten differenziell exprimierten Gene.	66
Abbildung 10 Heatmap der Top 50 regulierten Gene zwischen keimfrei (GF) und konventionell (CONV-R)	67
Abbildung 11 Gene- set enrichment Analse der KEGG Signalwege	73
Abbildung 12 Visualisierung des KEGG-Signalwegs des Sphingolipid-Metabolismus	74
Abbildung 13 GSEA Verteilung der log ₂ FC von Genen, die signifikant verändert sind	75
Abbildung 14 GSEA Diagramm für den Sphingolipid Metabolismus.....	76
Abbildung 15 Gen-Ontologie Analyse der hochregulierten Genfunktionen im Vergleich von GF Mäusen gegen CONV-R Mäusen	78

Abbildung 16 Gen-Ontologie Analysen der herunterregulierten Genfunktionen im Vergleich von GF Mäusen gegen CONV-R Mäusen	79
Abbildung 17 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene <i>Abcg2</i> , <i>S1pr1</i> , <i>Acer2</i> und <i>Sgms1</i>	81
Abbildung 18 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene <i>Slc10A6</i> , <i>Lipa</i> und <i>Tsc22d1</i>	81
Abbildung 19 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene <i>Slc10A6</i> , <i>Lipa</i> und <i>Tsc22d1</i>	83
Abbildung 20 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene <i>Abcg2</i> , <i>S1pr1</i> , <i>Acer2</i> und <i>Sgms1</i>	83
Abbildung 21 Überprüfung der Kolonisierung keimfreier Mäuse mit <i>B.thetaiotamicron</i>	85
Abbildung 22 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene <i>Slc10A6</i> , <i>Lipa</i> und <i>Tsc22d1</i>	86
Abbildung 23 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene <i>Abcg2</i> , <i>S1pr1</i> , <i>Acer2</i> und <i>Sgms1</i>	86
Abbildung 24 Proteinanalyse der Lysosomal acid lipase (LAL)	88
Abbildung 25 Untersuchung des relativen Gehalts an Lysosomal acid lipase (LAL) in totalen Leberlysaten mittels Western Blot.....	88
Abbildung 26 Untersuchung des Proteins der Lysosomal acid lipase	89
Abbildung 27 Darstellung der normalisierten LAL Proteinkonzentration	90
Abbildung 28 Signalweg Spingomyelin.....	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht Zellen im Darmlumen.....	20
Tabelle 2 Mauslinie.....	38
Tabelle 3 Geräte.....	40
Tabelle 4 Software.....	40
Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle 6 Kits.....	42
Tabelle 7 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen.....	44
Tabelle 8 Chemikalien	47
Tabelle 9 Verwendete Medien	47
Tabelle 10 Antikörper	48
Tabelle 11 Verwendete Bakterien.....	48
Tabelle 12 qPCR Primer.....	49
Tabelle 13 DNase I Inkubations Mix.....	52
Tabelle 14 Schema cDNA-Synthese	53
Tabelle 15 cDNA-Synthese Protokoll	54
Tabelle 16 Pipettierschema quantitative PCR	55
Tabelle 17 Programm quantitative PCR	55
Tabelle 18 Darstellung der hochregulierten Gene in CONV-R Mäusen.....	68
Tabelle 20 Darstellung der hochregulierten Gene in keimfreien Mäusen	71

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complementary DNA
CONV-R	<i>Conventionally-raised</i> , konventionell-aufgewachsene Mäuse
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EtOH	Ethanol
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
for	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GF	<i>Germ-free</i> , keimfrei
HSP	Heat shock protein
LTA	Lipoteichonsäure, TLR2/TLR4-Agonist
LPS	Lipopolysaccharid, TLR4-Agonist
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
MAMP	Microbe-associated molecular pattern
min	Minute

MM	Mastermix
mRNA	Messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> , Pathogen-assozierte molekulare Muster
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEB	Protein Extraction Buffer
PKC	Protein Kinase C, Serin/Threonin Kinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , Mustererkennungszepetor
rel. GE	Relative Genexpression
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i> , kurzkettige Fettsäuren
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts
SMAD	<i>Similar to Mothers Against Decapentaplegic homolog</i> , Wachstumsfaktor
SuFu	<i>Supressor of Fused</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter- inducing Interferon-β</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i> , TLR-Adaptermolekül

TLR1	Toll-like Rezeptor 1
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TLR6	Toll-like Rezeptor 6
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
WTA	Whole transcriptome amplification
WT	wild type
V	Volt
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1 Relevanz

Im menschlichen Organismus spielen Darmbakterien in der Regulation von Stoffwechselprozessen und der Ausprägung der angeborenen Immunantwort eine große Rolle. Einzelne Bestandteile kommensaler Darmbakterien, werden durch Mustererkennungsrezeptoren, zu denen auch die Toll-like Rezeptoren gehören, erkannt. Dabei werden Signalwege aktiviert, die zu einem Anstieg der Genexpression verschiedener proinflammatorischer Proteine führen. Die im Darm enthaltenen Mikrobiota hat unter anderem einen Einfluss auf die Regulation von Stoffwechselwegen über verschiedene Mustererkennungsrezeptoren. In dieser Arbeit soll die Verbindung zwischen der kommensale Mikrobiota und der Regulation des Transkriptoms des sinusoidalen Leberendothels untersucht werden. Auf diese Weise soll die Bedeutung der Darmmikrobiota in der Kommunikation der Organe Darm und dem Kapillarnetzwerk der Leber verdeutlicht werden. Hierbei lag der Fokus auf der Isolation einer reinen Zellpopulation an Endothelzellen aus der Leber der Maus. Über die erfolgreiche Isolation von RNA sollte eine RNA-Sequenzierung durchgeführt werden, um die enthaltenen Gene auf eine Mikrobiota-Abhängigkeit zu untersuchen.

2 Theoretische Grundlagen

Die Oberflächen des menschlichen Körpers beherbergen eine große Anzahl an Mikroorganismen (1). Diese mikrobiellen Gemeinschaften (Mikrobild) unterscheiden sich in ihrer Diversität. Sie bestehen aus Bakterien, Archaeen, Eukaryoten, Parasiten und Viren (2). Die Bakterien sind dabei die größte Gruppe (ca.90 %). Die überwiegende Mehrheit dieser Bakterien wird den zwei Stämmen der Gram-negativen *Bacteroiden* und der Gram-positiven *Firmicuten* zugeordnet (3). Das Mikrobiom spielt eine große Rolle in der Beeinflussung metabolischer Prozesse und der Ausprägung von Immunfunktionen (1). Für metabolischen Prozesse benötigt der Organismus Energie in Form von Nahrung, die unter anderem durch Bakterien des Wirtes in einzelne Glykanstrukturen gespalten werden (4). Die aufgenommene Nahrung hat einen sehr großen Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms und wird somit maßgeblich durch unsere Ernährung bestimmt.

2.1 Übersicht des Verdauungssystems

Der menschliche Magen-Darm-Trakt (MDT) erstreckt sich vom Mund bis zum Darmausgang. Dieses System dient dazu Nahrung aufzunehmen, zu verdauen, weiterzuleiten und in verwendbare Nährstoffe zu assimilieren. Der Magen-Darm-Trakt wird in folgende Abschnitte unterteilt: Der obere Verdauungstrakt besteht aus Mund-Rachenraum, Speiseröhre, Magen und Duodenum (5). Der untere Verdauungstrakt teilt sich in Dünndarm, Dickdarm, Sigmoid und Rektum. Außerdem gehören Drüsen zum Verdauungssystem, die durch ihre Sekrete beim Aufschluss der Nahrung helfen (5). Hierbei handelt es sich um die Speicheldrüse, Magendrüse, Darmdrüse, Bauchspeicheldrüse und die Leber. Aufgenommene Nahrung wird über den Mund durch die Zähne mechanisch zerkleinert (6). Der im Mund hinzugefügte Speichel,

2 Theoretische Grundlagen

erhöht zum einen die Gleitfähigkeit der Nahrung und zum anderen enthält der Speichel Enzyme (z. B. Amylase), die bei der Spaltung von Kohlenhydraten eine Rolle spielen. Der Speichel besteht zu 99,5 % aus Wasser und zu 0,5 % aus gelösten Stoffen wie Natrium oder Kalium. Im Schnitt werden täglich etwa 1000 – 1500 mL gebildet. Über die Mundhöhle gelangen die Nahrungsbestandteile weiter in den Pharynx und Enden im Ösophagus (6). Der Ösophagus ist Bestandteil des Rumpfdarms. Dieser Bereich dient nur als Transportweg in den Magen, wo die endgültige enzymatische Aufspaltung der Nahrung in Nährstoffe (Aminosäuren, Zucker, Lipide) stattfindet, die dann zusammen mit Ionen und Wasser resorbiert werden. Die Endstrecke des Rumpfdarms, Rektum und Analkanal, dienen der Zwischenlagerung unverdaulicher Nahrungsbestandteile (Ballaststoffe) und deren kontrollierter Ausscheidung (Defäkation; **Abbildung 1**).

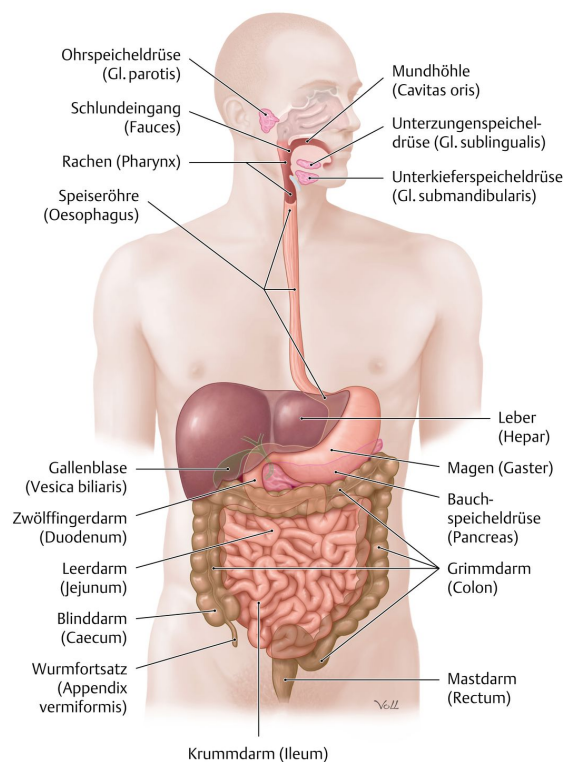


Abbildung 1 Übersicht des Verdauungstrakts. Darstellung der einzelnen Bestandteile des Verdauungssystems (7).

Anschließend gelangt dieser Speisebrei in den Dünndarm (*Intestinum tenue*), wo der größte Anteil des enzymatischen Nahrungsaufschlusses und der Resorption von Nährstoffen stattfindet (**Abbildung 1**). Die Resorption von Nährstoffen geschieht durch Diffusion, Osmose und dem aktiven Transport einzelner Moleküle. Das Ziel dieser chemischen und mechanischen Verdauungsphasen ist es, die Nahrung in eine Form zu spalten, welche durch die Zellen des Epithels gelangen und durch die Blut- und Lymphgefäße weiter transportiert werden. Folgende Nährstoffe spielen für den menschlichen Organismus eine wichtige Rolle: Monosaccharide (z. B.: Glucose, Fructose und Galaktose aus Kohlenhydraten); Aminosäuren, Dipeptide und Tripeptide aus Proteinen; Fettsäuren, Glycerin und Monoglyceride aus Triglyceriden. Für die Resorption von Fetten wird Gallenflüssigkeit aus den Hepatozyten benötigt. Beim Menschen kann der Dünndarm zwischen drei und fünf Metern lang werden und gliedert sich in folgende drei Abschnitte: Duodenum, Jejunum und Ileum. Vereinfacht betrachtet ist der Darm ein langer Schlauch, wobei der Aufbau der Wände an verschiedenen Stellen Unterschiede aufweist. Generell existiert ein Grundkonzept für den Aufbau des Darms. Dieser Aufbau besteht aus einem Hohlraum (Lumen) und wird durch eine Epithelschicht (*Lamina epithelialis mucosae*) begrenzt. Die Funktion der Epithelschicht besteht in der Absorption von Nährstoffen, Elektrolyten, Fette, Eiweiße und Wasser. Unter der Epithelschicht befindet sich lockeres Bindegewebe (*Lamina propria mucosae*), das Blut- und Lymphkapillaren, enterische Neuronen, Immunzellen und eine dünne Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*) enthält. Diese Schicht ist wichtig für die Regulation der Funktionen des MDT sowie dessen Immunfunktion. Eine weitere Schicht lockeren Bindegewebes mit größeren Gefäßen und kleineren Drüsen stellt die Submukosa dar. Zwei Muskelschichten, eine innere Ring- und eine äußere Längsmuskelschicht, bilden die *Muscularis*. Diese Schicht ermöglicht die Beweglichkeit (Motilität, Peristaltik; **Abbildung 2**).

2 Theoretische Grundlagen

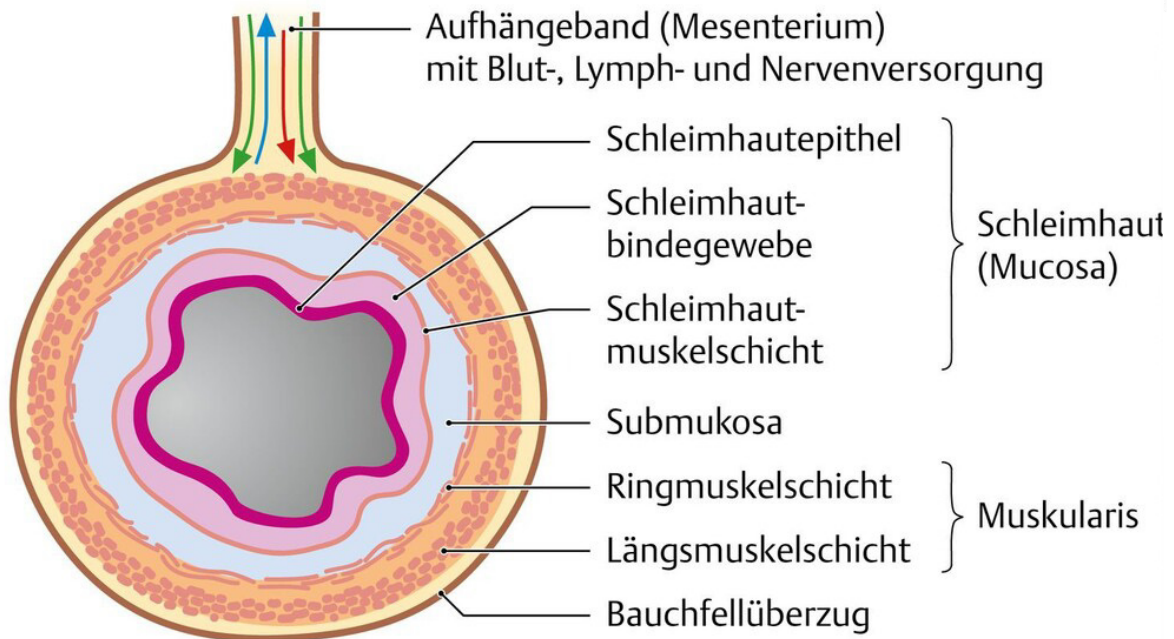


Abbildung 2 Aufbau des Dünndarms und Darstellung der einzelnen Schichten des Dünndarms.

Die Längsmuskulatur führt zu einer Verkürzung des Darms, die Ringmuskulatur verengt das Darmlumen. Die beiden Leitungsbahnen *Plexus myentericus* (Auerbach Plexus) und *Plexus submucosus* (Meissner Plexus) bilden das darmeigene (enterische) Nervensystem (7).

Insbesondere die Dünndarmschleimhaut (*Tunica mucosa*) besitzt eine sehr spezifische Abwehreigenschaft. Die Schichten der *Tunica muscularis* sind im Dünndarm stärker ausgeprägt als in anderen Darmabschnitten. Neben dem Transport ist die *Tunica muscularis* zum anderen auch für die Durchmischung des flüssigen Speisebreis im gesamten Dünndarm zuständig. Der Aufbau der *Tunica mucosa* folgt dem gleichen Grundbauplan in Duodenum, Jejunum und Ileum. Die zahlreichen Schleimhautfalten, *Plicae circulares* (Kerckring-Falten), sind schon mit dem bloßen Auge sichtbar und bilden ca. 2/3 des Umfangs der Duodenalwand. Den *Plicae circulares*, die von der *Tela submucosa* aufgeworfen werden, sitzen pro mm² etwa 10 – 40 zungenförmige Zotten (*Villi intestinales*) auf. Die Zotten, etwa 0,2 – 1 mm hoch und 0,15 mm dick, dienen der Resorption von Nährstoffen aus dem Darmlumen. Der Aufbau einer Zotte besteht aus dem Bindegewebe der *Lamina propria mucosae*, in der sich einzelne glatte Muskelzellen (Zottenpumpen), mehrere Arteriolen, eine zentrale

Venole sowie Lymphkapillaren befinden. In den Lymphkapillaren werden die durch die Fettverdauung gebildeten Chylomikronen transportiert. Bei Chylomikronen handelt es sich um Lipoproteine, die für den Transport von Nahrungsfetten aus dem Dünndarm in das Blutsystem benötigt werden. Hierbei geht es um Triglyceride und fettlösliche Vitamine wie A, D oder E. Am Ende der Zotten sind kurze, schlauchförmige Darmdrüsen (*Glandulae intestinales*) zu finden. Diese Darmdrüsen werden auch Krypten genannt. Somit kommen auf eine Zotte mehrere Krypten, die hauptsächlich der Sekretion und der Regeneration des Darmepithels dienen. Die einzelnen Zellen des Dünndarmepithels sind sehr teilungsaktiv. Die Krypt-Villus Einheit wird alle 24 - 72 Stunden vollständig erneuert (**Tabelle 1**). Dabei wandern die neugebildeten Zellen in die Villuszone und werden an den Zottenspitzen in das Darmlumen abgestoßen.

2 Theoretische Grundlagen

Zelltyp	Funktion
Enterozyten	Hochprismatische Epithelzellen (15-30 μM hoch, 5–10 μM dick), deren apikale Zelloberfläche mit einem Mikrovillisaum versehen ist. Dieser Bürstensaum enthält zahlreiche Enzyme, die für den Abbau von Kohlenhydraten (Disaccharide) und Peptide benötigt werden. Der Bürstensaum ermöglicht eine 15-fache Vergrößerung der Oberfläche.
Becherzellen	Becherzelle sind verstreut in den Zotten. Sie sezernieren Muzine, die als Gleitfilm für den Nahrungsbrei fungieren. Außerdem schützen sie das Darmepithel vor Verdauungsenzymen.
Bürstenzellen	Bürstenzellen sind im gesamten Darmepithel zu finden. Diese enthalten einzelne Mikrovilli, die Dehnungs- und Chemorezeptoren enthalten.
Paneth-Zellen	Paneth-Zellen sind in den Krypten zu finden und enthalten Lysozym als auch Enzyme für den Fett- und Proteinabbau.
Enteroendokrine Zellen	Enteroendokrine Zellen regeln durch Sekretion der Peptidhormone Gastrin, Sekretin und Choleystokinin die Sekretionsrate. Diese werden in enterochromaffine Zellen und Polypeptidbildene Zellen unterteilt.

Tabelle 1 Übersicht Zellen im Darmlumen. Darstellung der wichtigsten Zelltypen und deren Funktion (Eigenschaft) im Dünndarm.

Der Darm bildet eine intestinale Barriere und ist die größte Grenzfläche im Organismus. Diese Barriere besteht aus dem Epithel und der Schleimhautschicht. Diese Darmschleimhaut ist in einem permanenten Kontakt mit Fremd- und Schadstoffen, Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten aus der Umwelt. Eine Schädigung des Darmepithels wird durch den Muzin-Schutzfilm verhindert. Weitere unspezifische Mechanismen für einen wirksamen Schutz vor schädlichen Substanzen sind, die Abtötung von Mikroorganismen durch die Salzsäure des Magens, die Lyse

von Bakterien durch α -Defensine oder ROS aus den Panethzellen, enzymatischer Abbau, Detergenzwirkung der Gallensäure und antibakterielle Wirkung von β -Defensinen und Cathelicidinen des Darmepithels.

2.2 Mikrobiota – Besiedelung des Magen-Darm-Trakts

Die Summe aller Bakterien und Mikroorganismen, die im Darm angesiedelt sind, wird als Mikrobiota bezeichnet. Insgesamt enthält der Darm mehr Mikroorganismen und Bakterien als der menschliche Körper Zellen hat. Die Anzahl an Organismen wird auf 10^{14} geschätzt (8). Dies entspricht einem Gewicht von 1,5 - 2 kg Biomasse. Im menschlichen Organismus wurden zum heutigen Stand 1200 verschiedene Bakterienspezies identifiziert (2, 9-12). Im Darm eines Menschen werden im Durchschnitt 160 Arten gefunden. Die Bakterienspezies gliedern sich in die fünf Hauptstämme *Clostridien*, *Firmicuten*, *Actinobakterien*, *Proteobakterien* und *Verrucomicrobia*. Das bakterielle Genom kodiert rund die 500-fache Anzahl an Genen im Vergleich zu dem des Menschen (13). Die Zusammensetzung der Mikrobiota variiert entlang des Dünndarms. Dagegen ist eine geringere Diversität der Bakterien, um Duodenum und Jejunum zu sehen. Der Dickdarm stellt wiederum das am dichtesten besiedelte mikrobielle Ökosystem dar (**Abbildung 3**).

2 Theoretische Grundlagen

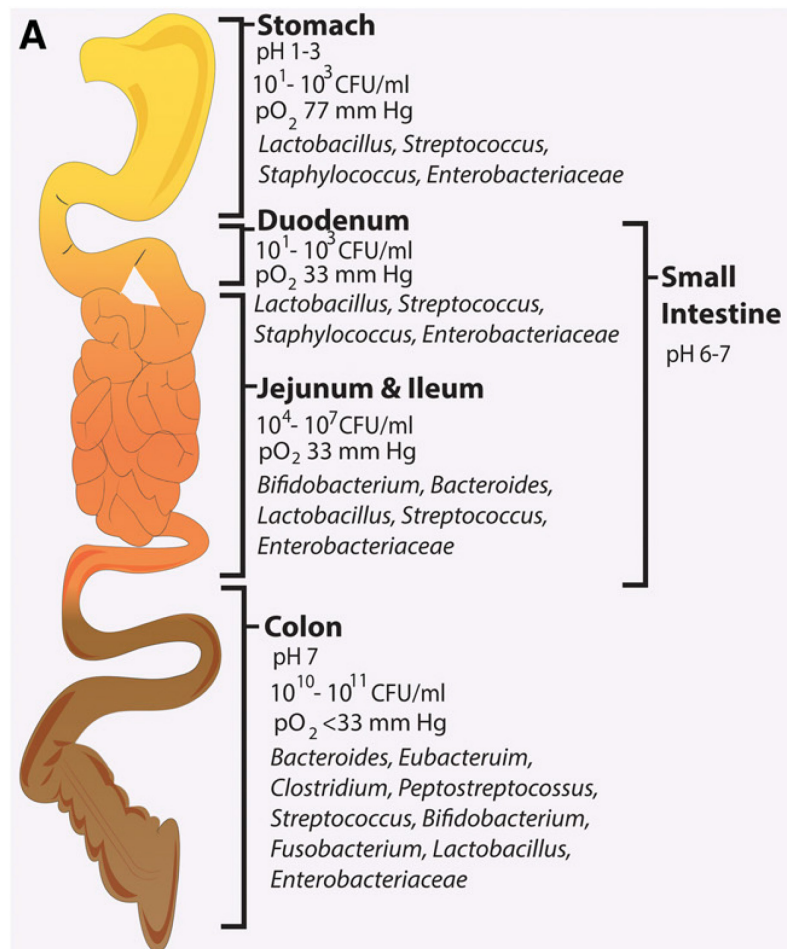


Abbildung 3 Aufbau und Verteilung der intestinalen Mikrobiota. Vom Magen bis zum Dickdarm nimmt die Diversität exponentiell zu. Die höchste Bakteriendichte ist im Dickdarm zu finden. Die Sauerstoffpartialbrüche entlang des Magen-Darm-Trakts nehmen vom Magen zum Dickdarm hin ab und tragen dazu bei, dass sich metabolische Nischen bilden können (14).

Die intestinale Mikrobiota wird durch folgende Faktoren wie Geburtsvorgang, Ernährung, Gesundheitszustand, Lebensumfeld und Medikamente beeinflusst und zeigt dadurch einen immer wiederkehrenden Einfluss in der Zusammensetzung und der Funktionalität der Mikroorganismen. In keimfreien Mausexperimenten wurde die Funktion der Mikrobiota untersucht und zeigt, dass die intestinale Mikrobiota eine wichtige Rolle in der Vorbeugung gastrointestinaler Infektionen spielt und zudem die Entwicklung der Darmmorphologie, Darmbarriere und des Immunsystems (15, 16) entscheidend beeinflusst. Unter anderem werden die Nährstoffversorgung und metabolische Funktionen durch die intestinale Mikrobiota reguliert (17, 18).

Die Interaktion zwischen dem Wirt und der intestinalen Mikrobiota erfolgt durch eine gleichwertige Lebensgemeinschaft, welches auch als Mutualismus bezeichnet wird. Dies führt dazu, dass die mikrobiellen Organismen vom Immunsystem toleriert werden und nur pathogene Erreger effektiv eliminiert werden. Das Gleichgewicht zwischen den Bakteriengemeinschaften und dem intestinalen Epithel kann nachhaltig gestört werden und resultiert in einer Dysbiose (19). In den letzten Jahren wurden folgende Krankheiten in Zusammenhang mit einer Dysbiose gebracht: Diabetes (20), Asthma (21), Schlaganfall (22) Darmkrebs (23), Adipositas (24), Arteriosklerose (25, 26) und kardiovaskuläre Erkrankungen (27). Diese Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiota besitzt die Fähigkeit, externe Störungen zu regenerieren (28). Die im Darm enthaltenen Bakterien setzen bei der Fermentierung von Kohlehydraten (29) und Proteinen (30) kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acids, SCFA*) frei, die essenziell für die Regulierung der Absorption von Wasser und der Abwehr von potenziellen pathogenen Organismen über die Kontrolle des pH Milieus sind. Die am meisten vorkommenden Fettsäuren sind die Essigsäure, die Propionsäure und die Buttersäure. Die Buttersäure enthält einen sehr großen Teil an Energie für das Epithelgewebe des Kolon (31) und hat einen großen Einfluss auf die intestinale Immunzellhomöostase (32, 33) sowie einen Effekt auf kardiovaskuläre Funktionen (34, 35). Untersuchungen haben gezeigt, dass Metaboliten der Darmmikrobiota in andere Regionen des Körpers transportiert werden (36-38) und dort einen Einfluss auf die Immunantwort und auch auf die Ausbildung von Kapillarstrukturen haben (39). Die Mukusschicht, die Epithelbarriere und die Gefäßbarriere verhindern die Translokation von Darmbakterien (40). Die bakteriellen Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) (41), Peptidoglycan, Flagellin oder andere strukturelle Komponenten werden als mikrobielle Muster (*microbe-associated molecular patterns, MAMPs*) bezeichnet und gelangen über die Darmbarriere in den Blutkreislauf.

2.3 Einfluss von Mikroorganismen auf die angeborene Immunantwort

Der menschliche Organismus ist ständig einer enormen Anzahl an Mikroorganismen ausgesetzt. Um erfolgreich zwischen pathogenen und apathogenen Mikroorganismen unterscheiden zu können, spielt dabei das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle. Hierbei erkennt das angeborene Immunsystem entsprechende Mikroorganismen über Mustererkennungsrezeptoren (*PRR, pattern recognition receptor*), zu denen auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören. Bei den TLRs handelt es sich um eine Gruppe von Transmembranproteinen, die eine hohe Ähnlichkeit zur Interleukin-Rezeptor-Familie haben. Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze setzen genetisch hoch konservierte Moleküle und Proteinstrukturen, sogenannte MAMPs (microbe associated molecular patterns) frei, die von den TLRs erkannt werden. Des Weiteren erkennen sie endogene Mediatoren wie Schadens assoziierte Moleküle (Interleukin-1, Defensine oder das Hitzeschockprotein), die während einer Stressreaktion von geschädigten, körpereigenen Zellen ausgeschüttet werden (42). Folgende Faktoren spielen bei den verschiedenen Signalwegen der TLRs eine entscheidende Rolle: NF- κ B (nuclearfactor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells), AP1 (Activator Protein 1) und verschiedene Interferone. Dies führt zu einem Konzentrationsanstieg proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-18 (IL-18) im Körper und einer Aktivierung von Effektorzellen des Immunsystems (43). Bis heute wurden insgesamt 13 TLRs untersucht und identifiziert (44-48). Ein Großteil der TLRs wird auf der Zelloberfläche exprimiert. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind dagegen im intrazellulären Raum in den Endosomen zu finden. Die TLRs werden in einer Vielzahl auf verschiedenen Zelltypen wie den neutrophilen Granulozyten (49), Monozyten und Endothelzellen (50), Fibroblasten, Immunzellen

(Makrophagen, B- und T-Zellen, dendritische Zellen) und Thrombozyten (51, 52) exprimiert. Erst durch die Kombination der verschiedenen TLRs wird die Erkennung einer hohen Anzahl an unterschiedlichen mikrobiellen Bestandteilen ermöglicht (53).

2.4 Die Leber

2.4.1 Die Pfortader – Versorgung der Leber

Die Pfortader (*Vena portae*) und die *Arteria hepatica propria* versorgen die Leber mit Blut. Die Pfortader ist in das Mesenterium eingebettet und sammelt das Blut aus den Bauchorganen wie Magen, Dünndarm, Dickdarm, Mastdarm, Bauchspeicheldrüse und der Milz. Diese führt das gesammelte Blut aus den Venen in die Leber. Durch den Zusammenschluss der Milzvene und der oberen Darmvene entsteht die Pfortader der Leber. An den einzelnen Leberläppchen werden beide Gefäße zu Kapillaren (Sinusoide) vereint, die anschließend entlang der Leberzellplatte zur Zentralvene verlaufen. Der Gefäßaufbau ist von großer physiologischer Bedeutung für die Leber. Entlang der Leberzellplatten wird stetig Sauerstoff transportiert und verbraucht. Somit treten bei einer Unterversorgung an Sauerstoff an der Leber Hypoxie-bedingte Schädigungen zuerst im Bereich der Zentralvene auf. Dagegen tritt bei einer Belastung der Leber mit Giftstoffen wie z. B. Ethanol eine Zentralvenen-ferne Reaktion auf, da durch den Metabolismus der Hepatozyten ein Abbau der Giftstoffe stattfindet.

2.4.2 Funktion und Aufbau der Leber

Die Leber bildet ein zentrales Stoffwechselorgan im menschlichen Organismus und ist entwicklungsbiologisch Bestandteil des Verdauungstraktes (54). Sie ist das wichtigste Organ des Intermediärstoffwechsels und macht 2–5 % des Körpergewichts aus. Die Leber ist zuständig für die Produktion der meisten Plasmaproteine (z. B. Albumin), Gerinnungsfaktoren, metabolisiert Arzneistoffe (z. B. Biokonversion, Xenobiotika-

2 Theoretische Grundlagen

Stoffwechsel, Alkoholabbau). Die im Darm resorbierten Stoffe gelangen über die Pfortader in die Leber und werden gegebenenfalls weitertransportiert. Dieser Vorgang wird in Bezug auf die Wirkungsweise von Medikamenten als First-Pass-Effekt beschrieben. Die Leber besitzt eine Vielzahl an unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen. Unter anderem speichern Leberzellen Nährstoffe wie Glykogen, Lipide, Vitamine (besonders Vitamin B12 und Vitamin A), Eisen und Mineralien und können diese kontrolliert dem menschlichen Organismus wieder zuführen. So kommt es vor, dass bei einer Hypoglykämie Leberzellen Glykogen abbauen und die Blutglukosekonzentration aufrechterhalten. Leberzellen können aus Lactat und einigen Aminosäuren Glukose bilden, dies wird Glukoneogenese genannt. Unter der Glukoneogenese versteht man einen Stoffwechselweg der Bildung von neuen Zuckermolekülen aus Nicht-Kohlenhydraten im Körper. Außerdem ist dieser Stoffwechselweg essenziell für die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutglucosespiegels. Daher werden die meisten Aminosäuren am Ende über die Leber abgebaut, mit der Ausnahme von Valin, Leucin und Isoleucin, die primär in der Skelettmuskulatur aufgenommen werden. Aus Fettsäuren bildet die Leber die Ketonkörper Azetazetat und β -Hydroxybutyrat. Diese werden als Substrat zur Versorgung des Gehirns benötigt (55).

Ferner besitzt die Leber eine Entgiftungsfunktion, die die Biotransformation und Exkretion von körpereigenen und körperfremden Substanzen ermöglicht (56). Hierbei hat der Harnstoffzyklus eine besondere Rolle, der zur Elimination von Ammoniak benötigt wird. Des Weiteren ist die Leber mit Ihrer Funktionalität auch am Hormonhaushalt beteiligt und ist ein wichtiger Produzent von Hormonvorstufen (Angiotensin, 25-Hydroxycholecalciferol) und Hormonen (Erythropoetin und Thrombopoietin (43)). Die in der Leber enthaltene Gallenflüssigkeit dient zum einen

der Exkretion von Stoffwechselprodukten und zum anderen der Emulgation von Fetten im Darm.

Die Leber bildet die größte exokrine Drüse des Körpers und ist zuständig für die Bildung und Sekretion der Galle. Die Gallenflüssigkeit wird im menschlichen Organismus für den Aufschluss und die Absorption von Nahrungsfetten aus dem Darm benötigt. Hierbei spielen neben den Phospholipiden besonders die Gallensäure, die in der Leber aus Cholesterol gebildet wird, eine wichtige physiologische Rolle. Die Gallensäure wird zusammen mit der Nahrung im Darm resorbiert, zur Leber zurückgeführt und von den Hepatozyten erneut in die Galle sezerniert. Dieser Vorgang wird auch enteropathischer Kreislauf genannt.

Bei der Leber handelt es sich um ein braunrotes Organ, welches sich intraperitoneal im rechten Oberbauch befindet und grenzt kranial an das Zwerchfell, kaudal an die Gallenblase, die rechte Kolonflexur, die rechte Niere, die rechte Nebenniere sowie medial an Ösophagus, Magen und Duodenum. Diese ist zum Großteil durch den Brustkorb geschützt. Die menschliche Leber kann ein Gewicht von 1400 – 1600 g erreichen und misst in der Medioklavikularlinie maximal 15 cm. Mit ihrer weichen Konsistenz wird die Form der Leber durch den Platz der anderen Organe im Bauchraum bestimmt. Die Leber unterteilt sich in vier Lappen. Der größere rechte Lappen (*Lobus dexter*) steht in Kontakt mit dem Zwerchfell und ist damit zum Teil verwachsen. Weitere Lappen sind der kleinere linke Lappen (*Lobus sinister*), der *Lobus caudatus* sowie der *Lobus quadratus* (**Abbildung 4**). Die Leber ist von Bindegewebe ummantelt, was sie mit anderen Organen wie dem Magen vernetzt. Dies verhindert zusammen mit den Venen ein Verrutschen im Bauchraum. Die Leber ist doppelt so afferent an den Blutkreislauf angeschlossen, damit die resorbierten Stoffe aus dem Darmlumen in die Leber gelangen und Stoffwechselprodukte durch den

2 Theoretische Grundlagen

Organismus weitergeleitet werden können. Durch die Pfortader (*Vena portae*) erhält die Leber sauerstoffarmes, jedoch nährstoffreiches Blut aus Richtung des Magen-Darm-Trakts, während die *Arteria hepatica properia* die Leber mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Innerhalb der Leber teilen sich die beiden Gefäßstränge immer weiter auf und enden in den Leberkapillaren, den sogenannten Sinusoiden. Diese leiten sauerstoffarmes Blut über Venen wieder zurück (siehe 2.4.1). Es verlässt die Leber durch die *Vena hepatica* und gelangt somit in die *Vena cava inferior*. Auf mikroskopischer Ebene wird die Leber in einzelne Läppchen unterteilt, die das Periportalfeld aus den Endästen der *Arteria hepatica*, *Vena portae* und der Gallengänge bilden. Jedes Leberläppchen weist eine Polygone Struktur auf. Die kleinsten Lebergefäße werden Sinusoide genannt und erhalten einen großen Anteil an Leberepithelzellen, sogenannte Hepatozyten, die für die Aufrechterhaltung der komplexen StoffwechsellLeistungen der Leber benötigt werden. Ein Sinusoid besteht aus vier Schichten. Innen liegen mononukleäre Zellen des Blutes (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) wie Kupfer-Zellen und Lymphozyten (natürliche Killerzellen (NK), T-Zellen und B-Zellen) (57, 58). Die darauffolgende Schicht wird aus Endothelzellen gebildet. Diese stehen in direkten Kontakt zu Kupferzellen. Die äußerste Schicht besteht aus Kollagenfibrillen. Der Bereich zwischen dem Lebersinusoid und den Hepatozyten wird als Disse-Raum bezeichnet (59, 60).

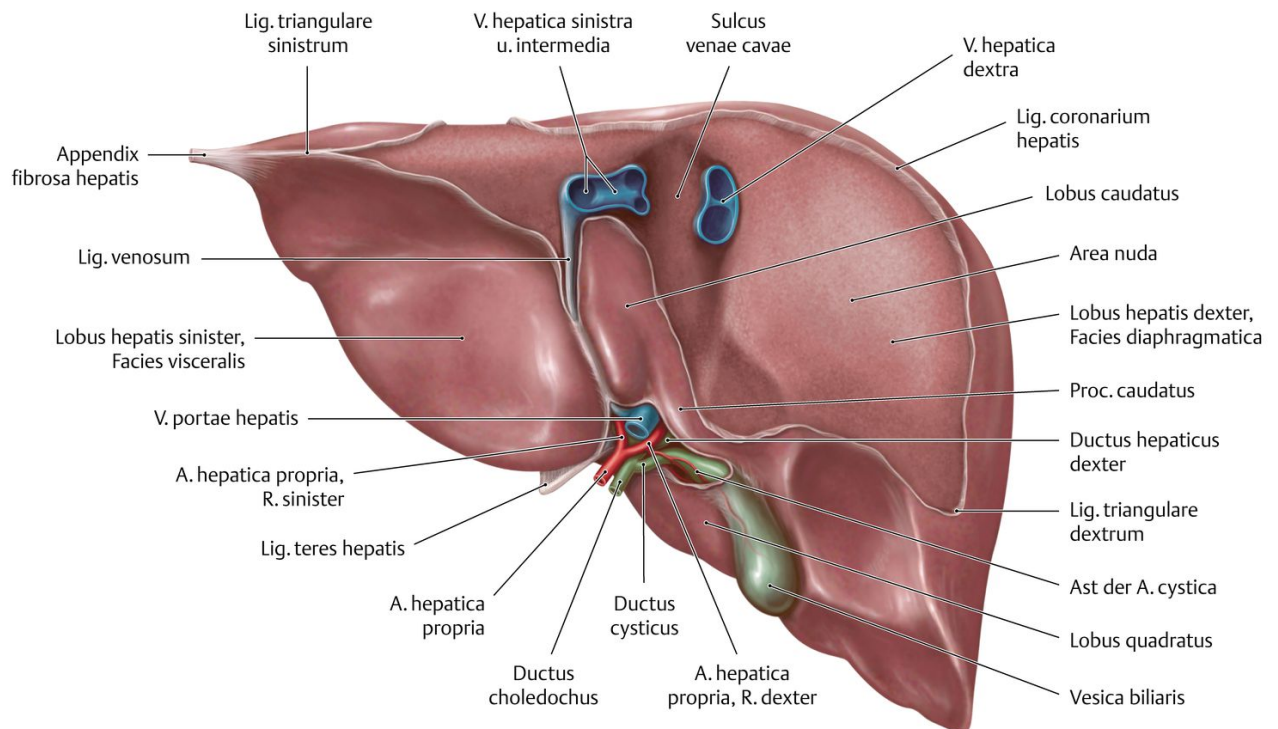


Abbildung 4 Aufbau der Leber. Darstellung des anatomischen Aufbaus der menschlichen Leber.

2.4.3 Hepatozyten

Bei Hepatozyten handelt es sich um 20–30 µm große Zellen, die sich plattenförmig anlagern (59) und über Gap Junctions miteinander verbunden sind. Hauptaufgabe der Hepatozyten ist die Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels. Sie synthetisieren die primären Gallensäuren, Cholsäure und Chenodesoxycholsäure aus Cholesterol. Die sekundären Gallensäuren wie Desoxycholsäure und Lithocholsäure werden von den Hepatozyten aus dem Blut aufgenommen. Der Unterschied zwischen primärer und sekundärer Gallensäure liegt in eine Dehydroxylierung, die durch die Dehydroxylaseaktivität von Darmbakterien verursacht wird. In Hepatozyten werden die Gallensäuren mit den beiden Aminosäuren Glycin und Taurin über eine Säureamidbindung konjugiert. Diese Konjugation sorgt für eine höhere Wasserlöslichkeit und schafft einen amphiphilen Charakter. Basolateral besitzen Hepatozyten eine sehr typische Ausstattung an Transportern und Kanälen. Dazu gehören vorrangig die primäre-aktive Na^+/K^+ -ATPase, Aminosäuren und

2 Theoretische Grundlagen

Glukosetransporter sowie K^+ und Cl^- -Kanäle. Hepatozyten exprimieren außerdem eine Reihe an spezifischen Transportern (Na^+ -Traurocholate-Cotransporting-Polypeptide (NTCP); Organic-Anion-Transporting-Polypeptide (OATP)), die für die Entgiftungs- und Stoffwechselfunktion von essenzieller Bedeutung sind. Sekundär konjugierte Gallensäure wird von den Hepatozyten in der dissoziierten Form als Gallensalz aufgenommen im Austausch von Na^+ oder im Antiport mit Cl^- . Unkonjugierte Gallensäuren können über Diffusion durch die Hepatozyten aufgenommen werden.

2.4.4 Leberendothelzellen

Endothelzellen sind Bestandteil von Blutgefäßen (61) und kleiden diese von innen aus (Intima). Somit dienen sie als Barriere zwischen Blut und Gewebe und verhindern den unregulierten Stoffaustausch. Während der Vasculogenese entstehen Endothelzellen bereits im frühen Embryo-Status und bilden die ersten Vorläufer der Blutgefäße (62). Durch die Angiogenese wachsen und verzweigen sich die Blutgefäße immer weiter. Im Gegensatz zu anderen Kapillaren besitzen die Endothelzellen der Sinusoide keine Basallamina. Generell gelten die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSECs) als die am meisten spezialisierten und permeablen Endothelzellen in Säugetieren (63).

Endothelzellen grenzen das Lumen von Blutgefäßen über den Disse-Raum zu den Hepatozyten ab, indem sie über interzelluläre Kreuzungen (64) miteinander verbunden sind. Diese besitzen Poren mit einem Durchmesser von 100–150 nm, die den Austausch zwischen Lumen und Disse-Raum ermöglichen und regulieren. Trotz Schwankungen des Blutdrucks durch die Verdauung halten die Endothelzellen diesen konstant. Dies geschieht über den intrahepatischen Scherungsstress, der über den Blutfluss auf die Endothelzellen wirkt. Um dem Scherungsstress entgegenzuwirken, kann die Endothelzelle Vasodilantien wie Prostaglandine synthetisieren, die zu einer Erweiterung der Gefäße führen. Dazu wird die Hochregulierung der Vasodilantien

mittels des Transkriptionsfaktors *Kruppel-like factor 2* (KLF15) eingeleitet. Ein Beispiel für ein endotheliales Vasodilatans ist Stickstoffmonoxid, welches aufgrund einer Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) durch den Scherungsstress verstärkt auftritt.

Eine weitere Aufgabe, die sich der Filtration anschließt, ist das Abbauen von ausgesiebten Stoffen. Dazu besitzen die LSECs eine der höchsten Kapazitäten für Endozytose im menschlichen Körper. Hauptsächlich werden die Stoffe über Clathrin vermittelte Endozytose abgebaut. Die LSECs sind ebenfalls am Transfer von Molekülen vom sinusoidalen Lumen in den Disse-Raum beteiligt, was als Transzytose bezeichnet wird. Weiterhin beeinflussen die LSECs Entzündungsreaktionen und sind Teil der Immunfunktion. Endothelzellen können Makromoleküle aus dem Blut entfernen, da sie über MHC-I und MHC-II-Moleküle zelluläre Antigene an T-Zellen vermitteln. Die Barriere der LSECs verhindert das Vordringen von Leukozyten in das Gewebe der Leber bei einer Entzündung. Dazu werden die Adhäsionsproteine *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) und daraus folgende *Vascular Cell Adhesion Protein* (VCAM) in den LSECs bei Entzündungsreaktionen verstärkt exprimiert (65, 66). Durch diese Proteine kommt es zur Adhäsion an die Endothelzellen und der transendothelialen Migration der Leukozyten. Durch die Expression von Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) tragen die LSECs zur angeborenen Immunität bei. Die MAMPs werden durch sie erkannt und lösen Signale der Immunantwort aus. Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den PRRs, welche in den LSECs exprimiert werden (67-69).

2 Theoretische Grundlagen

2.5 Gnotobiotik

1895 wurde das erste keimfreie Tier, ein Meerschweinchen, von Forschern an der Humboldt-Universität Berlin, hergestellt (70-72). Ein großes Problem in der Aufrechterhaltung keimfreier Tiere war zunächst die Nährstoffversorgung mit autoklaviertem Wasser. 50 Jahre später wurde die erste keimfreie Tierhaltung an Ratten mit Isolatoren und keimtötenden Mitteln etabliert. Bengt Gustafsson beschrieb erfolgreich 1946 die Züchtung keimfreier Ratten mit von Trexler und Reynolds entwickelten Isolatoren (73). Gnotobiotische Tiere werden sowohl für die Forschung als auch für die Herstellung von speziellen pathogenfreien Zuchten eingesetzt. Die ersten Veröffentlichungen mit keimfreien Tieren beinhalteten die Untersuchung der Physiologie, Ernährung und des Metabolismus der Tiere. Keimfreie Tiermodelle dienen als Modell zur Untersuchung der Wirkung von Mikroorganismen auf die Physiologie des Menschen.

Bei der Gnotobiotik handelt es sich um die Erforschung von Tieren, die unter definierten mikrobiologischen Bedingungen leben. Unter dem Begriff Gnotobiot versteht man einen Organismus, der keimfrei ist oder von Mikroorganismen besiedelt ist, die dem Untersucher genau bekannt sind (70, 74).

a) Gnotobiotische Tiere: Um den keimfreien Zustand dieser Tiere zu erhalten, werden diese entweder durch eine aseptische Hysterektomie (75) oder mithilfe eines Embryotransfers (76) gewonnen. Es wird zwischen zwei Haltungsformen in der Gnotobiotik unterschieden:

- ⇒ Keimfreie Tiere/ Germ-free (GF): Diese Tiere sind frei von jeglichen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen.

⇒ Definiert-assoziierte Tiere: Bei diesen Tieren handelt es sich um keimfreie Tiere, die mit einer Reinkultur von Mikroorganismen behandelt wurden. Es wird zwischen mono-, di- und polyassoziierten Tieren unterschieden.

b) Spezifiziert-pathogen freie Tiere (SPF): Spezifiziert-pathogen freie Tiere sind frei von Tierart-typischen und -spezifischen pathogenen und fakultativ-pathogenen Mikroorganismen (definiert von der FELASA). Die Haltung erfolgt in speziellen Barrierebereichen, die eine Pathogenfreiheit über einen längeren Zeitraum ermöglichen. Die zufällige Besiedlung mit Mikroorganismen lässt sich in dieser Haltung nicht verhindern. Somit wird die Aufrechterhaltung der Pathogenfreiheit nach FELASA-Richtlinien (77) in regelmäßigen Abständen geprüft (73, 78).

Konventionelle Tiere: Tiere, die von Geburt an mit Mikroorganismen aus der Umgebung besiedelt wurden. Hierbei erfolgt die Haltung in einer offenen Form mit oder ohne Barriere. Hierbei wird festgestellt, dass die Tiere keine klinischen Anzeichen einer Krankheit haben und keine von der FELASA definierten Pathogene tragen.

2.5.1 Morphologie keimfreier Mäuse

Es gibt einige physiologische und anatomische Unterschiede zwischen keimfreien Tieren und konventionell aufgewachsenen Tieren. Mäuse und Nagetieren besitzen einen sehr großen Blinddarm (Zäkum) (75). Die Abwesenheit von Mucinen führt zu einer Akkumulation von Kolloiden, die anorganische Ionen abgeben. Hierdurch verändert sich die osmotische Balance des Zäkums und führt zu einer Flüssigkeitsansammlung im Zäkum (79). Das vergrößerte Zäkum kann einen Anteil von bis zu 30 % des Körpergewichts ausmachen. Bei den meisten keimfreien Spezies ist das Bindegewebe und dessen Gefäßversorgung in der Darmwand viel dünner (80, 81). Darmzotten (Villi) haben bei keimfreien Tieren im Vergleich zu konventionell

2 Theoretische Grundlagen

aufgewachsenen Tieren einen größeren Abstand zueinander und zeigen eine „Fingerstruktur“ als eine übliche „Blattstruktur“ auf. Ebenfalls ist eine längere und eine dünnere Villusstruktur im Dünndarm (82, 83) zu beobachten. Des Weiteren sind Unterschiede im kardiovaskulären System, in den lymphatischen Organen (84) sowie im Fettgewebe zu erkennen. Das Herzgewicht, das Blutvolumen und das Herzzeitvolumen sind bei keimfreien Tieren im Vergleich zu den konventionell aufgewachsenen Tieren reduziert (85). Ebenso haben keimfreie Tiere im Vergleich zu konventionell aufgewachsenen Tieren einen geringeren Sauerstoffverbrauch (85, 86). Das für viele Stoffwechselwege wichtige Vitamin B1 ist in der Leber reduziert, wohingegen der Kalorienverbrauch von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Tieren unverändert ist (87).

2.6 Next Generation Sequencing

Die in dieser Arbeit verwendete Transkriptomanalyse beruht auf den Grundlagen der *Next Generation Sequencing*. Bei der Transkriptomanalyse einer Zelle handelt es sich um die Untersuchung der vollständigen Menge an Transkripten, die einen Einfluss auf die spezifischen Entwicklungsphasen der Zelle haben oder zum anderen eine physiologische Komponente besitzen (88). Daher ist die Interpretation entsprechender Funktionen des Genoms oder das Verständnis der Entwicklung und Veränderung der Zelle von essenzieller Bedeutung für die Transkriptomanalyse und bedarf einer Quantifizierung der exprimierten Transkripte.

Durch die stetige Weiterentwicklung und Verbesserung von *Next Generation Sequencing* Verfahren können Genome in kurzer Zeit vollständig und kostengünstig sequenziert werden (89). Die RNA-Sequenzierung ermöglicht tiefgehende Einblicke in zu untersuchende Transkripte und die darin enthaltenen Transkripte (88). Unter Anwendung der RNA-Sequenzierung können sowohl bekannte als auch unbekannt

Transkripte identifiziert und quantifiziert werden. Hiermit lassen sich Veränderungen in der Genexpression unter verschiedenen Bedingungen, Entwicklungsstadien oder in unterschiedlichen Organismen detektieren und quantifizieren (90). Vorteile von RNA-Sequenzierung gegenüber anderen Techniken wie z. B. die Sanger-Sequenzierung sind geringere Hintergrundsignale, eine höhere Auflösung von Einzelbasen, Detektion von Isoformen, Kostenersparnis und eine höhere Dynamik. Microarrays, die auf einer Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Molekülen mit den zu untersuchenden Transkripten basieren, sind im Vergleich mit der RNA-Sequenzierung kostspieliger und besitzen ein hohes Hintergrundsignal, bedingt durch die Kreuzhybridisierung.

2.6.1 RNA-Sequenzierung

Um mithilfe der RNA-Sequenzierung das Transkriptom von Probenmaterial zu untersuchen, muss zunächst die RNA isoliert werden (90). Die isolierte RNA wird über die reverse Transkriptase in cDNA transkribiert, um anschließend aus den einzelnen cDNA-Fragmenten eine Bibliothek (*Libraries*) zu erstellen. Die Stabilität der verwendeten Polymerase nimmt mit zunehmender Sequenzlänge ab. Daher werden lange RNA Fragmente auf eine Länge von 200 bis 500 Basen begrenzt, wodurch überlappende Teilsequenzen entstehen (90). Dies hat einen Einfluss auf die Fragmentierung und somit auf die Qualität der einzelnen Transkripte. Bei der Sequenzierung kurzer RNA-Moleküle (z. B. MicroRNAs) findet keine Fragmentierung statt, sondern eine Größenselektion der einzelnen Transkripte z. B. mithilfe einer Gelelektrophorese. Die umgewandelten cDNA-Fragmente aus der Bibliothek besitzen entweder an einem der beiden Enden (5'- Ende oder 3'- Ende) oder an beiden Enden einen Sequenzierungsadapter. Diese Oligonukleotide sind für die weiteren Sequenzierungsschritte notwendig und können zur Amplifikation der Transkripte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzt werden. Bei der anschließenden

2 Theoretische Grundlagen

RNA-Sequenzierung werden die cDNA-Fragmente von nur einem Fragmentende (*Single-End*) oder beiden Enden (*Paired-End*) sequenziert. Verschiedene Adaptoren besitzen die Fähigkeit an das 5'- bzw. 3'-Ende der cDNA Fragmente zu ligieren, um eine strangspezifische Sequenzierung der Transkripte zu ermöglichen. Dadurch ist die Orientierung der Transkripte bekannt, was bei der anschließenden Annotation der Transkripte hilfreich ist. Durch diese Methodik können überlappende Transkripte vom überliegenden Strang getrennt werden und dem entsprechenden Genom zugeordnet werden. Moderne Sequenzierungstechniken laufen nach einem allgemeinen Prinzip ab (88). Die enthaltenen cDNA-Fragmente werden nach ihrer Einzelstrang-Denaturierung immobilisiert und anschließend amplifiziert. Durch diesen Vorgang werden die einzelnen Sequenzen auf der Durchflusszelle (Flow Cell) im Sequenzierer räumlich angeordnet und es kommt zu einer Verstärkung des Signals. Die amplifizierte Sequenz dient als Template für den Einbau komplementärer Nukleotide, die eine Nukleotid-spezifische Fluoreszenz, besitzen. Die einzelnen Unterschiede in der eingesetzten Technik oder in den Sequenzierungsgeräten besteht in der möglichen Länge (Basen) der erzeugten Reads als auch in deren Anzahl. Die Sequenzierungslänge variiert von 50 – 300000 Basen.

3 Zielsetzung

Aus der bisher veröffentlichten Literatur ist bekannt, dass die kommensale Mikrobiota eine große systemische Wirkung auf den Wirtsorganismus besitzt. In vorausgehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass bakterielle Moleküle durch den Blutkreislauf in alle Organe des Körpers transportiert werden (91-94). In dieser Arbeit soll das Transkriptom des sinusoidalen Leberendothels adulter keimfreier und konventionell-aufgewachsener C57BL/6J Mäuse vergleichend untersucht werden. Das Leberendothel ist einem ständigen Einfluss von Mikrobiota abgeleiteten Metaboliten ausgesetzt, die ihre metabolische Kapazität stark beeinflussen und in einer Rekrutierung von Immunzellen resultiert (36, 95, 96). Bis heute ist der Einfluss der Mikrobiota auf Transkriptomebene des hepatischen, mikrovaskulären Leberendothels, die ein zentrales Element der Darm-Leber-Achse sind (97), nicht genauer untersucht worden.

Aus den einzelnen Versuchsgruppen wurde die Leber entnommen, die darin enthaltenen Endothelzellen isoliert und anschließend RNA gewonnen. Die gewonnene gesamt RNA wurde in cDNA transkribiert und anschließend sequenziert. Es folgte eine bioinformatische Analyse. Die identifizierten Gene wurden auf eine mikrobielle Abhängigkeit untersucht.

4 Mäuse, Material und Methoden

4.1 Mauslinien

Stamm	Typ	Herkunft	Zucht
C57BL/6J	Inzuchtstamm,	The Jackson Laboratory	Geschwisterverpaarung; erhalten als keimfreie Linie aus der Zucht vom Institute of Experimental Biomedicine, Göteborg, Schweden.

Tabelle 2 Mauslinie

4.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blottingkammer	Mini Trans-Blot ^R	BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
Dissociator	gentleMACS TM Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN [®] Tetra Vertical Electrophoresis Cell	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Heizblock	Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Isolatoren	diverse Modelle	CBC Ltd., Madison, USA
Kühlschrank 4 °C	Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -20 °C	Premium No Frost And Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz

Kühlschrank -80 °C	Hera Freeze BASIC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	Stirrer MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axio Lab.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, Radnor, USA
PCR-Cycler	Mastercycler® pro	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	827 pH lab	Metrohm AG, Herisau, Schweiz
Photometer	NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Pipet Lite XPS LTS (1000, 200, 20, 10, 2 µL)	RAININ über Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Fluorometer	Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Real-Time PCR-Cycler	qTOWER ³ G	Analytic Jena AG, Jena, Deutschland
Sequenzierer	Illumina HiSeq 4000 sequencer	Illumina, San Diego, USA
Schwingkugelmühle	TissueLyser II	Quiagen, Hilden, Deutschland

4 Mäuse, Material und Methoden

TapeStation	Tapestationsystem	Agilent, Santa Clara, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage	VWR-1502	VWR International, Radnor, USA
Western-Blot Detektionsgerät	ChemoChem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 Megafuge 16R Micro 1814	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA VWR International, Radnor, USA

Tabelle 3 Geräte

4.3 Software

Software	Hersteller
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Inc., San Jose', USA
GraphPad Prism	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
Inkscape	Inkscape Community
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmont, USA

Tabelle 4 Software

4.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcons (15 mL, 30 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
gentleMACS c Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS SmartStrainer (100 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kanülen (diverse Größen)	BD GmbH Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Latexhandschuhe Semper-care	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.h., Wien, Österreich
PCR-Reaktionsgefäße	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA Sarstedt AG &Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (0,1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
qPCR-Platten	Sarstedt AG &Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt AG &Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

4 Mäuse, Material und Methoden

Skalpelle	Feather Safety Razor, Ltd., Osaka, Japan
Spritzen (1 mL, 2 mL, 10 mL)	B.Braun, Melsungen, Deutschland BD GmbH Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien

4.5 Kits

Kits	Hersteller
DC™ Protein Assay	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
High Sensitivity RNA ScreenTape System	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Liver Dissociation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maxima Hot Start Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System	Promega, Fichtburg, USA
TruSeq DNA Nano Kit	Illumina, San Diego, USA
Ovation® RNA-Seq System V2	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Quant-iT RNA HS Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Tabelle 6 Kits

4.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Lämmli-Puffer (6-fach)	6 ml Tris-Base; pH 6,8 3 ml Glycerol 1g SDS 0,9 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau
Laufpuffer	96 g Tris-Base; pH 7,5 232 g Glycin 160 mL 10%iges SDS mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1,6 l auffüllen
Lysepuffer	pH 12, vor Gebrauch autoklaviert 25 nM NaOH 0,2 mM EDTA
Neutralisationspuffer	pH 5, vor Gebrauch autoklaviert 40 mM Tris-HCl
PEB (protein extraction buffer)	pH 7,2 0,25 g BSA 400 µg EDTA 50 ml PBS
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	890 mM Tris Hydrochlorid 890 mM Borsäure

4 Mäuse, Material und Methoden

	20 mM EDTA-Dinatriumsalz Hydrat
TBS-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i>), 10-fach, 1 L	pH 7,6 24 g Tris-Base 88 g NaCl mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen
TBS-T Puffer (<i>Tris-buffered saline</i> , Tween 20), 1 L	100 mL TBS-Puffer (10-fach) 1 mL Tween 20 Mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen
Transferpuffer 10-fach, 1 L	30,3 g Tris-Base 144 g Glycerin mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen
Transferpuffer, 1-fach, 1 L	100 mL 10-facher Transferpuffer 200 mL Methanol mit ddH ₂ O auf ein finales Volumen von 1 L auffüllen

Tabelle 7 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

4.7 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CD146 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Complete Mini	Roche über Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
MB-10 Tabletten	Quip Laboratories Inc., Wilmington, USA
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO, wasserfrei	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DNase-freies Wasser	B. Braun, Melsungen, Deutschland
DNA-Marker, 100 bp	New England Biolabs, Ipswich, USA
Dorbene (für Tiere!)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EDTA-Dinatriumsalz-dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

4 Mäuse, Material und Methoden

Ethanol, 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Glycerin, 86%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LumiGLO	Cell Signaling Technologies, Cambridge, U.K.
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methylcellulose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Midazolam	Hamel Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS 10-fach-Pulver	AppliChem, Chicago, USA
Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Proteingrößenmarker, PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ponceau S	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Roti-GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histofix pH 7, 4 % Formaldehydlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
iTaq Universal SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
N,N,N',N'-Tetraimethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris- Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptothethaol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8 Chemikalien

4.8 Medium

Medium	Hersteller
Brain Heart Infusion Broth	Sigma Aldrich, Missouri, USA

Tabelle 9 Verwendete Medien

4.9 Antikörper

Antikörper	Hersteller
AF555 conjugated donkey anti-rabbit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Anti-mouse - β -Actin rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti- α -Actinin	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
HRP Goat Anti-Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Lysosomal acid lipase/LAL (ab 154356)	Abcam, Cambridge, UK
PE anti-mouse CD31 Antikörper (102407)	Biolegend, San Diego, USA
APC anti-mouse CD105 Antikörper (120413)	Biolegend, San Diego, USA
FITC anti-mouse CD146 Antikörper (134705)	Biolegend, San Diego, USA
Fixable Viability Dye eFluor 780 (65-0865)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rabbit anti-mouse CD31 (PACM-1)	Cell Signaling Technology; Cambridge, UK

Tabelle 10 Antikörper

4.10 Bakterien

Bakterienstamm	Quelle /Ursprung
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Kat. DSM2079)

Tabelle 11 Verwendete Bakterien

4.11 Primer

4.11.1 qPCR-Primer

Primer	Gene	Sequenz 5'-3'
Slc10A6 for	Solute Carrier Family 10 Member 6	GGAGGGCCATGCGAATCTAAA
Slc10A6 rev		TGTCAGAGGCATAAGTCCAAAC
Lipa for	Lysosomal acid Lipase A	TGTTTCGTTTTCCACCATTGGGA
Lipa rev		CGCATGATTATCTCGGTCACA
Tsc22d1 for	Transforming growth factor beta stimulated Protein TSC-22	CCAGTGGCGATGGATCTAGGA
Tsc22d1 rev		CTTGCACCAGAGCTATTGTCA
Abcg2 for	ATP binding cassette subfamily G Member 2	CCAGTGGCGATGGATCTAGGA
Abcg2 rev		CTTGCACCAGAGCTATTGTCA
S1pr1 for	Sphingosine-1- phosphate receptor 1	ATGGTGTCCACTAGCATCCC
S1pr1 rev		CGATGTTCAACTTGCCTGTGTAG
Acer2 for	Alkaline Ceramidase 2	TGTGGCATATTCTCATCTGCCT
Acer2 rev		CAATAAAAGCCCATTTCTCGCTG
Sgms1 for	Sphingomyelin Synthase 1	TTGGCACGCTGTACCTGTATC
Sgms1 rev		CAGTCTCAAAGAGCTTCGGA
GAPDH for	Glycerinaldehyd-3- phosphat- Dehydrogenase	TGCCACTCAGAAGACTGTGG
GAPDH rev		TTCAGCTCTGGGATGACCTT

Tabelle 12 qPCR Primer

4.12 Methoden

4.13 Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden in der TARC (Translational Animal Research Center) der Universitätsmedizin Mainz unter SPF-(*specific-pathogen-free*) bzw. GF-(*germ-free*) Bedingungen gehalten. Die Haltung erfolgte bei einer konstanten Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit in einem 12h-Hell-Dunkel-Zyklus in EU Type II IVC-Käfigen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und autoklaviertem Futter. Die Mäuse waren zu Versuchsbeginn zwischen 10 und 14 Wochen alt. Die Versuche wurden mit geschlechts- und alters abgestimmten Versuchsgruppen durchgeführt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (in Koblenz) genehmigt (G16-1-013, G17-1-075).

4.14 Mikrobenstämme

Das Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* wurde bei -80 °C in einer Glycerin-Stammlösung aufbewahrt. Vor dem Gavagieren der Mäuse wurde ein Aliquot in Brain Heart Infusion Broth Medium bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln (250 U/min) für 48 Stunden inkubiert, bis die optische Dichte der Suspension bei 600 nm (OD₆₀₀ nm) lag.

4.15 Entnahme der Mausleber

Für die Entnahme der Leber wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Danach wurde der Bauchraum der Tiere mithilfe von Sezierbesteck auf einem Präparationsbrett geöffnet. Mit einer Pinzette wurden die einzelnen Leberlappen

lokalisiert und vorsichtig mit einer Schere die ganze Leber heraus präpariert. Anschließend wurde die Leber in 5 ml Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) Medium gewaschen.

4.15.1 Isolierung von Leberendothelzellen über magnetische Zellseparation

Die Arbeiten für die Isolierung der Leberendothelzellen wurden nach dem Protokoll „Liver dissociation“ der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Zunächst wurde eine Dissoziationsmix aus drei Enzymen (D,R und A) in 5 ml DMEM in einem C Tube hergestellt. Nachdem die vollständige Leber aus der Maus entnommen wurde, wurde diese zusammen in das C Tube überführt. Diese C Tubes wurden in einen gentleMACS Octo Dissociator mit Heizblock gesteckt und das entsprechende Programm wurde gestartet. Nach 35 min war das Programm zu Ende und die Proben wurden kurz herunter zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, auf dem ein MACS Smart Strainer (100 µm) befestigt war. Das C Tube wurde mit 5 ml DMEM Medium gewaschen und ebenfalls über den MACS Smart Strainer gegeben. Danach wurden die Proben bei 300xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in Protein Extraction Buffer (PEB) Puffer gelöst. Für die Verwendung der CD146 MicroBeads wurde nach dem Protokoll von Miltenyi Biotec gearbeitet und es musste zunächst die Zellzahl bestimmt werden. Dies erfolgte über eine Neubauer Zählkammer (C-chip). Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, wurde die entsprechende Menge an CD146 MicroBeads laut Protokoll hinzugegeben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PEB Puffer gewaschen und anschließend bei 300xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml PEB Puffer

4 Mäuse, Material und Methoden

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die LS Säulen gegeben, die vorher mit 3 ml PEB Puffer gewaschen wurde. Nachdem die Proben durch die Säulen gelaufen waren, wurde diese dreimal mit 3 ml PEB Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Säulen aus dem Magnetfeld des Separators genommen und die Leberendothelzellen mit 5 ml PEB Puffer und einem Stempel aus der Säule gedrückt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 300xg und 4 °C zentrifugiert.

4.16 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA in dieser Arbeit wurde das ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) verwendet. Die Proben wurden mit LBA und TG Puffer versetzt, der die Zellen zum Lysieren bringt. Anschließend wurde die entsprechende Menge laut Protokoll an Isopropanol zu den Proben gegeben. Durch starkes Schütteln wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße vermischt. Die Lysate wurden auf die Säulen gegeben und für 1 min bei 20 °C und 14000xg zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und es wurde mit 500 µl RNA-Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde erneut für 1 min, 20 °C und 14000xg zentrifugiert. Der in Tabelle 15 dargestellte Inkubationsmix wurde auf die Säulen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert.

Lösung	Menge
Yellow Core Puffer	24 µl
Manganchlorid	3 µl
DNase I	3 µl

Tabelle 13 DNase I Inkubations Mix.

Nach der Inkubation wurde mit 200 µl einer Säulen-Waschlösung gewaschen und erneut für 1 min, 20 °C und 14000xg zentrifugiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit 500 µl der RNA-Waschlösung und eine Zentrifugation für 1 min,

20 °C und 14000xg, der Durchlauf wurde erneut verworfen und die Säule wurde mit 300 µl gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 20 °C und 21000xg. Die Säule wurde auf eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und es wurde mit 30 µl Nuklease freiem Wasser eluiert. Es folgte eine abschließende Zentrifugation für 2 min, bei 20 °C und 21000xg. Die RNA wurde mithilfe UV-Photometrie auf ihre Reinheit und Konzentration bestimmt. Die Konzentration der RNA wurde einheitlich für alle Proben auf 200 ng/µl eingestellt und somit für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die gewonnene RNA wurde für weitere Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

4.16.1 Reverse Transkription/cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurden 10 µL der 200 ng/µL gewonnenen RNA mit 10 µL des in der **Tabelle 14** zusammengesetzten Mastermixes eingesetzt.

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

Tabelle 14 Schema cDNA-Synthese.

4 Mäuse, Material und Methoden

Anschließend wurde die RNA analog des folgenden PCR-Programms (**Tabelle 15**) im Thermocycler umgeschrieben.

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

Tabelle 15 cDNA-Synthese Protokoll.

Nach erfolgter Umschreibung der RNA in cDNA wurde diese auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l verdünnt.

4.16.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der mRNA wurde in dieser Arbeit die semiquantitative PCR-Methode verwendet. Für diese Methode wird ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) benötigt. Hier wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) verwendet. Die Expression des verwendeten Referenzgens ist für die meisten Gewebetypen bekannt und unter den untersuchten Bedingungen nicht reguliert. Die Untersuchung erfolgte in Triplikaten von Referenz- und Zielgen in Reaktionsansätzen von 25 μ l Endvolumen. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist der folgenden **Tabelle 16** zu entnehmen. Das Standardprogramm ist in **Tabelle 17** aufgelistet.

Reagenz	Konzentration Stammlösung	eingesetzte Volumina
itaq Sybr Green MM	1 x	520 µl
Primer_for	100 µM	2,6 µl
Primer_rev	100 µM	2,6 µl
cDNA	5 ng/µl	4 µl
DNase-freies H ₂ O		306,8 µl

Tabelle 16 Pipettierschema quantitative PCR.

Die Platte wurde mit folgendem PCR Programm untersucht.

Zeit	Temperatur	Zyklen/Intervalle
30 s	95 °C	40
2 s	95 °C	
25 s	60 °C (Annealing)	
5 s	60-95 °C (Elongation)	0,2 °C

Tabelle 17 Programm quantitative PCR.

Anschließend wurde die relative mRNA Expression des Zielgens auf die des Referenzgens normalisiert und mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet (98).

4.17 Transkriptomamplifizierung und RNA-Sequenzierung

Die gewonnene totale RNA (Kapitel 4.16) aus den einzelnen Proben wurde auf deren Konzentration und Qualität unter Verwendung des Quant-iT-RNA-HS-Assay Kits auf einem Qubit-Fluorometer und eines RNA-ScreenTape-Systems auf einer TapeStation untersucht. Die vollständige Transkriptomamplifikation (WTA) wurde unter Verwendung des Ovation RNA-Seq-Systems V2-Kits gemäß den Anweisungen des

4 Mäuse, Material und Methoden

Herstellers mit 20 ng Gesamt-RNA als Einsatz für die Erststrang-cDNA Synthese durchgeführt. Die doppelsträngigen cDNAs aus der WTA wurden anschließend für das TruSeq DNA Nano Kit verwendet, um gemäß dem Hersteller eine Barcode-Sequenzierungsbibliothek herzustellen. Die einzige Ausnahme bestand darin, dass die cDNA Syntheseschritte weggelassen wurden und direkt mit der Adapterligation begonnen wurde. Alle Proben wurden unter Verwendung des Illumina HiSeq 4000-Sequenzierers mit durchschnittlich 9 Millionen Single-End-Reads (1x50 bp) am Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität Kiel sequenziert. Die RNA-Sequenzierungsdaten wurden mit einer internen Pipeline (<https://github.com/nf-core/rnaseq>) verarbeitet. Vereinfacht ausgedrückt wurden Adapter und Basen von geringerer Qualität aus den RNA-Sequenzierungs Reads unter Verwendung von Trim Galore (Version 0.4.49) entfernt. Die gefilterten Reads wurden mit STAR Aligner (Version 2.5.2b) auf das Mausgenom (GRCm38) abgebildet. Proben, die eine signifikante geringere Anzahl von kartierten Lesevorgängen hatten, wurden aus den weiteren Analysen entfernt. Die Expressionszahlen der Transkripte wurden unter Verwendung von featureCounts (Version 1.5.2) geschätzt und dann unter Verwendung der DESeq-Normalisierungsmethode (99) über den gesamten Probenbereich normalisiert. Anschließend wurde DESeq2 verwendet, um differenziell exprimierte Gene zu ermitteln. Dabei wurden Gene als signifikant differenziell angesehen, wenn der p-Wert (Benjamin-Hochberg-Mehrfachtestkorrekturmethode) weniger als 0,05 betrug. Für die anschließende Darstellung der Daten wurden Vulkanplots verwendet, um die differenziell exprimierten Gene zu visualisieren. Expressionsänderungen zwischen verschiedenen Genotypen wurden über eine Heatmap verdeutlicht, die auf den einzelnen Z-Scores der Proben basierte. Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit dem Statistikpaket (Version 3.6.3) und die Abbildungen mit ggplot2 (Version 3.3.3) berechnet. Die Darstellung des Vulkanplots

wurde mit Enhanced Volcano (Version 1.6.0) und die HeatMap wurde mit gplots (Version 3.1.1) erstellt.

4.18 Gene set enrichment Analyse

Die Gene set enrichment Analyse der KEGG Signalwege wurde mit dem clusterProfiler v3.16.1 durchgeführt. Die Eingabe Gene wurden gemäß ihrer logarithmischen Verteilung der differenziell exprimierten Gene aufgeteilt. Gene, die in einer niedrigeren Anzahl vorkommen, wurden mit der DESeq2-Analyse identifiziert und in die GESA Analyse mit aufgenommen. Signalwege mit einem normierten p-Wert von weniger als 0,05 wurden als signifikant verändert angesehen. Der Vergleich von mehreren Signalwegen wurde mit der Benjamini-Hochberg-Methode durchgeführt. Die Visualisierung ausgewählter KEGG-Signalwege wurde mit pathview v1.28.1 durchgeführt.

4.19 Western Blot

Für die Herstellung der Proteinlysate wurde in einem ersten Schritt der RIPA-Puffer vorbereitet. Dazu wurde in 10 mL des RIPA-Puffers eine Protease-Inhibitor-Tablette gegeben. Pro Probe wurden auf die Zellpellets 500 µL des modifizierten RIPA-Puffers gegeben, mit der Pipette resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben für 1 min im Ultraschallreiniger behandelt und wieder für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Behandlung für 1 min im Ultraschallreiniger. Nun wurden die Proben für 15 min mit 10000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde von der Zelldebris abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinmenge wurde mittels eines DC Proteinassays bestimmt und 40 µg Probe mit Lämmli-puffer versetzt, sodass der Lämmli-puffer einfach verdünnt in der Proteinprobe vorlag. Die Proben wurden nun bei 96 °C unter schütteln für 600 s

4 Mäuse, Material und Methoden

denaturiert. Zur anschließenden Auftrennung der Proteinlysate wurde nach der Größe des zu detektierenden Proteins 12%-ige SDS-Gel verwendet. Die Geltaschen wurden mit 60 µg der Proben pro Tasche geladen und zusätzlich der Marker aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt, damit die Proben in das Sammelgel einwandern konnten. Nach 15 min wurde die Spannung auf 100 V erhöht, um die Proteine entsprechend ihrer Größe im Trenngel aufzutrennen. Weitergehend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass der Transferpuffer gekühlt ist und die Apparatur gekühlt wurde, um eine Überhitzung zu vermeiden. Für den Transfervorgang wurde eine Spannung von 40 V angelegt und diese für zwei Stunden gehalten. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt, um zu überprüfen, ob die Übertragung der Proteine auf die Membran funktionierte. Das Ponceau S wurde im Anschluss mit TBS-T von der Membran gewaschen und diese entsprechend dem Herstellerprotokoll des Erstantikörpers für eine Stunde geblockt. Der Erstantikörper (Verdünnung laut Herstellerprotokoll) wurde über Nacht bei 4 °C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen. Danach wurden der Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit LumiGLO überschichtet und die Chemilumineszenz am Western-Blot Detektionsgerät detektiert.

5 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll ein möglicher Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf das Transkriptom von Leberendothelzellen untersucht werden. Hierbei wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen CONV-R und GF Mäusen untersucht. Dabei wurde den getöteten Mäusen zunächst die Leber entnommen, über magnetische Zellseparation die Leberendothelzellen isoliert und anschließend mithilfe eines FACS (fluorescence-activated cell sorting) aufgereinigt (**Abbildung 5**). Anschließend wurde aus den isolierten Zellen die RNA gewonnen. Mithilfe eines whole transcriptom amplification kits (WTA) wurde die isolierte mRNA in cDNA transkribiert, um anschließend eine RNA- Sequenzierung durchzuführen. In **Abbildung 5** ist der schematische Versuchsaufbau dargestellt.

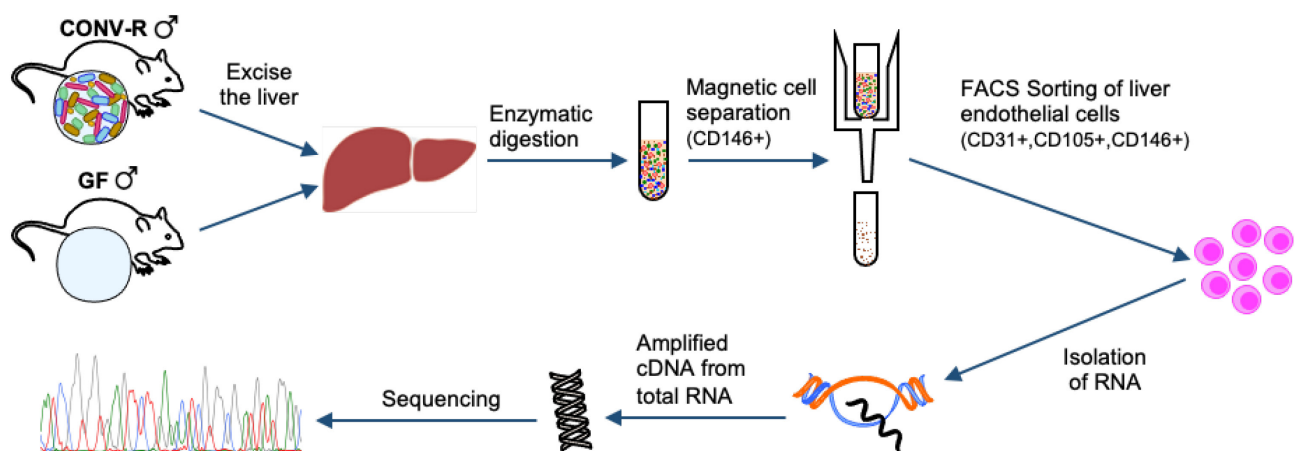


Abbildung 5 Versuchsaufbau für Batch A. Darstellung des Ablaufs von Entnahme der Leber, über magnetische Zellseparation, Sortierung der Zellen über FACS, Isolation von mRNA, Amplifikation von cDNA bis zur RNA-Sequenzierung.

5.1 Untersuchung des Transkriptoms von Leberendothelzellen GF und CONV-R Mäusen mithilfe von FACS Sortierung

In dieser Untersuchung soll der intestinale Einfluss der Mikrobiota auf das Leberendothel untersucht werden. Dafür wurde zunächst eine Sortierung der Zellen

5 Ergebnisse

über FACS durchgeführt (**Abbildung 6**). Bei den verwendeten Antikörpern handelt es sich um CD146-FITC (Melanomzelladhensionsmolekül, MCAM), CD105-APC (Endoglin) und CD31-PE (Thrombozyten-Endothelzellenadhensionsmolekül, PECAM) (100). Gezeigt werden die einzelnen Zellpopulationen vor und nach der Sortierung (**Abbildung 6**). Das Sortierschema setzt sich aus folgenden Panels zusammen: lebende Zellen, Singlets, Dubletten, einzelne Zellen, positive Endothelzellen (CD105+/CD146+) und der Kontrolle der positiven Endothelzellen mit anderen Antikörpern (CD105+/CD31+). Bei CD31 handelt es sich um einen pan-Endothelmarker für Endothelzellen, während CD105 ein Marker für hepatische sinusoidale Endothelzellen ist, von denen bekannt ist, dass diese eine geringe Expression an Selectinen besitzen (100-102). Zusätzlich werden die einzelnen Panels jeweils vor und nach der Sortierung dargestellt (**Abbildung 6**).

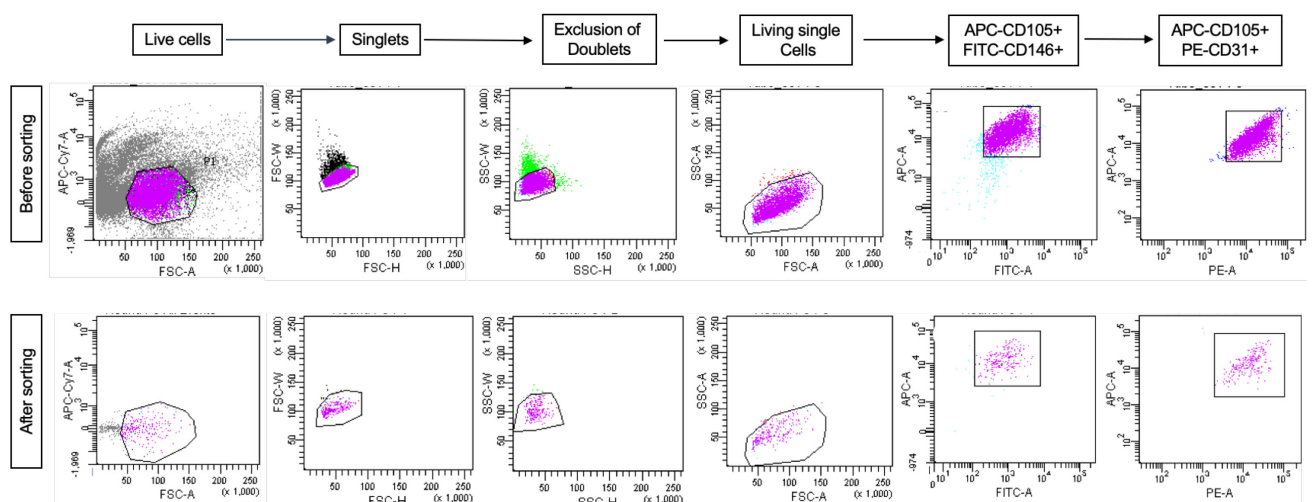


Abbildung 6 Sortieren der Leberendothelzellen mit einem FACS. Darstellung der FACS-Strategie zum Sortieren der Leberendothelzellen über die Antikörper anti-CD105-APC, anti-CD146-FITC und anti-CD31-PE. Es werden die Zellpopulationen vor und nach der Sortierung gezeigt.

In **Abbildung 7** ist ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der sortierten Zellen in den keimfreien Mäusen an lebenden Zellen im Vergleich zu den konventionell aufgewachsenen Mäusen zu sehen. Mit der dargestellten Sortierstrategie wurden hochreine Endothelzellpräparate (98 %) mit einer Ausbeute von 2×10^6 Zellen nach

der magnetischen Zellseparation und 6×10^4 bis 1×10^6 Zellen nach dem Sortieren mithilfe des FACS gewonnen. Im nächsten Schritt wurde die RNA-Sequenzierung auf einem Illumina HiSeq 4000 mit dem TruSeq DNA Nano Kit durchgeführt mit einer durchschnittlichen Leselänge von 9 Millionen single-end reads (1x 50 bp). Hierbei wurden 1537 differenziell exprimierte Gene (differentially expressed genes, DEGs) in den Endothelzellen von GF und CONV-R Mäuse gefunden (p.adjust 0,05 kombiniert mit Log2FC). Davon waren 932 DEGs in GF verglichen mit CONV-R hochreguliert, während 605 DEGs herunterreguliert gewesen sind.

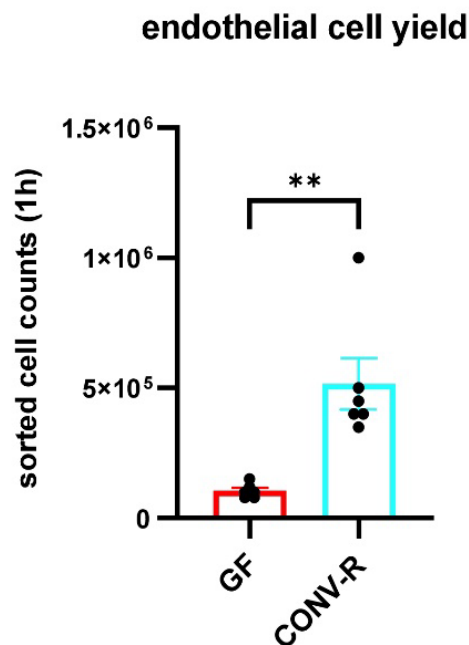


Abbildung 7 Darstellung der Anzahl an sortierten Zellen. Gezeigt werden die Anzahl an sortierten Zellen von keimfreien (GF; n=6) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R; n=7) Mäusen. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$.

5 Ergebnisse

5.1.1 Hauptkomponentenanalyse zwischen GF und CONV-R

Um nach erfolgreicher RNA-Sequenzierung die erhaltenen Daten auf Ihre Integrität zu überprüfen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (**Abbildung 8**) zwischen CONV-R und GF Proben durchgeführt. Es ist eine deutliche Trennung der beiden Gruppen zu erkennen. In der Gruppe der CONV-R Mäuse sind sechs Proben zu finden, während die Gruppe der GF Tiere fünf Proben enthält. Die in der Hauptkomponentenanalyse dargestellte Varianz beträgt für PC1 25,99 % und für PC2 15,96 %.

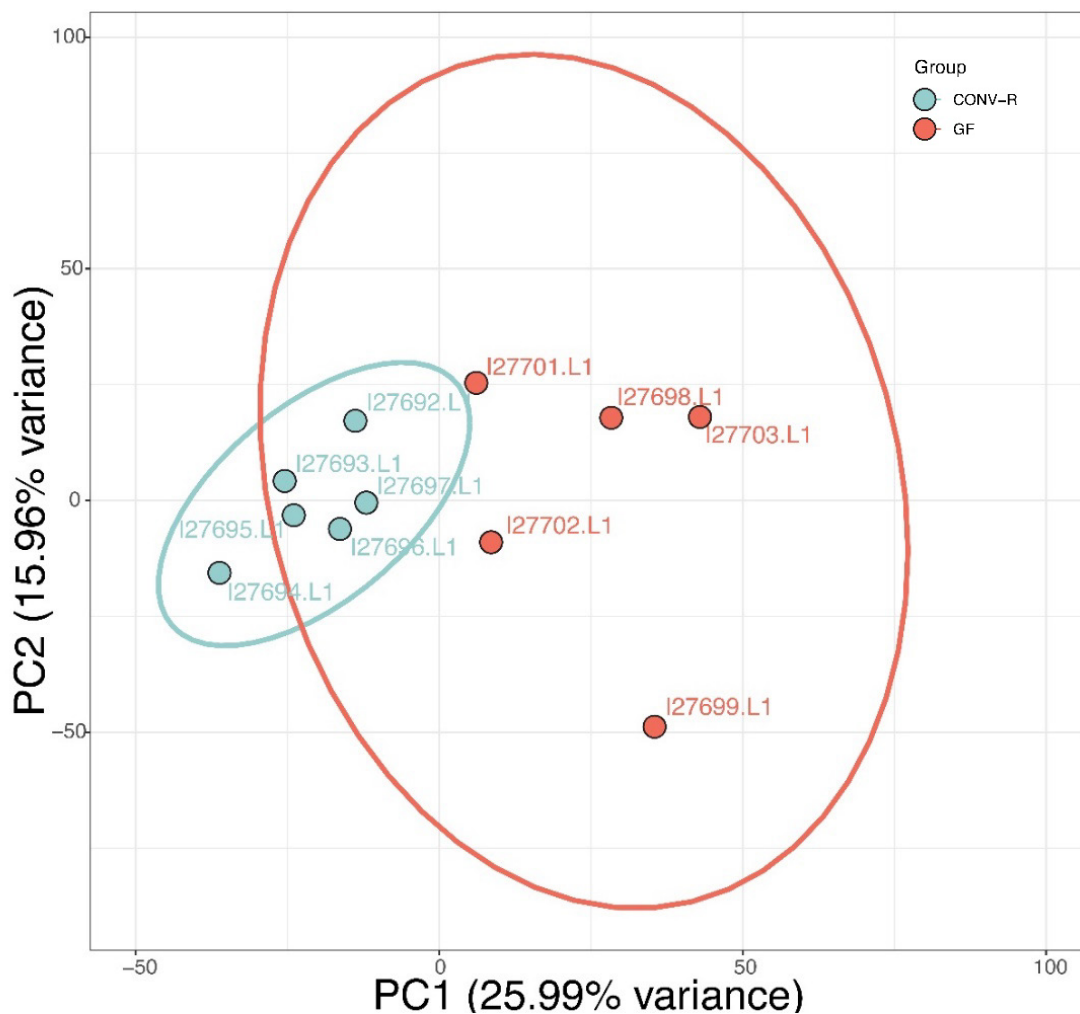


Abbildung 8 Hauptkomponentenanalyse keimfrei (GF) gegen konventionell aufgewachsene Mäuse (CONV-R). Hauptkomponentenanalyse (PCA) der beiden Versuchsgruppen keimfrei (GF, orange) und konventionell (CONV-R, türkis) aufgewachsenen Mäuse. PC1 zeigt eine Varianz von 25,99 %, während PC2 eine Varianz von 15,96 % darstellt. Die einzelnen Ovale zeigen die Streuung der beiden Gruppen.

5.1.2 Untersuchung der differenziell exprimierten Gene (DEG) der Gruppen GF gegen CONV-R Mäuse

Nachdem die Qualität der einzelnen Proben untersucht wurde, wurden die RNA-Daten auf die Anzahl an differenziell exprimierten Genen von GF gegen CONV-R Mäusen untersucht. In **Abbildung 9** wurden die differenziell exprimierten Gene in einem Vulkanplot dargestellt. Hierbei sind in „grau“ nicht signifikanten (adjusted P-Value < 0,05) Gene, in „grün“ Gene mit einer veränderten Expression, die jedoch nicht signifikant verändert sind, in „blau“ Gene, die eine signifikante Differenz, jedoch eine Veränderung in der Expression zeigen und in „rot“ Gene, die sowohl eine Veränderung in der Expression als auch eine signifikante Veränderung aufweisen. Bei einem Vulkanplot handelt es sich um ein Streudiagramm, mit dem Änderungen in einem Zwei-Gruppen-Vergleich von großen Datensätzen schnell identifiziert werden können. Der negativ dekadische Logarithmus des angepassten p-Wertes ist auf der y-Achse aufgetragen. Somit erscheinen Gene mit niedrigen (hochsignifikanten) angepassten p-Werten am oberen Rand des Diagramms. Die x-Achse zeigt die log₂-fache Veränderung zwischen keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen. Eine negative log₂-fache Veränderung bedeutet eine geringere Expression an differenziell exprimierten Genen, wohingegen eine positive log₂-fache Veränderung eine erhöhte Expression an differenziell exprimierten Genen aufweist. In hepatischen sinusoidalen Endothelzellen von GF Mäusen ist das Gen des *solute carrier family 10 member 6 transporters (Slc10a6)* am stärksten hochreguliert. *Slc10a6* transportiert Taurolithocholsäure-3-sulfate und sulfokunjugierte Pyrene. Des Weiteren sind Transkripte der *Sphingomyelin Synthase 1 (Sgms1)* signifikant hochreguliert in hepatischen sinusoidalen Endothelzellen von GF Mäusen. *Sgms1* kodiert für das Hauptenzym aus der Phosphatidylgruppe bei dem Phosphatidylcholin primäres Hydroxyl auf Ceramid überträgt, um das Spingolipid Sphingomyelin zu erhalten.

5 Ergebnisse

Weitere hochregulierte Transkripte sind die *Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 (Qsox1)*, welches für die Katalyse der Oxidation der Sulfhydrylgruppen zu Disulfiden unter der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und *Prolylisomerase 5 (Fkbp5)* benötigt. Die genannte Katalyse ist von großer Bedeutung für die Proteinfaltung und den Proteintransport. Im Gegensatz zu den hepatischen sinusoidalen Endothelzellen von GF Mäusen waren einige Transkripte in den CONV-R Mäusen signifikant hochreguliert wie der Transkriptionsfaktor *Zfp608*, der die Transkription von *NNF609* unterdrückt, das Desintegrin und die Metallproteinase (*Adam19*), die an der Zellmigration und Zell-Matrix-Interaktion beteiligt ist, die neutralisierte E3-Ubiquitin-Proteinligase 3 (*Neur13*) oder die *Arachidonat-12-Lipoxygenase (Alox12)*, ein Enzym, welches an der Erzeugung von Eicosanoiden und Lipoxinen beteiligt ist. Alle identifizierten Leberendothel Transkripte, die signifikant ($p.adjust < 0,05$) im Vergleich GF zu CONV-R erhöht gewesen sind, wurden in einer Heatmap (**Abbildung 10**) dargestellt und ihren jeweiligen Funktionen in Bezug auf die Endothelphysiologie zugeordnet. Eine entsprechende Literaturrecherche wurde durchgeführt, indem in Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) nach den einzelnen Genen im Kontext zu Leberendothelzellen gesucht wurde (103). Durch die identifizierten Gene der Endothelzellphysiologie konnte ein Zusammenhang der biochemischen Stoffwechselwege von der Mikrobiota hergestellt werden (**Tabelle 18 + 19**). Die identifizierten Transkripte sind an der Transkriptionsregulation (*Meis2*, *Zfp608*, *Zbtb21* hochreguliert in CONV-R vergleichend mit *Klf1* hochreguliert in GF), in der Angiogenese (*Map3k6*, *Ccn2*, *Tle1*, *Zbtb16*, *Cdkn1a*, *Shroom2*, *Dusp1*, *Glul* und *Klf9*, alle in GF hochreguliert), in der zirkadianen Rhythmik (*Klf15* und *Per1* hochreguliert in GF) und in der Zelladhäsion (*Kank2*, *Adam19*, *Kazn* hochreguliert in CONV-R gegenüber *Fn1* und *Timp4* hochreguliert in GF) beteiligt (**Abbildung 10, Tabelle 18 - 19**).

Es ist bekannt, dass die Darmmikrobiota eine in der Leber Cholesterin-senkende Funktion besitzt (104). Dies geschieht hauptsächlich durch die Ausscheidung durch mikrobielle Biohydrierung auf hydrophiles Coprostanol (105). Dagegen bleibt der Einfluss der Mikrobiota auf die zelluläre Regulation von hepatischem endotheliale Cholesterin unerforscht. Die gefundenen Transkripte sind Bestandteil des Cholesterinstoffwechselweges und sind in den Leberendothelzellen von GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R Mäusen hochreguliert. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression des Transkripts *Slc10a6* unter GF Haltungsbedingungen gezeigt werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Regulation des Na⁺ abhängigen Gallensäuretransporters *Slc10a6* über Lipopolysaccharide erfolgt, abhängig vom nuklearen Rezeptor Farnesoid-X (FXR) und dem Retinoid-X- Rezeptor (106, 107). Das Transkript *Tsc22d1*, welches im hepatischen Endothelium in GF Mäusen hochreguliert gewesen ist, ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor, der an der Bildung von Lipoproteinen, beteiligt ist (108). Eine Veröffentlichung von Kiouptsi et al. zeigt, dass GF Mäuse unter einer „Chow“ Diät einen erhöhten Plasma-Lipoproteinspiegel haben (109). Des Weiteren ist die *Lipase A*, die Cholesterylester und Triglyceride im Lysosom hydrolysiert, ein bekannter Regulator des mTOR Signalweges und der endothelialen Barriere (110), unter GF Haltungsbedingungen hochreguliert. Die erhaltenen Transkriptomdaten zeigen eine hochsignifikante Mikrobiom-abhängige Suppression von Genfunktionen, die die endogene Synthese von *Sphingosin-1-Phosphat* (S1P) vermittelt. Der S1P Stoffwechselweg ist in den sinusoidalen Leberendothelzellen von GF Mäusen hochreguliert (**Abbildung 10**). Schlüsselenzyme des Sphingolipid Stoffwechsels sind die *Sphingomyelinsynthase-1* (*Sgms1*), die die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid katalysiert; die *alkalische Ceramidase-2* (*Acer2*), die für die Umwandlung von Ceramid zum aktiven Metaboliten S1P benötigt wird; der *S1P-Transporter ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2* (*Abcg2*) und auch der 7-

5 Ergebnisse

Helix-G-Protein gekoppelte S1P-Rezeptor (S1pr1) waren in GF Mäusen hochreguliert, was zeigt, dass dieser Signalweg durch die Mikrobiota gehemmt wird. Bei dem S1P Signalweg handelt es sich um einen zentralen Regulationsweg der Gefäßfunktion. Der S1P Signalweg ist entscheidend an der endothelialen Proliferation, Zellmigration (111), der Angiogenese (112) und am Zellüberleben (113) beteiligt. Außerdem wirkt der S1P Signalweg proinflammatorisch und sichert die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere (114, 115).

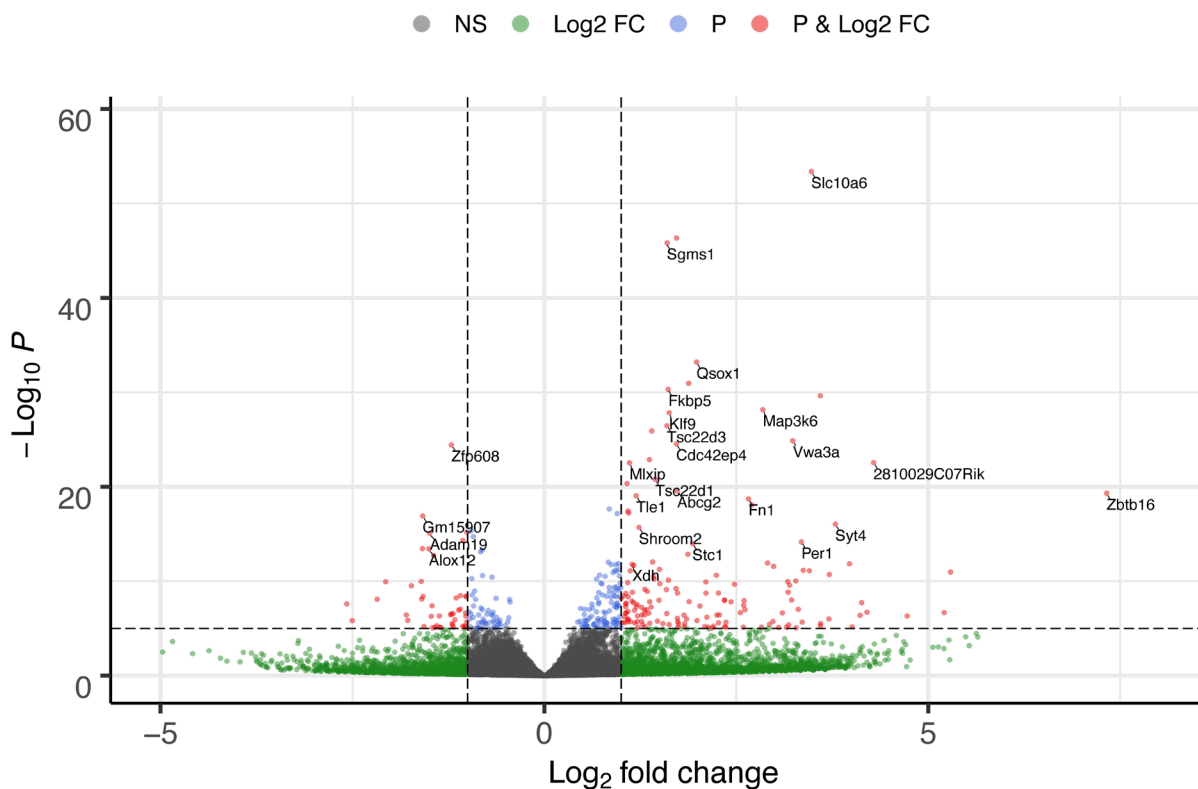


Abbildung 9 Vulkanplot von Keimfrei (GF) gegen konventionell aufgewachsene Mäuse (CONV-R), der signifikantesten regulierten differentiell exprimierten Gene. Nicht signifikante Gene sind in Grau dargestellt. Gene mit veränderter Expression, die nicht signifikant verändert sind, in Grün dargestellt. Blau zeigt Gene zeigen eine signifikante Differenz, jedoch zeigen diese Gene keine Veränderung in der Expression. In Rot sind die Gene dargestellt, die sowohl signifikant als auch eine hohe Veränderung in der Expression zeigen.

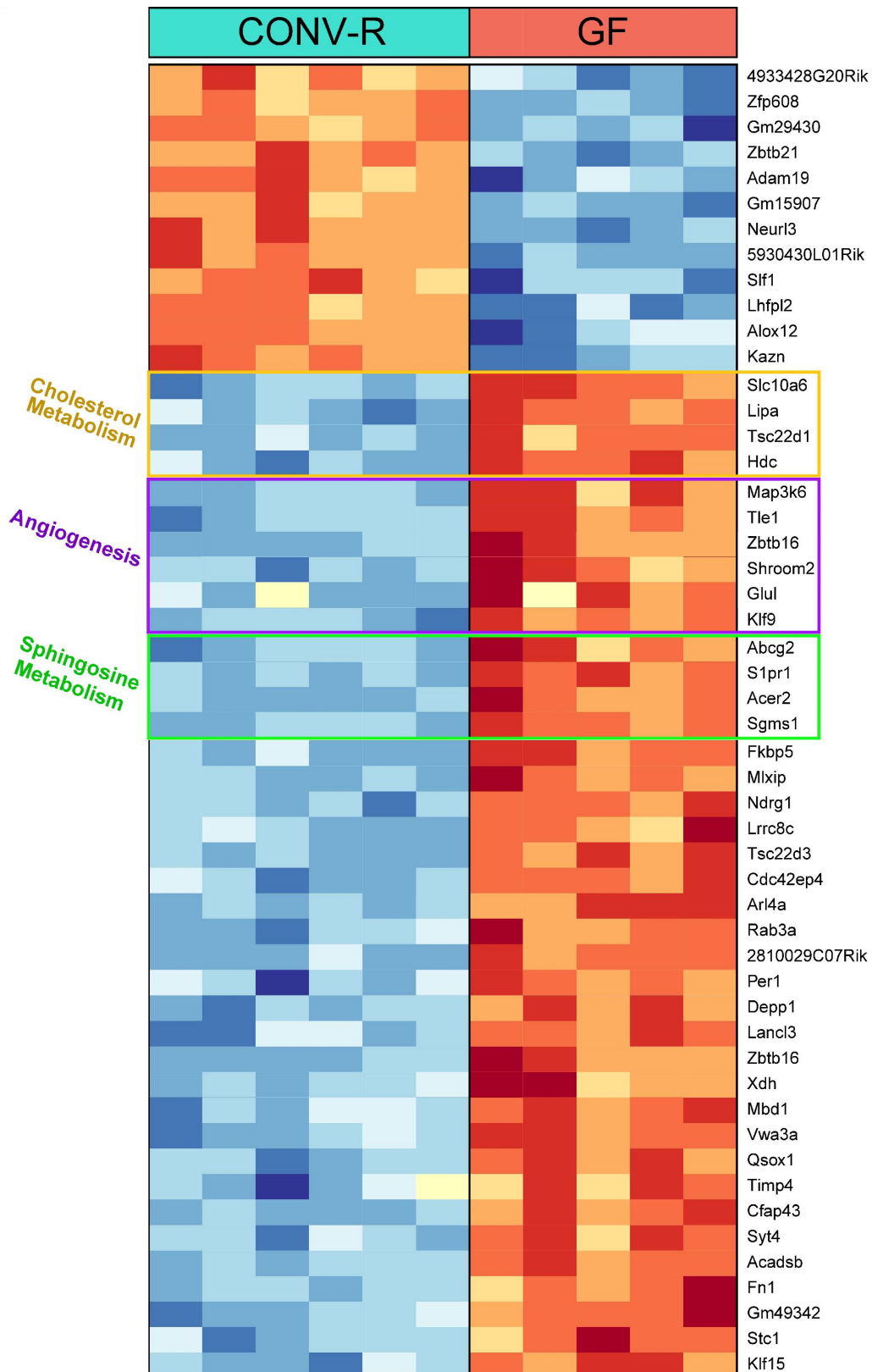


Abbildung 10 Heatmap der Top 50 regulierten Gene zwischen keimfrei (GF) und konventionell (CONV-R). Heatmap der 50 an hoch oder herunterregulierten Genen in isolierten sinusoidalen Leberendothelzellen der Versuchsgruppen keimfrei (GF) gegen konventionell (CONV-R) aufgewachsene Mäusen. Der Vergleich bezieht sich auf die keimfreie Gruppe. Besonders Transkripte aus dem Cholesterin Metabolismus, der Angiogenese und Sphingosin Stoffwechselweges waren signifikant in GF Mäusen hochreguliert.

HOCHREGULIERT IN CONV-R				
FUNKTION	GENE	NAME	BEZUG LEBER UND ENDOTHELZELLE	REFERENZEN
Adhäsion/Matrix	Kank2	KN Motif and Ankyrin Repeat Domains 2	Verbindung des Adhäsionsproteins Talin mit Mikrotubuli spitzen	(116)
	Neur13	Neutralized E3 Ubiquitin Protein Ligase 3	KANK2 ist ein Schlüsselmolekül des Integrin $\alpha\beta5$ IACs und verbunden mit MTs	(117)
Metabolismus	Alox12	Arachidonate 12-Lipoxygenase, 12S Type	Gating der Lymphendothelzellbarriere	(119)
			Beitrag zur Thrombose	(120)
	Kazn	periplakin-binding protein Kazrin	Endothelzellbarriere	(121)
Zelladhäsion			Endothelialeverbindungen	(122, 123)

Tabelle 18 Darstellung der hochregulierten Gene in CONV-R Mäusen. Gezeigt werden die entsprechenden Gene, die einen Zusammenhang zur Leberendothelspezifischen Physiologie besitzen.

HERUNTERREGULIERT IN GF				
FUNKTION	GENE	NAME	BEZUG LEBER UND ENOTHELZELLE	REFERENZEN
Zelladhäsion	Fn1	Fibronectin 1	Adhäsion	(124)
	Timp4	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4	Das Fehlen von TIMP4 verbessert die HFD-induzierte Fettleibigkeit	(125)
Cholesterin und Gallensäure	Slc10A6	Solute Carrier Family 10 Member 6	Entzündungsabhängige Hochregulation in der Mausleber	(106, 107)
	Lipa	Lipase A, Lysosomal Acid Type	Modulation des mTOR-Pfads; Tumorwachstum und Metastasierung	(110, 126)
	Tsc22d1	TSC22 Domain Family Member 1	TGF-beta Regulierung der Expression des natriuretischen Peptids vom C-Typ; Kontrolle des Cholesterinstoffwechsels	(108, 127)
	Hdc	Histidine Decarboxylase	Exprimiert in Leberendothelzellen; Rolle bei cholestatischer Leberschädigung	(128, 129)
Sphingolipid Stoffwechsel	Abcg2	ATB Binding Cassette Subfamily G Member 2 (Junior Blood Group)	Efflux von Phototoxinen in kapillare Endothelzellen; stark exprimiert in der Leber	(130-132)
	S1pr1	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1	Gefäßentwicklung; Schutz gegen Leberischämie-Reperfusion; Metastasen und Angiogenese	(133-135)
	Acer2	Alkaline Ceramidase 2	Endothelzellproliferation und Apoptose; fördert Wachstum, Invasion und Migration von hepatozellulären Karzinomzellen	(136)

Circadiane Rhythmik	Klf15	Kruppel-like Factor 15	Endometriose und xenophobischer Stoffwechsel; Toxizität der Gallenwege, Elimination von Steroidhormonen; aktiviert die Hepatitis-B-Replikation	(151-154)
	Per1	Period Circadian Regulator 1	Beeinflussung der Zellmigration und Proliferation über das Gen Dec1	(155)
Metabolismus	Qsox1	Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1	Fördert die mitochondriale Apoptose von hepatozellulären Karzinomzellen	(156)
	Acadslb	Acetyl-CoA Dehydrogenase Short/Branched Chain	Spielt eine Rolle bei der Genexpression von Leberkrebs	(157)
	Xdh	Xanthine Dehydrogenase	Inaktiviertes Xdh in Interferon-gamma-stimulierten Makrophagen wird in der Leber gebildet	(158, 159)
	Stc1	Stanniocalcin 1	Beeinflusst die Tumorgroße beim hepatozellulären Karzinom; verändert den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel	(160, 161)
Signalisierung	Ndgr1	N-Myc Downstream Regulated 1	Regulieren die Proliferation und Migration von Endothelzellen	(162, 163)
	Depp1	DEPP1 Autophagy Regulator; Decidual Protein Induced By Progesterone	Regulierung des Leberfettstoffwechsels; Autophagie Aktivierung	(164, 165)
	Tsc22d3	TSC22 Domain Family Member 3, GILZ	Verhindert Gefäßentzündungen	(166)
Entzündung (-)	Fkbp5	FKBP Prolyl Isomerase 5	Regulierung durch Kortikosteroide	(167)
Transkriptionsregulation	Mbd1	Methyl-CpG Binding Domain Protein 1	MBD1-Komplex zur Induktion von Immuntoleranz	(168)

Tabelle 19 Darstellung der hochregulierten Gene in keimfreien Mäusen. Gezeigt werden die entsprechenden Gene, die einen Zusammenhang zur Leberendothelspezifischen Physiologie besitzen.

5 Ergebnisse

5.1.3 Gene set enrichment Analysis (GSEA) des Sphingosin Metabolismus (GSEA)

Für eine genaue Quantifizierung des Sphingosin-1 Metabolismus wurde in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin Mainz eine Gene set enrichment Analyse (GSEA) durchgeführt. Bei der GSEA Analyse sind 19 Signalwege signifikant in keimfreien Mäusen relativ zu konventionell aufgewachsenen Mäusen erhöht. Im Gegensatz dazu waren Genfunktionen des IL-17 Signalweges vermindert (**Abbildung 11,13**). Die durchgeführte GSEA Analyse verdeutlicht eine signifikante Mikrobiom-abhängige Unterdrückung von Genfunktionen, die die endogene Synthese von Sphingomyelin vermittelt. Der Sphingolipid-Stoffwechselweg ist im Leberendothel von keimfreien Mäusen signifikant hochreguliert (**Abbildung 11, 12 und 13**). Schlüsselenzyme für die Synthese von Sphingomyelin, wie *Sphingomyelinsynthase-1* (*Sgms1*) und *Sphingomyelinphosphodiesterase 3* (*Smpd3*) katalysieren die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid und sind unter keimfreien Haltungsbedingungen hochreguliert. Des Weiteren wurde die *alkalische Ceramidase-2* (*Acer2*), welche Ceramid in Sphingosin spaltet und die *Sphingosinkinase 1* (*Sphk1*), die die Phosphorylierung von Sphingosin zum signalaktivierenden Metaboliten S1P katalysiert (**Abbildung 12**), ebenfalls in den sinusoidalen Leberendothelzellen keimfreier Mäuse im Vergleich zu konventionell aufgewachsenen Mäusen verstärkt exprimiert. Das Vorhandensein der Mikrobiota führt zu einer Unterdrückung verschiedener Komponenten des Sphingolipid-Metabolismus.

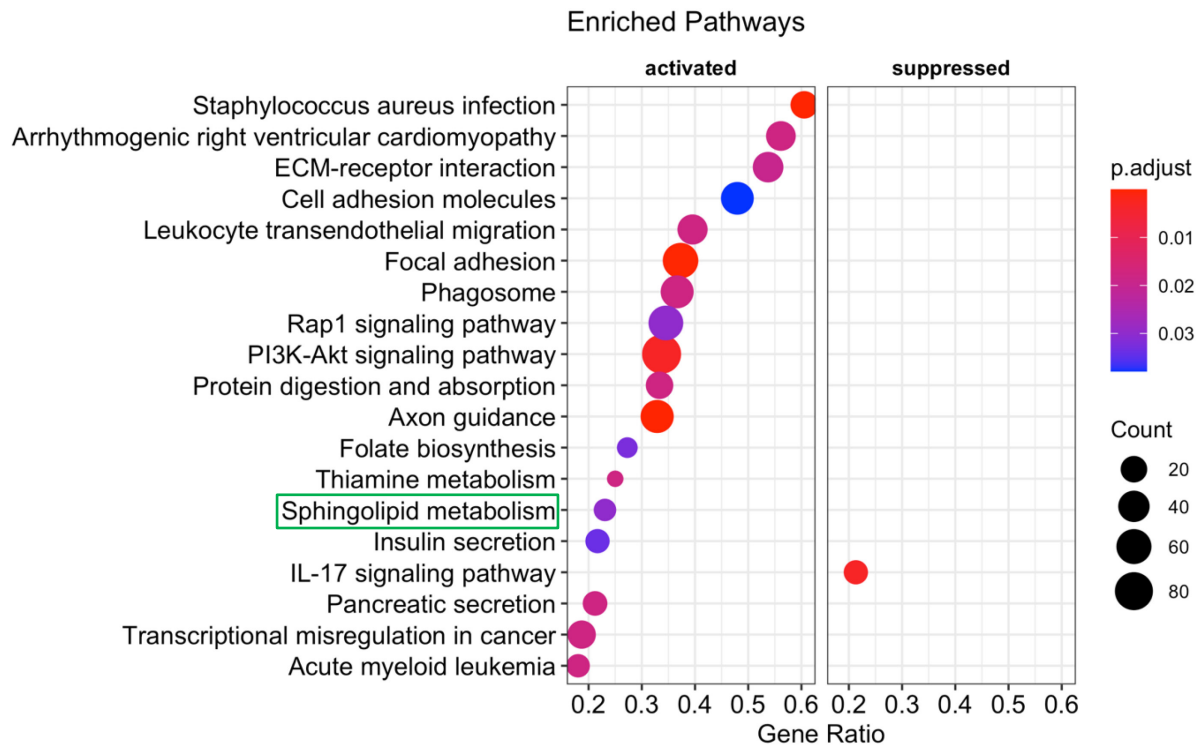


Abbildung 11 Gene-set enrichment Analyse der KEGG Signalwege. Insgesamt wurden 19 KEGG-Signalwege in den sinusoidalen Leberendothelzellen keimfreien Mäusen signifikant (p.adjust 0,05; Log₂FC) reguliert. Signalwege mit einem positiven Score wurden als angereichert angesehen. Die Größe der Punkte entspricht der Anzahl an Genen im Referenzgenusatz. Das Genverhältnis ist gleich der Anzahl der Gene in der Teilmenge geteilt durch die Gesamtgröße der Genmenge. Die Farbe der Punkte entspricht der Signifikanz (Benjamini-Hochberg-Methode).

5 Ergebnisse

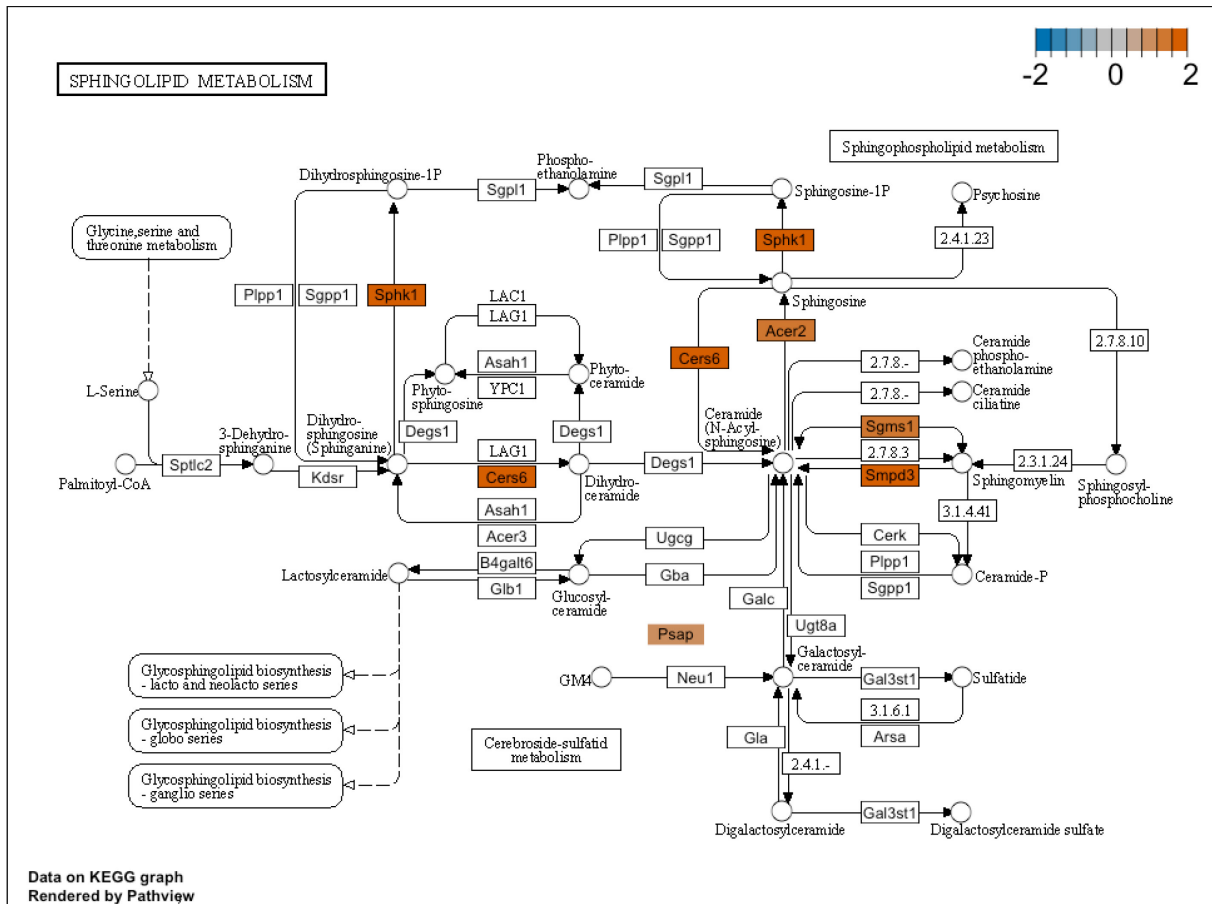


Abbildung 12 Visualisierung des KEGG-Signalwegs des Sphingolipid-Metabolismus. Differenziell exprimierte Gene des KEGG Sphingolipid-Metabolismus sind entsprechend ihrer log₂FC gefärbt. Positive log₂FC-Werte (rot) zeigen Gene, die in keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell aufgewachsenen Mäusen hochreguliert sind.

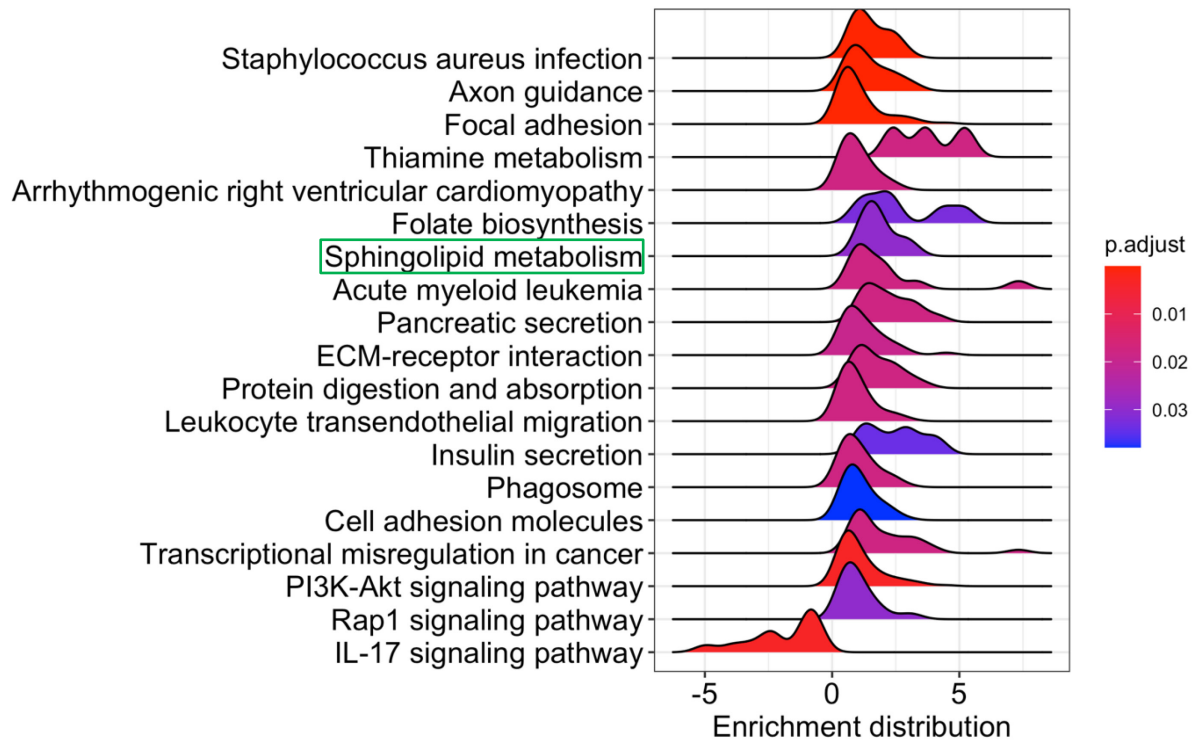


Abbildung 13 GSEA Verteilung der log₂FC von Genen, die signifikant verändert sind. Positive log₂FC weisen auf Gene hin, die in keimfreien Mäusen hochreguliert sind und zeigen den entsprechenden Signalweg an.

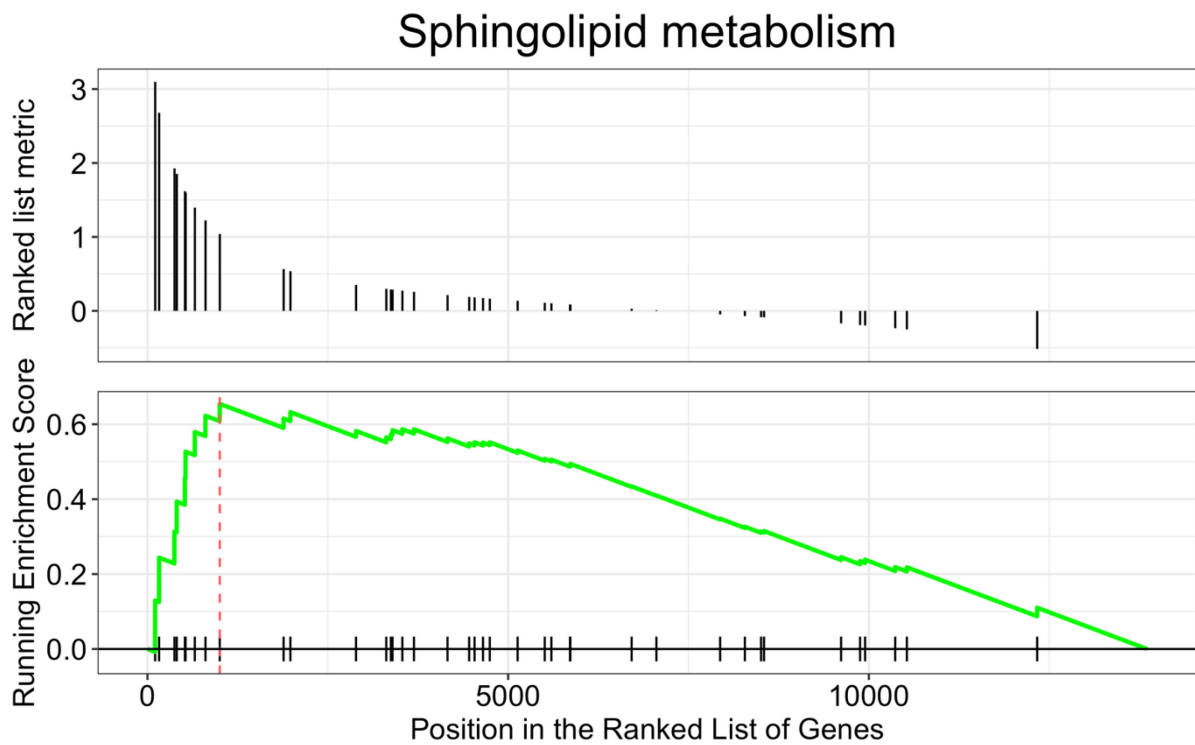


Abbildung 14 GSEA Diagramm für den Sphingolipid Metabolismus. Das obere Diagramm zeigt die $\log_2\text{FC}$ (Ranglistenmetrik) für die Gene, die im Gegensatz des Sphingolipid-Metabolismus enthalten sind. Das untere Diagramm zeigt den Anreicherungsscore als Funktion der Position der Gene entlang des geordneten Gensets. Der Maximalwert (gestrichelte rote Linie) zeigt den endgültigen Anreicherungswert für den Pfad an.

5.1.4 Vergleichende Gen-Ontologie Analyse der Versuchsgruppen GF gegen CONV-R Mäuse

Um eine Vereinfachung der einzelnen regulierten Gene zu liefern und deren unterschiedlichen Funktionen herauszufinden, werden bestimmte Gene in sogenannte „Gene Ontology“ (GOs) zusammengefasst, um die genaue Funktion und Bedeutung zu verstehen. Hierbei wird zwischen folgenden Gruppen unterschieden: biologische Prozesse (Biological Process), zelluläre Bestandteile (Cellular Component) und molekulare Funktionen (Molecular Function). Für die Analyse wurde das Online-Tool REVIGO verwendet und separate Anreicherungsanalyse der GOs für die 932 hochregulierten Gene und die 605 herunterregulierten Gene gemacht (169). Wie in **Abbildung 15** und **16** zu erkennen ist, wurden die Top 10 an GOs von hoch- und herunterregulierten Genen im Vergleich GF Mäuse gegen CONV-R Mäuse in den einzelnen Gen-Ontologie-Gruppen dargestellt. Es wurden alle signifikanten Gen-Ontologien gezeigt, die einen Adjusted P-Wert $<0,01$ aufwiesen. In der Kategorie „biologische Prozesse“ wurden folgende Transkripte in GF Mäusen hochreguliert: Regulation des Phosphatstoffwechsels; Regulation der Proteinmodifikation; Regulation der Zellproliferation; enzymgekoppelter Rezeptorsignalweg; Biosyntheseprozess reaktiver Sauerstoffspezies; Regulation der Signaltransduktion; angeborene Immunantwort; Immunsystemprozess; Tubenmorpogenese und apoptotischer Prozess. Im Vergleich zu den GF Mäusen führten folgende Transkripten in CONV-R Mäusen zu einer erhöhten Expression wie die zelluläre Reaktion auf Stress; die Zellteilung; das Andocken von Vesikeln; die Regulation der adhärenen Zellverbindungen; DNA-Konformationsänderung; Pyrimidin-Desoxyribonukleosidtriphosphat; Pentosephosphatweg; Regulierung der Alkoholbiosynthese; Etablierung der Proteinlokalisierung und der Hedgehog-Signalweg. Es ist zu erkennen, dass die identifizierten differenziell exprimierten Gene, die in allen drei GO Kategorien zu finden

5 Ergebnisse

sind, die Funktionalität des mikrovaskulären Leberendothels durch den Kolonisationsstatus des Wirtes beeinflussen.

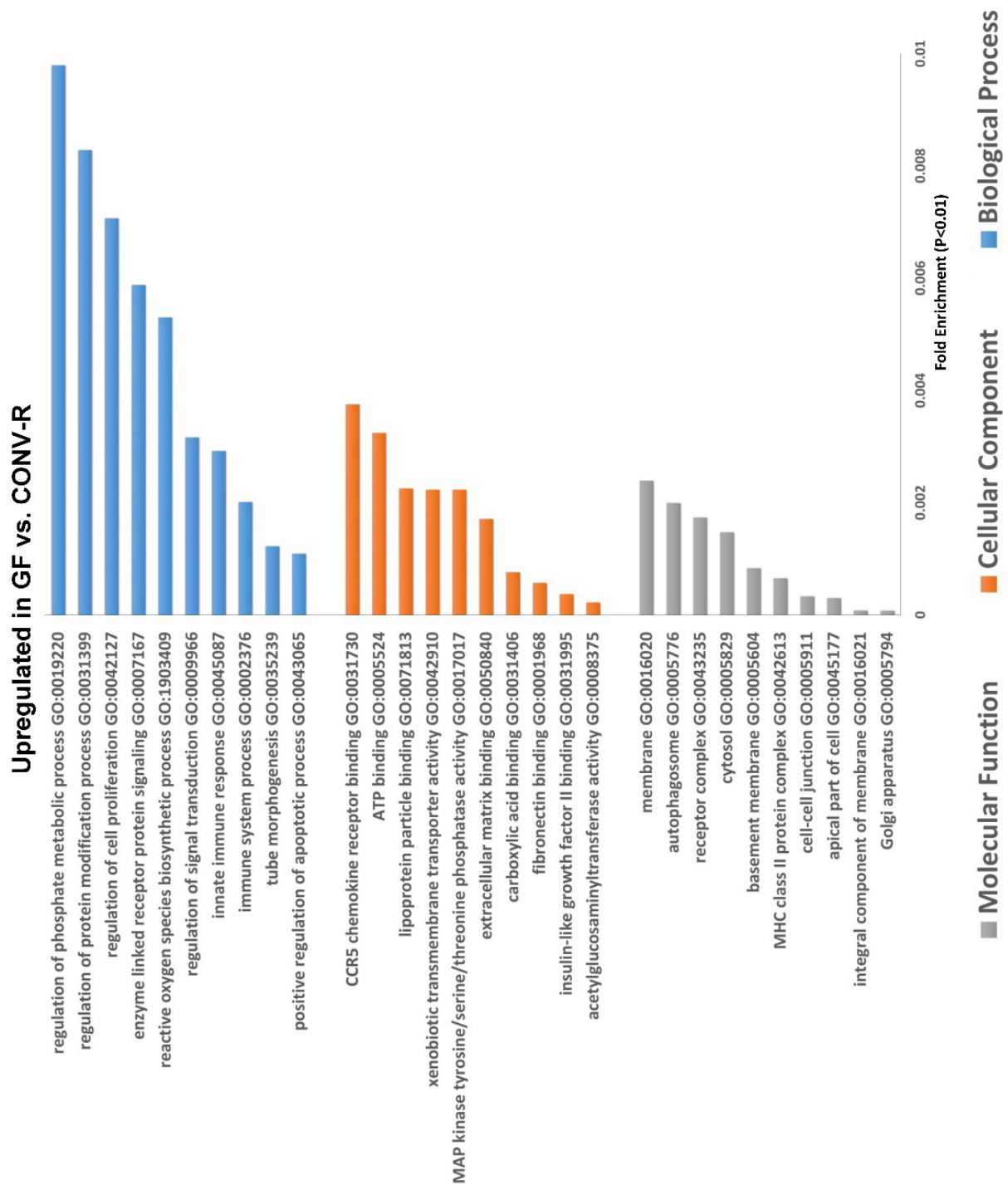


Abbildung 15 Gen-Ontologie Analyse der hochregulierten Genfunktionen im Vergleich von GF Mäusen gegen CONV-R Mäusen. Darstellung der Top 10 an Gen Ontologies der Gruppen biologische Prozesse, zelluläre Komponenten und molekularen Funktionen. Die gezeigten GOs haben eine Signifikanz von Adjusted P-Wert <0,01.

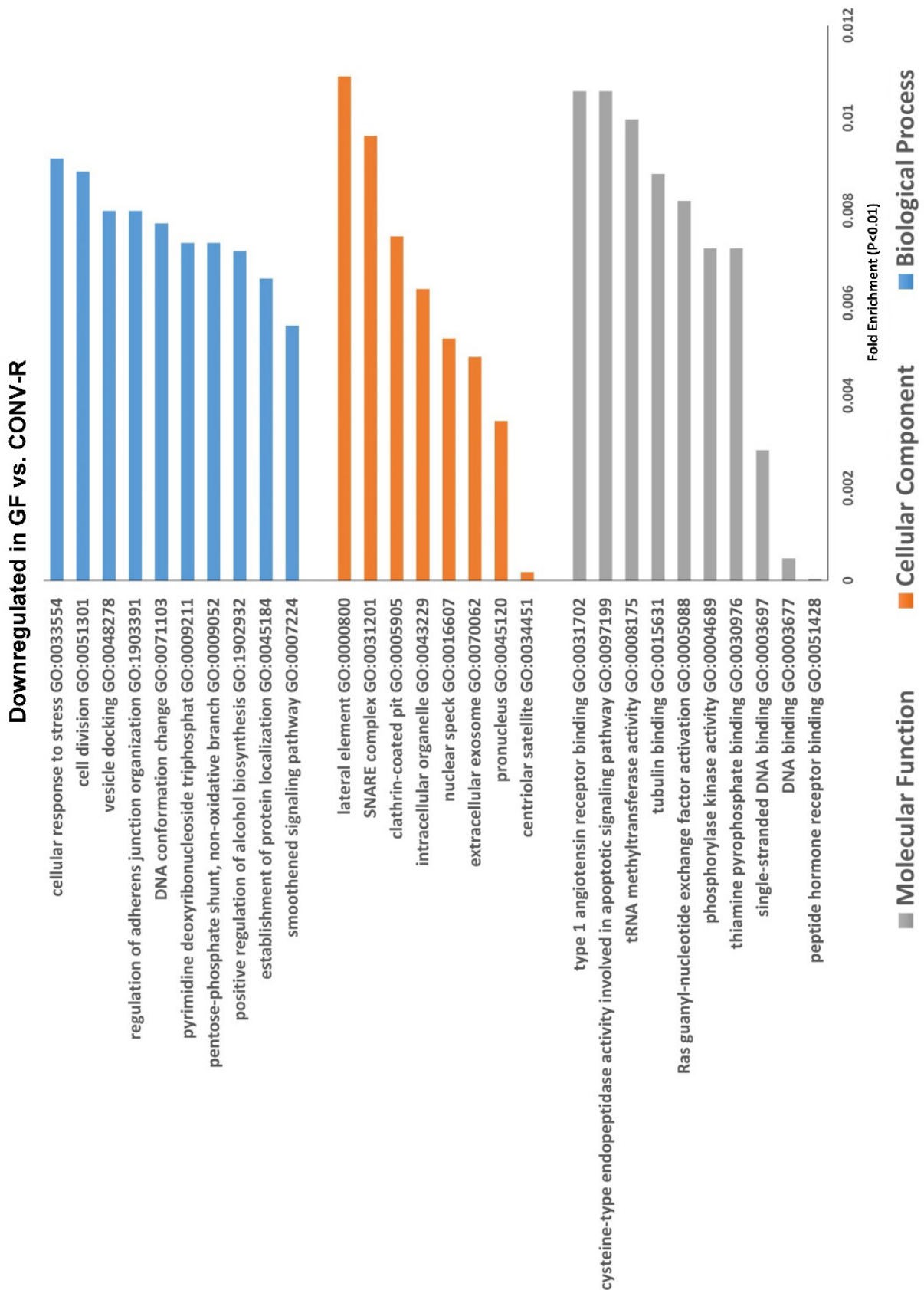


Abbildung 16 Gen-Ontologie Analysen der herunterregulierten Genfunktionen im Vergleich von GF Mäusen gegen CONV-R Mäusen. Darstellung der Top 10 an Gen Ontologies der Gruppen biologische Prozesse, zelluläre Komponenten und molekularen Funktionen. Die gezeigten GOs haben eine Signifikanz von adjusted P-Wert <0,01.

5.2 Untersuchung der relativen mRNA Expression für den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus und den Sphingosinmetabolismus in GF und CONV-R Mäusen

Um die in der Transkriptomanalyse erhaltenen Ergebnisse weiter zu validieren, wurde erneut die Leber aus GF und CONV-R Mäusen herauspräpariert, die Endothelzellen isoliert, mRNA gewonnen und anschließend die entsprechenden Zielgene für den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus und Sphingosinmetabolismus mithilfe der qRT-PCR analysiert. Der Unterschied zu den in der RNA-Sequenzierung verwendeten Proben bestand darin, dass diese zusätzlich noch über ein FACS sortiert wurden, um eine höhere Reinheit an Leberendothelzellen zu erhalten. Bei den in dieser Untersuchung verwendeten Proben handelt es sich um unabhängige MACS-sortierte Leberendothelzellen. In **Abbildung 17** sind die zu untersuchenden Gene *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1* des Sphingosin-1 Signalwegs dargestellt. Für die gezeigten Untersuchungen wurden nur Männchen gleichen Alters verwendet. Die erhaltenen qRT-PCR Analysen des Gallensäure-Cholesterin Metabolismus zeigten eine Mikrobiota-abhängige Reduktion der mRNA Expression der Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* in isolierten sinusoidalen Leberendothelzellen im Vergleich GF gegen CONV-R (**Abbildung 18**).

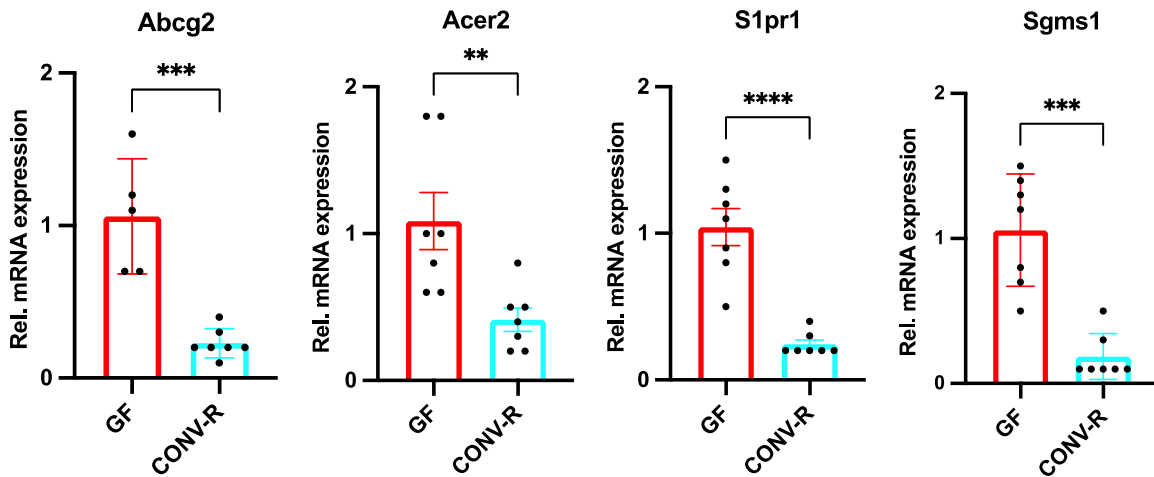


Abbildung 17 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1*. Darstellung der zu untersuchenden Gene für den Sphingosin-1 Signalweg in keimfreien (GF; n=5-7) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R, n=7,) Mäusen. *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1* im Vergleich zu *GAPDH*. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$.

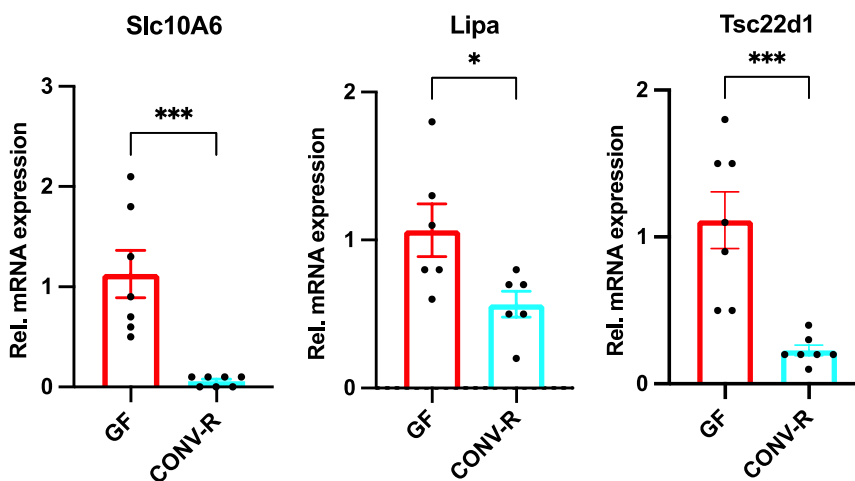


Abbildung 18 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1*. Darstellung der Mikrobiota-regulierten Gene des Gallensäure-Cholesterin Metabolismus in isolierten CD146⁺ sinusoidalen Leberendothelzellen im Vergleich GF (n=5-7) gegen CONV-R (n=7). *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* wurden auf *GAPDH* normalisiert. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$.

5 Ergebnisse

5.2.1 Untersuchung des Sphingolipid-Metabolismus und des Gallensäure-Cholesterin Metabolismus in kolonisierten Mäusen (CONV-D)

Um die Mikrobiota-Abhängigkeit der in 5.2 beschriebenen Ergebnisse zu validieren und auszuschließen, dass die Unterschiede durch den genetischen Drift verursacht werden, wurden keimfreie Mäuse mit dem Feces aus dem Ceacum von konventionell aufgewachsenen Mäusen gavagiert. Nach vier Wochen wurden die Mäuse getötet und die Leber entnommen, Leberendothelzellen über CD146⁺ MACS isoliert, mRNA isoliert und anschließend die mRNA Expression der Zielgene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* für den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus (**Abbildung 19**) und die Zielgene *Abcg2*, *Acer2*, *S1pr1* und *Sgms1* für den Sphingosinmetabolismus (**Abbildung 20**), die durch die RNA-Sequenzierung identifiziert wurden, untersucht. Wie schon im GF gegen CONV-R Vergleich zu erkennen ist, ist in dieser gezeigten Untersuchung eine signifikante Herunterregulierung der einzelnen Gene nach Konventionalisierung sowohl im Gallensäure-Cholesterin Metabolismus als auch im Sphingolipid-Metabolismus zu erkennen. *Slc10A6* zeigt den stärksten signifikanten Effekt.

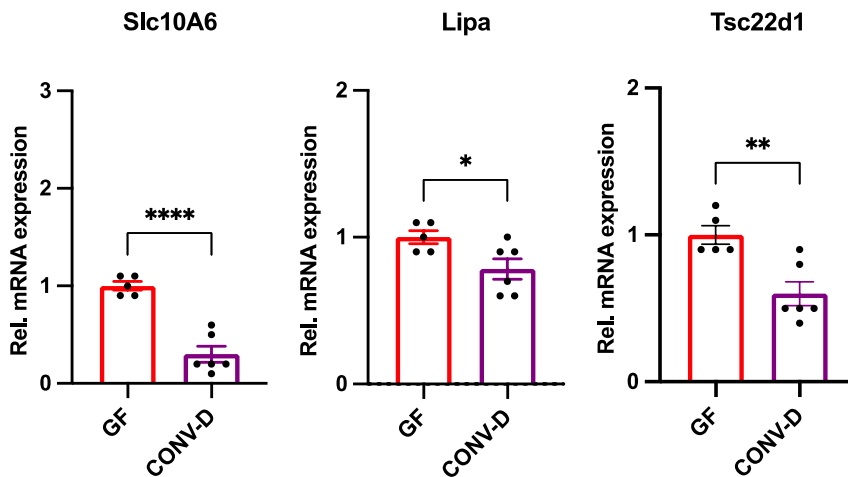


Abbildung 19 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1*. Darstellung der zu untersuchenden Gene für den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus über CD146⁺ MACS isolierten Leberendothelzellen in keimfreien (GF; n=7) und konventionalisierten (conventionally-derived; CONV-D; n=6) Mäusen. *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* im normalisiert zu *GAPDH*. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert +- S.E.M. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,005; **** P<0,001.

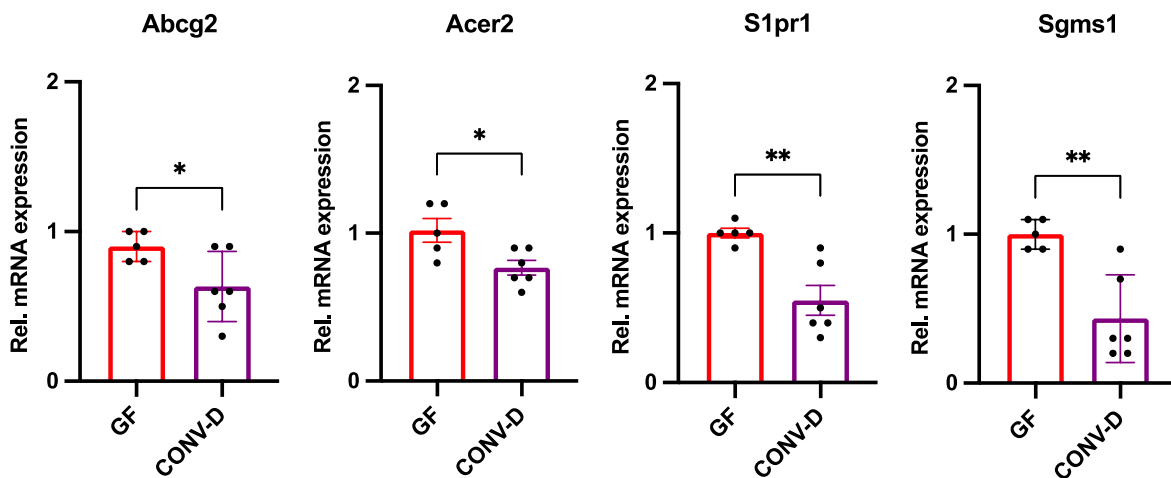


Abbildung 20 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1*. qRT-PCR-Analyse Mikrobiota-regulierter Gene des Sphingolipid-Metabolismus in CD146⁺ MACS-isolierten Leberendothelzellen keimfreier (GF; n=7) und konventionalisierten (CONV-D; n=6) Mäusen. *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1* normalisiert zu *GAPDH*. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert +- S.E.M. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,005; **** P<0,001.

5 Ergebnisse

5.2.2 Untersuchung des Einflusses von *Bacteroides thetaiotaomicron* auf den Sphingosin-1-Phosphat Weg und den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss des intestinalen Bakteriums *Bacteroides thetaiotaomicron* auf den Sphingosinlipid-Metabolismus und Gallensäure-Cholesterin Metabolismus genauer untersucht. Es sollte gezeigt werden, dass die gefundenen Mikrobiota abhängigen Stoffwechselwege zum einen durch ein Bakterium reguliert sind, zum anderen ist aus der vorhandenen Literatur bekannt, dass dieses Bakterium Angiogenese und Gefäßumbau im Dünndarm induziert (170). Bei dem genannten Bakterium handelt es sich um ein gramnegatives, anaerobes Bakterium, der ein häufiger Symbiont des unteren Darms ist (171). Dazu wurden keimfreie Mäuse mit dem Bakterienstamm *Bacteroides thetaiotaomicron* für vier Wochen unter gnotobiotischen Isolatorbedingungen monokolonisiert und auf die entsprechenden Gene *Abcg2*, *Acer2*, *S1pr1* und *Sgms1* des Sphingosin Metabolismus und die Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* des Gallensäure-Cholesterin Metabolismus untersucht. Zunächst wurde die Monokolonisierung keimfreier Mäuse mit *B. thetaiotamicron* überprüft. Dazu wurde mit isolierter gDNA eine PCR mit 16S-rDNA Primern und spezifischen *B. thetaiotamicron*-Primerpaaren gemacht (**Abbildung 21**). In allen Käfigen, in denen Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen behandelt wurden, ist im anschließenden Agarosegel jeweils eine spezifische PCR-Bande für *B. thetaiotaomicron* zu erkennen. Die 16S-rDNA liegt bei 500 bp, während der spezifische Primer für *B. thetaiotaomicron* bei ca. 720 bp liegen. In **Abbildung 22** ist die mRNA Expression der Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* des Gallensäure-Cholesterin Metabolismus dargestellt. In den zu untersuchenden Genen *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* ist kein signifikanter Unterschied in der mRNA Expression zu erkennen.

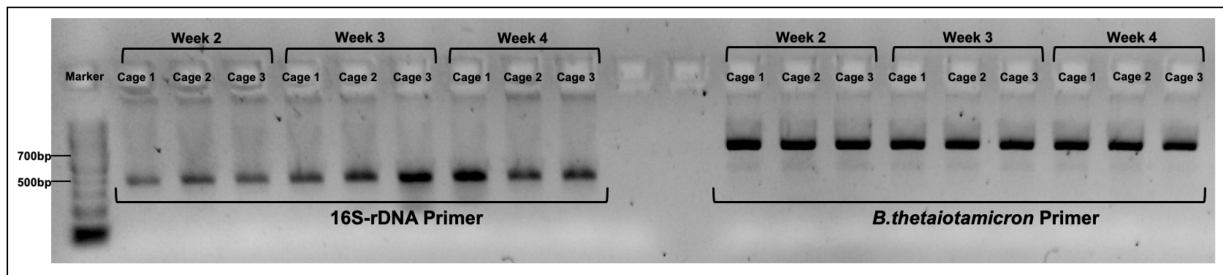


Abbildung 21 Überprüfung der Kolonisierung keimfreier Mäuse mit *B.thetaiotaomicron*. Gezeigt wird das Agarosegel, der Käfige mit den monokolonisierten Mäusen über einen Zeitraum von 4 Wochen. Um einen Nachweis der Monokolonisierung zu erhalten wurden zum einen 16S-rDNA Primer und spezifische *B.thetaiotaomicron* Primer verwendet.

In **Abbildung 23** ist die mRNA Expression der Gene *Abcg2*, *Acer2*, *S1pr1* und *Sgms1*, welche Bestandteile des Sphingolipid Metabolismus sind, dargestellt. In allen vier Genen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die mRNA Expression für *Acer2* ist im Leberendothel *B. thetaiotaomicron*-kolonisierter Mäuse geringfügig höher als in der keimfreien Kontrollgruppe. Für *Sgms1* ist kein Unterschied in der mRNA Expression detektierbar.

5 Ergebnisse

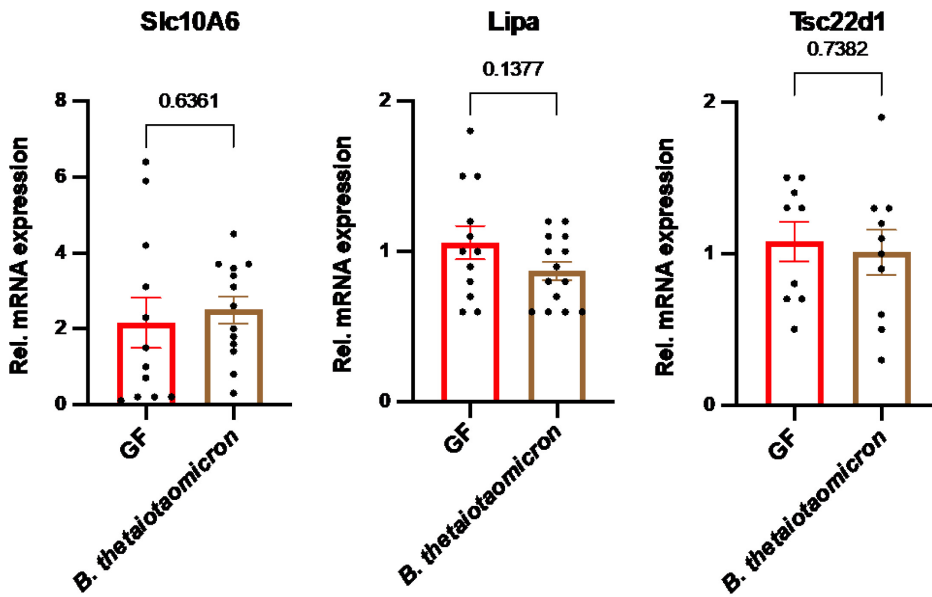


Abbildung 22 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1*. Darstellung der zu untersuchenden Gene *Slc10a6*, *Lipa* und *Tsc22d1* für den Gallensäure-Cholesterin Metabolismus in keimfreien (GF) und *B. thetaiotaomicron*-monokolonisierten Mäusen. *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* im Vergleich zu *GAPDH*. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert +/- S.E.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$. Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

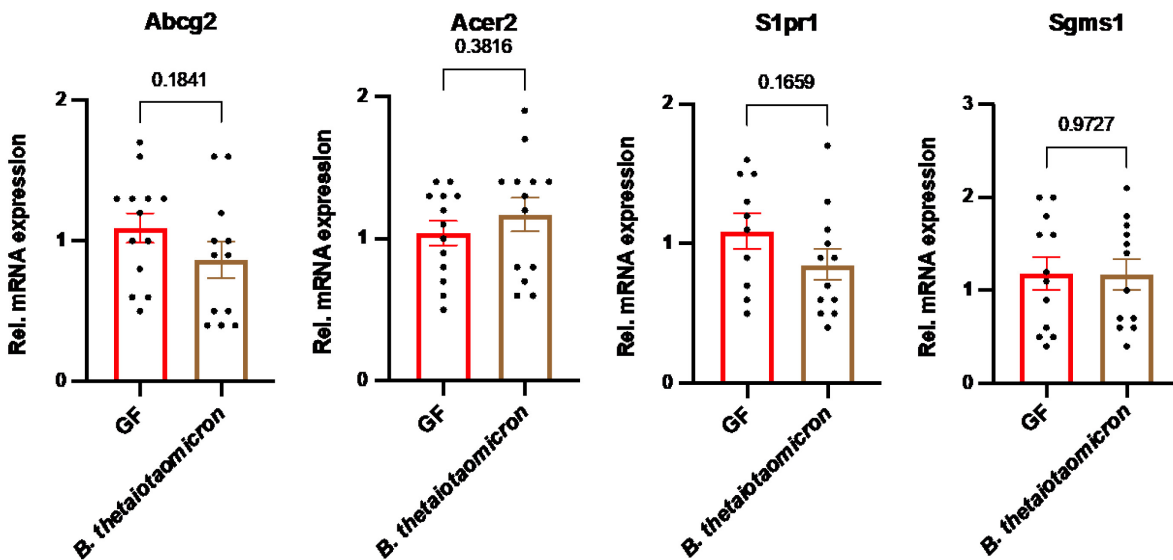


Abbildung 23 Untersuchung der relativen mRNA Expression der Gene *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1*. Darstellung der Gene *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1* für den Sphingosin Metabolismus in keimfreien und *B. thetaiotaomicron*-monokolonisierten Mäusen. *Abcg2*, *S1pr1*, *Acer2* und *Sgms1* normalisiert zu *GAPDH*. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert +/- S.E.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$. Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

5.3 Untersuchung des Proteins der lysosomal acid Lipase (LAL) in den Versuchsgruppen keimfrei und konventionell aufgewachsenen Mäusen

Nachdem in der Transkriptomanalyse die Gene *Slc10A6*, *Lipa* und *Tsc22d1* der Gallensäure (*Slc10A6*, *Tsc22d1*)-Cholesterin (*Lipa*) Metabolismus in GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R Mäusen hochreguliert gewesen ist, wurde dies durch die weitere Untersuchung der relative mRNA Expression bestätigt. In einem letzten Schritt sollte noch der Nachweis auf Proteinebene erfolgen. Dabei wurden die Proteine durch einen Western Blot nach Ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran gebunden und anschließend mit einem primären- und sekundären Antikörper inkubiert, um das Zielprotein der lysosomal acid lipase (LAL) zu detektieren. Abbildung 24 zeigt die Proteinmessung von LAL in konventionell aufgewachsenen und keimfreien Maus Leberpräparaten. In der gezeigten Untersuchung wurden im ersten Schritt keine Endothelzellen isoliert und die ganze Leber auf LAL untersucht. Als Referenzprotein wurde alpha-Actinin gewählt. In den keimfreien Proben ist ein signifikanter Unterschied in der Hochregulierung des LAL Proteins im Vergleich zu den CONV-R Mäusen zu erkennen (**Abbildung 25**).

5 Ergebnisse

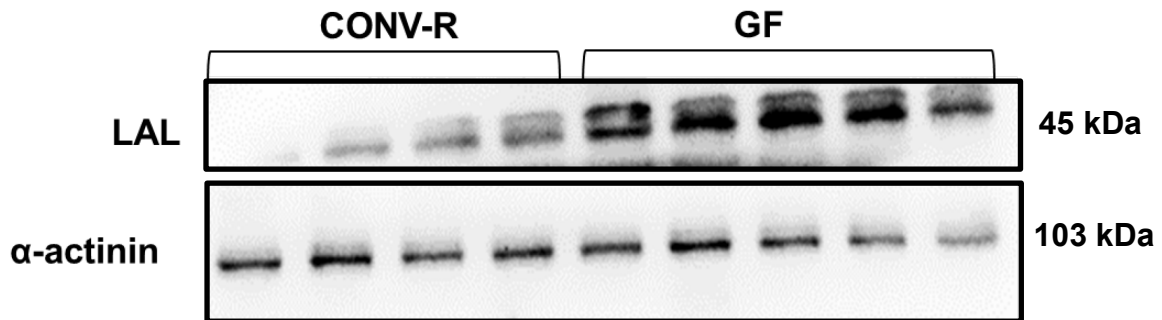


Abbildung 24 Proteinanalyse der Lysosomal acid lipase (LAL). Western Blot-Analyse von totalen Leberlysaten. Für jede Probe wurden 60 µg an Protein aufgetragen. Verglichen wurden konventionell aufgewachsene (CONV-R) Mäuse mit Mäusen aus einer keimfreien Tierhaltung (GF). Als Ladungskontrolle wurde alpha-Actinin verwendet.

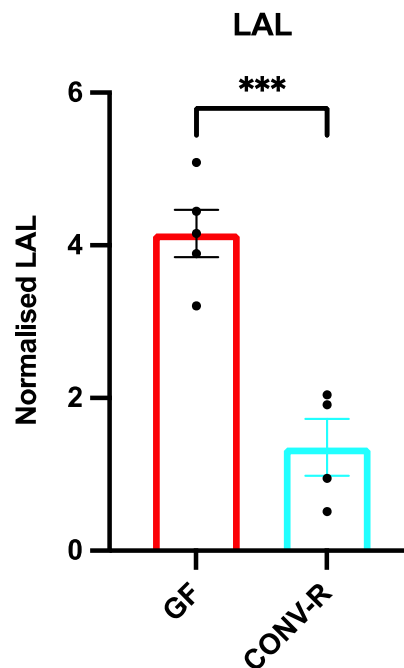


Abbildung 25 Untersuchung des relativen Gehalts an Lysosomal acid lipase (LAL) in totalen Leberlysaten mittels Western Blot. Untersuchung der normalisierten Proteinkonzentration der Lysosomal acid lipase in GF Mäusen gegen CONV-R Mäuse. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$. Ein signifikanter Anstieg des Proteins in den GF Mäusen im Vergleich zu den CONV-R Mäusen ist zu sehen.

In einem weiteren Untersuchungsansatz wurde die Proteinkonzentration an LAL in CD146⁺ MACS isolierten Leberendothelzellen untersucht (**Abbildung 26**). Es wurden 60 µg an totalem Protein aufgetragen. Auf den ersten Blick ist kein signifikanter Unterschied an der Proteinkonzentration von LAL in GF und CONV-R Mäusen zu erkennen. Außerdem ist auffällig, dass ein starker Unterschied in der Ladungskontrolle von alpha-Actinin, sowohl in den GF-Proben als auch in CONV-R Proben, existiert. Dies bestätigt sich in der weiteren Analyse, in der LAL auf die Ladungskontrolle alpha-Actinin normalisiert wurde. Hierbei wurde kein signifikanter ($p=0,51$) Unterschied zwischen GF und CONV-R Mäusen gefunden (**Abbildung 27**).

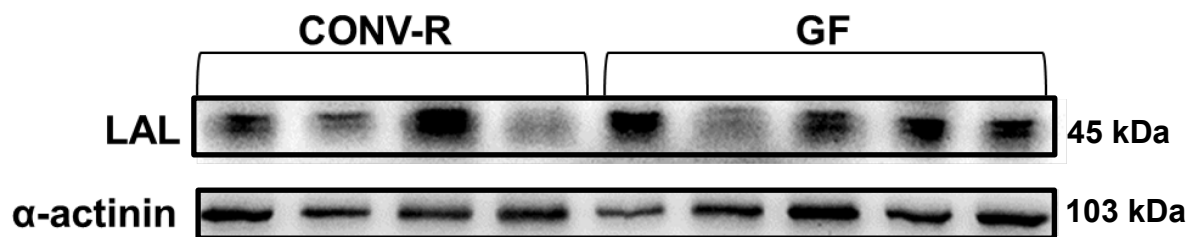


Abbildung 26 Untersuchung des Proteins der Lysosomal acid Lipase. Darstellung der Proteinanalyse des Proteins Lysosomal acid Lipase und der Ladungskontrolle alpha-Actinin. Es wurden vier Proben von CONV-R Mäusen (CONV-R) und fünf Proben von CD146⁺ MACS isolierten Leberendothelzellen von GF Mäusen untersucht.

5 Ergebnisse

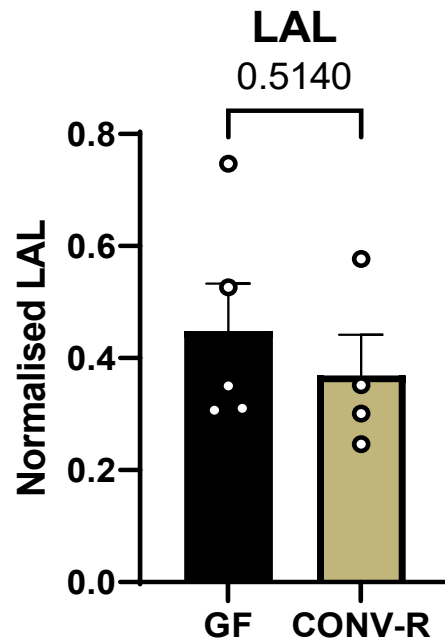


Abbildung 27 Darstellung der normalisierten LAL Proteinkonzentration. Untersuchung der normalisierten Proteinkonzentration der Lysosomal acid Lipase in CD146⁺ MACS isolierten Leberendothelzellen von GF und CONV-R Mäusen. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert +- S.E.M. * P<0,05; ** P<0.01; *** P<0,005; **** P<0,001. Es ist kein signifikanter Unterschied in der LAL Proteinkonzentration zu sehen.

6 Diskussion

In den letzten 10 -15 Jahren ist der gnotobiotische Forschungsbereich gewachsen und hat stets einen Zuwachs an Interesse erfahren. Gerade die Kombination und Entwicklung von *Next generation sequencing* Methoden in der Gnotobiotik und Bioinformatik haben die Untersuchungsgrundlagen revolutioniert. Die ersten Experimente in der Gnotobiotik wurden damit begonnen, dass einzelne Untersuchungen hinsichtlich der Zusammensetzung der menschlichen Darmbakterien durchgeführt wurden. Mit der Zeit entwickelte sich eine Evidenz, dass einige Krankheiten wie Arteriosklerose, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen durch die Mikrobiota beeinflusst werden (172, 173). Somit sind einige strukturelle Zusammenhänge untersucht worden und auch wissenschaftliche belegt.

Diese Arbeit beschreibt eine Mikrobiota-Abhängigkeit von Transkripten in Leberendothelzellen der Maus. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden gnotobiotische Mausmodelle verwendet. Da keimfreie Tiere, frei von der Besiedlung jeglicher Art an Mikroorganismen sind (174), eignen sich diese hervorragend für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Eine Behandlung von CONV-R Mäusen mit Antibiotika erreicht eine annähernde Reduzierung der Mikroorganismen im Darm, ist jedoch kein vergleichendes Mausmodell in Bezug auf die keimfreie Tierhaltung (175). In einem ersten Schritt wurde eine geeignete Methode zur Isolation sinusoidaler Leberendothelzellen der Maus etabliert. Das Leber Dissoziation Kit der Firma Miltenyi mit anschließendem FACS Sorting hat den besonderen Vorteil, dass eine sehr hohe Ausbeute an sinusoidalen Leberendothelzellen erzielt wurde. Die gute Reproduzierbarkeit lag im Fokus.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung des Mikrobioms auf die mRNA-Expression der Leberendothelzellen.

Die enthaltenen RNA-Sequenzierungsdaten (Illumina HiSeq 4000-Sequenzierers) der Leberendothelzellen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen. Bei der durchgeführten RNA-Sequenzierung des Transkriptoms isolierter sinusoidaler Leberendothelzellen ist anhand des Mappings von Reads ein großer Datensatz von hoch- und herunterregulierten Genen entstanden. Diese wurde zunächst durch Bioinformatische Programme aufgearbeitet und nach ihrer Signifikanz sortiert. In der Hauptkomponentenanalyse (**Abbildung 8**) des Vergleichs keimfreie Mäuse gegen konventionell aufgewachsenen Mäuse ist ein deutliches Clustern der einzelnen Leberproben aus den beiden Gruppen zu sehen. Nachdem die Verteilung der einzelnen Proben bestimmt wurde, wurde in einer weiteren Analyse nach den im sinusoidalen Leberendothel differenziell exprimierten Genen im Vergleich keimfreier Mäuse gegen konventionell aufgewachsener Mäuse gesucht. In **Abbildung 9** werden diese Daten in einem Volcano Plot gezeigt. Hierbei sind 7-mal so viele Gene im hochregulierten Bereich von GF Mäusen identifiziert worden als im Vergleich zum herunterregulierten Bereich. Dies wird auch in der Heatmap deutlich. Die in der Heatmap (**Abbildung 10**) dargestellten Gene zeigen die Top-50 an hoch- und herunterregulierten Genen im Vergleich keimfreier Mäuse zu konventionell aufgewachsenen Mäusen. Wie schon im Vulkan Plot zu sehen, ist auch in der Heatmap, der größere Teil an hochregulierten Genen, in den keimfreien Mäusen zu finden. Um anschließend eine Aussage über den Einfluss der Mikrobiota auf das Leberendothel zu treffen, wurden die einzelnen Gene über Plattform GeneCards (103)

genauer auf dessen Funktion und deren Endothel spezifischen Eigenschaft untersucht (**Tabelle 18 + 19**).

Zu Beginn der 60er-Jahre war die cholesterinsenkende Funktion der Darmmikrobiota in der Leber bekannt (104), jedoch hängt diese Funktion weitestgehend von der Ausscheidung ab, die durch mikrobielle Biohydrierung zu hydrophilem Coprostanol verursacht wird (105). Die cholesterinsenkende Funktion wird vor allem durch Spezies der *Laktobazillen* verursacht und unterstützt die enzymatische Verstoffwechslung der Gallensäure (176, 177). Die in der Leber stattfindende zelluläre Regulation des endothelialen Cholesterinflusses ist zum aktuellen Zeitpunkt ungelöst. In dieser Arbeit wurden aufgrund der Literatur mehrere Gene identifiziert, die einen Einfluss auf die Regulation des Cholesterins haben (106-108, 110, 126-129). Diese Gene sind in Leberendothelzellen von keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell aufgewachsenen Mäusen hochreguliert (**Abbildung 18**). In einer früheren Studie wurde die Regulation des Na⁺-abhängigen Gallensäuretransporters *solute carrier family 10 member 6 (Slc10a6)* über die Aktivierung durch LPS in Abhängigkeit des Kernrezeptors FXR und dem Retinoid-X-Rezeptor gezeigt (107, 178). In dieser Arbeit dagegen wurde eine erhöhte Expression von *Slc10a6* in keimfreien Mäusen gefunden. In der Veröffentlichung von Kiouptsi et al. (109) wurde ein erhöhter Lipoproteinspiegel im Plasma bei keimfreien Mäusen nachgewiesen, die mit einer Chow Diät gefüttert wurden. Die Expression von *Tsc22d1*, welches ein entscheidender Transkriptionsfaktor bei der Bildung von Lipoproteinen ist (108), war im Leberendothel von keimfreien Mäusen erhöht. Ebenso war das Transkript der Lipase A, welches Cholesterylester und Triglyceride im Lysosom hydrolysiert, in keimfreien Mäusen hochreguliert. Lipase A spielt unter anderem eine wichtige Rolle als Regulator des mTOR Signalwegs und der Endothelbarriere (110, 179).

6 Diskussion

Bei der durchgeführten Transkriptomanalyse wurden ein Signalweg identifiziert, bei dem es sich um die endogene Synthese von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) handelt. S1P ist ein Lipidmediator, der bei der Verstoffwechslung von Sphingomyelin gebildet wird (180). Bei der Klasse der Vertebraten wird der S1P in die extrazelluläre Umgebung sezerniert und besitzt eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade, um die Zell-Zell – und Zell-Matrix-Adhäsion zu regulieren (181). Diese Regulierung beeinflusst die Zellmigration, Differenzierung und das Überleben der Zelle. Die Expression und Lokalisierung von S1P-Rezeptor wird dynamisch reguliert und steuert die Gefäßentwicklung, Gefäßstabilität und den Transport von Immunzellen(182) (180). Zudem werden entscheidende Prozesse durch den S1P Stoffwechsel wie die Embryogenese, Angiogenese (183) oder Neurogenese (184) reguliert. In den Endothelzelle hat der Sphingosin Metabolismus einen großen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der endothelialen Zellbarriere (185). Der S1P-Syntheseweg ist im Leberendothel von keimfreien Mäusen hochreguliert (**Abbildung 10, Tabelle 18**). Folgende Enzyme sind Schlüsselenzyme des Sphingomyelin Signalwegs. Bei der Sphingomyelinsynthase-1 (*Sgms1*) handelt es sich um ein Enzym, welches die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid katalysiert. Ein weiteres Schlüsselenzym ist die alkalische Ceramidase (*Acer2*), welches Ceramid in den signalaktiven Metaboliten S1P (Sphingosin-1-Phosphat) spaltet. Der signalaktive Metabolit S1P wird durch die *ATP Binding Cassette Superfamily 6 Member-2* (*Abcg2*) zum G-Protein gekoppelten Rezeptor *S1pr1* transportiert (**Abbildung 28**).

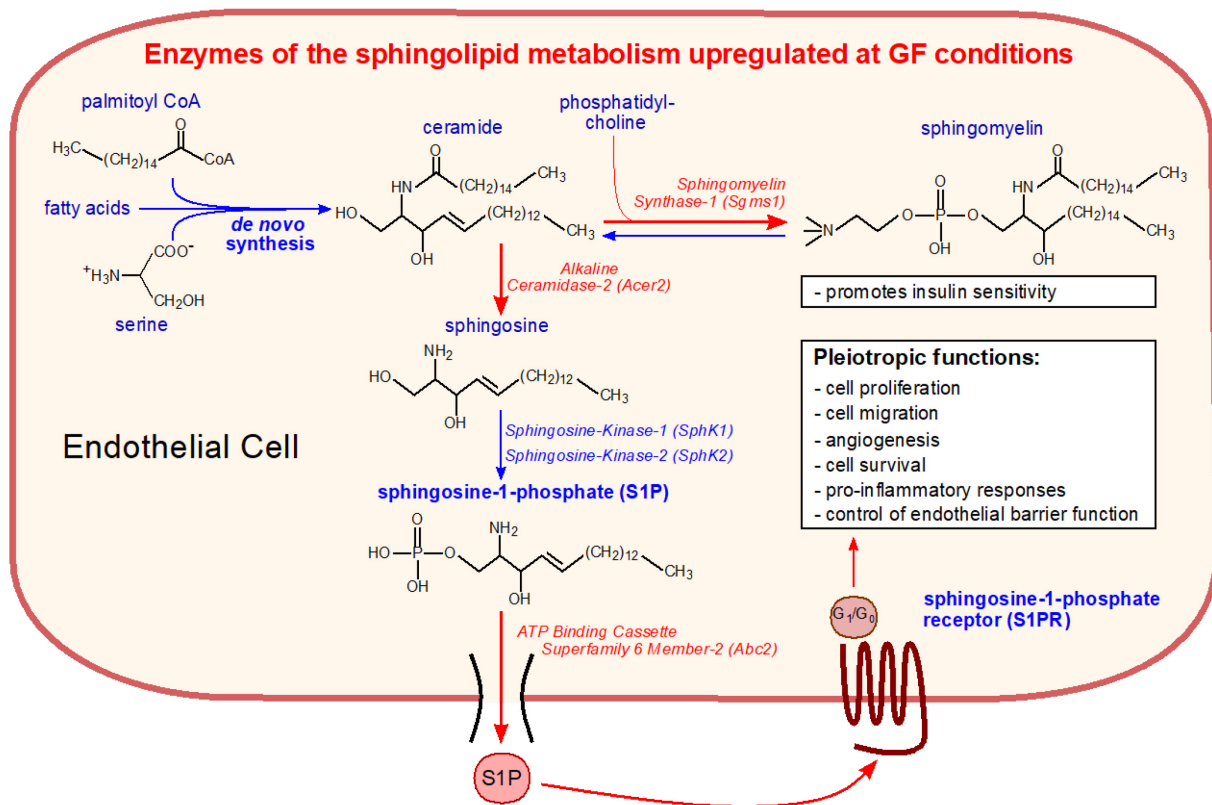


Abbildung 28 Signalweg des Sphingomyelin. Der Sphingomyelin Metabolismus ist in den hepatischen Endothelzellen von GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R Mäusen hochreguliert. Hierbei wird Sphingomyelin über *Sgms1* zu Ceramid verstoffwechselt, um anschließend über *Acer2* zu Sphingosin katalysiert zu werden. Über die Enzyme *Sphk1* und *Sphk2* wird aus Sphingosin, Sphingosin-1-Phosphat gebildet, welches anschließend über *Abc2* zu dem Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor (S1PR) verstoffwechselt wird.

Folgende Enzyme *Sgms1*, *Acer2*, *Abc2* und *S1pr1*, die am Sphingomyelin Metabolismus beteiligt sind, sind in keimfreien Mäusen hochreguliert. Dies zeigt, dass dieser Signalweg durch das Vorhandensein der Mikrobiota erfolgreich unterdrückt wird. Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass bestimmte Bakterien die Fähigkeit besitzen aus Serinpalmitoyltransferase eigene Sphingolipide herzustellen, die vom Wirt aufgenommen werden und eine inhibitorische Wirkung auf den Wirts eigenen Lipidstoffwechsel haben (186, 187).

6 Diskussion

Bei dem S1P-Signalweg handelt es sich um einen zentralen Regulationsweg der Gefäßfunktion und ist maßgeblich an der Proliferation des Endothels, der Zellmigration (111), der Angiogenese (112), des Zellzyklus (113) und der Entzündungshemmung beteiligt. Somit gewährleistet der Sphingosin-1-Phosphat Weg die Kontrolle der Endothelbarriere (114, 115). Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, der Hochregulation des S1P-Signalweges im Leberendothel von keimfreien Mäusen, lässt sich mit einer von Johnson et al. (186) durchgeführten Metabolomics Studie verbinden. Diese konnten ebenfalls zeigen, dass der Bakterienstamm *Bacteroides*, ein Hauptphylum der Darmmikrobiota von Säugetieren eine entscheidende Quelle für Sphingolipide ist. Diese abgegebenen Sphingolipide werden über die Pfortader im ganzen Wirt verteilt und haben abhängig von der mikrobiellen Palmitoyltransferase einen Einfluss auf die Ceramid – und den Sphingomyelinspiegel.

Die erhaltenen Daten aus der Untersuchung lassen darauf hindeuten, dass in Abwesenheit der Mikrobiota der Wirt eine kompensatorische Fähigkeit besitzt zur endogenen Sphingosinsynthese durch das Leberendothel, um die S1P-Signalübertragung aufrechtzuerhalten (186). Von der Mikrobiota abgeleitete Sphingolipide besitzen eine immunologische Eigenschaft. Dies wurde in der Arbeit von Wieland Brown et al. beschrieben, bei dem das Glykosphingolipid Galactosylceramid, welches von *Bacteroides fragilis* produziert wird, als Agonist gegen CD1B-natürliche Killer Zellen (iNKT) wirkt (188).

Die Transkriptomanalyse von keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen zeigt eindeutig, dass die Endothelzellen der Leber ein wichtiger Ort für die Wirkung der Mikrobiota auf den Sphingosin Metabolismus als auch auf andere wichtige Stoffwechselprozesse wie z.B.: den Cholosterinmetabolismus, den Gallensäurestoffwechsel oder die Angiogenese, besitzen. Die Darmmikrobiota haben einen

großen Einfluss auf den Sphingosin Metabolismus als auch signalrelevante Quellen (186, 188) durch die Regulierung bestimmter Schlüsselfunktionen in deren Expression. Somit ist es von zentraler Bedeutung, die Wechselwirkung zwischen Wirt und Mikrobiota hinsichtlich der Physiologie in unterschiedlichen Gefäßsystemen zu untersuchen und zu beschreiben. Die genannte Verbindung zwischen Mikrobiota und der Leberendothelzellfunktion ist von enormer translationaler Bedeutung, da der S1P-Signalweg die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Gefäßthrombose beeinflusst (189). Pathophysiologisch stehen einige Lebererkrankungen mit dem Darmmikrobiom in Verbindung. Hier ist die Dysbiose bei der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) zu nennen, bei der es sich um eine weitverbreitete Erkrankung in der Leberpathologie handelt (190). Menschen, die an einer NAFLD leiden bzw. erkrankt sind, zeigen, dass zum einen die Ernährung als auch das tägliche Bewegen eine tiefgreifende Auswirkung auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms besitzt (191, 192). Der Einfluss des Darmmikrobioms auf das Leberendothel wurde in Krankheitsmodellen wie Leberzirrhose, Hypertonie und Fettlebererkrankungen noch nicht hinreichend untersucht und bietet neue Forschungsschwerpunkte. Außerdem bildet der natürliche Alterungsprozess weitere potenzielle Untersuchungsmöglichkeiten, da dies in Zusammenhang mit der Störung des Lipidstoffwechsels oder Krankheiten wie Arteriosklerose steht (193). Gerade hinsichtlich der Erforschung solcher Krankheiten werden die Signaturen des Darmmikrobioms als Biomarker genutzt (194). Die Verbindung des Mikrobioms und der Leberendothelzellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigen eine etablierte Rolle in der Regulierung des angeborenen Immunsystems und sind die Grundlage für zukünftige Untersuchungen (195). Perspektivisch zeigt die Erkenntnis aus dieser Arbeit, der Einwirkung der Mikrobiota auf das Leberendothel, dass Erkrankungen wie Leberzirrhose, portale Hypertonie oder NAFLD begründet sind. Gerade ein

6 Diskussion

funktioneller Zusammenhang hinsichtlich des natürlichen Alterungsprozesses muss weiter untersucht werden. Es ist bekannt, dass das Altern einen Einfluss auf das Leberendothel hat und dadurch ein Treiber für gestörte Stoffwechselprozesse ist.

7 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der intestinalen Mikrobiota auf die Endothelzellen in der Leber. Für die gezeigten Experimente wurde das gnotobiotische Tiermodell verwendet. Hierbei handelte es sich um keimfreie C57BL/6J Mäuse, die frei von jeglicher Art an Mikroorganismen gewesen sind. Im Vergleich zu den keimfreien Mäusen standen Mäuse, die konventionell aufgewachsen sind und eine Besiedlung mit Mikroorganismen besaßen.

Der Einfluss der Mikrobiota auf das Leberendothel sollte auf Transkriptomebene untersucht werden. Dabei wurden den Mäusen die Leber entnommen, Endothelzellen über CD146⁺ MACS isoliert, über das FACS (CD31/CD105/CD146) sortiert, aus den sortierten Zellen RNA isoliert, um anschließend eine RNA-Sequenzierung durchzuführen. Bei den erhaltenen Datenmengen und der bioinformatischen Auswertung der einzelnen Transkripte wurden zwei Signalwege identifiziert, die Mikrobiota-abhängig reguliert sind. Dabei handelt es sich um den Gallensäure- und Cholesterin Metabolismus und zum anderen um den Sphingosin Metabolismus, welche in keimfreien Mäusen hochreguliert sind.

Die erhaltenen Erkenntnisse aus der RNA-Sequenzierung wurden über die quantitative PCR weiter untersucht und validiert. Hierbei wurden erneut aus C57BL/6J Mäusen die Leber entnommen, Endothelzellen über CD146⁺ MACS isoliert, RNA aus den gewonnenen Leberendothelzellen isoliert, um anschließend über cDNA die einzelnen Transkripte aus der RNA-Sequenzierung in der mRNA Expression mittels quantitativer PCR zu untersuchen. In dieser Untersuchung zeigt sich ebenfalls eine Hochregulation der einzelnen Transkripte für den Gallensäure- und Cholesterin Metabolismus sowie für den Sphingosin Metabolismus in den Leberendothelzellen von keimfreien Mäusen. Weitere Untersuchungen wie der Einfluss verschiedener,

7 Fazit

definierter Bakterienspezies auf den Gallensäuren und Cholesterin Metabolismus und den Sphingosin Metabolismus zeigten in Leberendothelzellen keinen signifikanten Unterschied zwischen keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen.

Die durchgeführten Untersuchungen und Analysen zeigen deutlich, dass die Mikrobiota einen essenziellen Einfluss auf das hepatische Leberendothel besitzt. Weitere Faktoren wie der Einfluss bestimmter Diäten (fettreiche-Diät) oder der Einfluss des natürlichen Alterungsprozesses stehen in Zusammenhang mit der Mikrobiota und könnten somit auf veränderte Stoffwechselwege in den Leberendothelzellen untersucht werden.

8 Annex

8.1 Veröffentlichte Publikationen

„The gut microbiota instructs the hepatic endothelial cell transcriptome“; **Henning Formes**, Joana P. Bernardes, Amrit Mann, Franziska Bayer, Giulia Pontarollo, Klytaimnistra Kiouptsi, Katrin Schäfer, Sebastian Attig, Teodora Nikolova, Thomas G. Hofmann, Jörn M. Schattenberg, Hristo Todorov, Susanne Gerber, Philip Rosenstiel, Tobias Bopp, Felix Sommer and Christoph Reinhardt; iScience; October 2021

“ α -Linolenic Acid-Rich Diet Influences Microbiota Composition and Villus Morphology of the Mouse Small Intestine”; Hristo Todorov, Bettina Kollar, Franziska Bayer, Ines Brandao, Amrit Mann, Julia Mohr, Giulia Pontarollo, **Henning Formes**, Roland Stauber, Jens M Kittner, Kristina Endres, Bernhard Watzler, Wolfgang Andreas Nockher, Felix Sommer, Susanner Gerber, Christoph Reinhardt; Nutrients; March 2020

“The Microbiota Promotes Arterial Thrombosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice”; Klytaimnistra Kiouptsi, Sver Jäckel, Giulia Pontarollo, Alexandra Grill, Marijke J E Kuijpers, Eivor Wilms, Christian Weber, Felix Sommer, Magdolna Nagy, Carlos Neideck, Yvonne Jansen, Stefanie Ascher, **Henning Formes**, Cornelia Karwot, Franziska Bayer, Bettina Kollar, Saravanan Subramaniam, Michael Molitor, Philip Wenzel, Philip Rosenstiel, Hristo Todorov, Susanner Gerber, Ulrich Walter, Kerstin Jurk, Johan W M Heemskerk, Emiel P C van der Vorst, Yvonne Döring, Christoph Reinhardt; mBio; October 2019

“The gut microbiota – a modulator of endothelial cell function and a contributing environmental factor to arterial thrombosis”; **Henning Formes** and Christoph Reinhardt; Expert Rev Hematology; July 2019

“Mice Deficient in the Anti-Haemophilic Coagulation Factor VIII Show Increased Von Willebrand Factor Plasma Levels”; Klytaimnistra Kiouptsi, Alexandra Grill, Amrit Mann, Mareike Döhrmann, Maren Lillich, Sven Jäckel, Frano Malinarich, **Henning Formes**, Davit Manukyan, Saravanan Subramaniam, Avinash Khandagale, Cornelia Karwot, Serge C Thal, Markus Bosmann, Inge Scharrer, Kerstin Jurk, Christoph Reinhardt; PLoS One; August 2017

8.2 Lebenslauf

Zur Person

Name
 Anschrift
 Telefon
 E-Mail
 Geburtsdatum/-ort

Henning Formes
 Am Hasensprung 129
 60437 Frankfurt am Main
 Festnetz 069 90754206
 Mobil +49 160 94460026
 hformes@gmx.de
 16.09.1988 in Wiesbaden



Ausbildung

- 04/2015 – 03/2017 **Master of Science in Technischer Biologie** an der Technischen Universität in Darmstadt (Abschlussnote: 1,47)
 Schwerpunkte:
- Neurobiologie
 - Zellbiophysik
 - Struktur und Funktionsanalyse von Membranproteinen
 - Cytokine und rekombinante Antikörper als Biopharmazeutika
- Master Thesis: Herabregulierung von BLIMP1 in Multiplen Myeloma
- 10/2010 – 03/2015 **Bachelor of Science in Biologie** an der Technischen Universität in Darmstadt (Abschlussnote: 2,82)
 Schwerpunkte:
- Tierphysiologie
 - Molekularbiologie der Pflanzen
 - Molekulare Zellbiologie
 - Strahlenbiologie
- Bachelor Thesis: Modulation des rTRPV1-Rezeptors
- 2005 – 2008 **Abitur an der Martin-Niemöller-Schule (Oberstufengymnasium)** in Wiesbaden (Abschlussnote: 3,2)
- 2000 – 2005 **Oranienschule (Gymnasium)** in Wiesbaden
- 1996 – 2000 **Adolf-Reichwein-Schule (Grundschule)** in Wiesbaden-Rambach

Berufserfahrung

11/2021 – heute	Sales Area Manager bei Miltenyi Biotec GmbH
07/2021 – 10/2021	Biologe bei der CoviMedical GmbH in Kelsterbach im Bereich der SARS-CoV-2 PCR Testung
06/2017 – 05/2021	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Thrombose und Hämostase (CTH) der Universitätsmedizin Mainz (Promotion)
09/2011 – 09/2016	Werkstudent bei der Fraport AG in Frankfurt am Main im Bereich der Gepäckabfertigung
08/2009 – 09/2010	Ausbildung zum Tiermedizinische Fachangestellten in der Kleintierklinik in Walluf (abgebrochen)
08/2008 – 09/2008	Praktikum in der Kleintierklinik in Walluf
09/2008 – 06/2009	Zivildienst in der Kindertagesstätte Känguru in Wiesbaden

Kenntnisse & Fähigkeiten

Sprachen	Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend in Wort und Schrift) Latein (Latinum)
EDV	MS Office, SAP, Graphpad, FlowJo

9 Literatur

1. Backhed F LR, Sonnenburg JL, Peterson DA et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-1920.
2. Eckburg PB BE, Bernstein CN, Purdom E et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-1638.
3. Browne HP NB, Forster SC, Lawley TD. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(9):531-543.
4. Martens EC CH, Gordon JI. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe*. 2008;4(5):447-457.
5. al. BJe. *Duale Reihe Physiologie*: Stuttgart: Thieme; 2012.
6. Schünke M SE, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*: Stuttgart: Thieme; 2009.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *LernAtlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 2007.
8. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164(3):337-40.
9. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(10):3854-9.
10. Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol*. 2002;39(1):33-9.
11. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
12. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
13. Forster SC, Kumar N, Anonye BO, Almeida A, Viciani E, Stares MD, et al. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. *Nat Biotechnol*. 2019;37(2):186-92.
14. Clarke G, Sandhu KV, Griffin BT, Dinan TG, Cryan JF, Hyland NP. Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic-Microbiome Interactions. *Pharmacol Rev*. 2019;71(2):198-224.
15. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):341-52.
16. Yi P, Li L. The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Vet Microbiol*. 2012;157(1-2):1-7.
17. Bibbo S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrri F, Masucci L, Gasbarrini A, et al. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(22):4742-9.

9 Literatur

18. Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease. *J Med Invest.* 2016;63(1-2):27-37.
19. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol.* 2013;14(7):676-84.
20. Allin KH TV, Caesar R, Jensen BAH et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia.* 2018;61:810-820.
21. Bisgaard H LN, Bonnelykke K, Chawes BL et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):646-652.
22. Benakis C BD, Caballero S, Faraco G et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal gammadelta T cells. *Nat Med.* 2016;22(5):516-523.
23. Schulz MD AC, Heringer J, Romrig FK et al. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature.* 2014;514(7523):508-512.
24. Turnbaugh PJ LR, Mahowald MA, Magrini V et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-1031.
25. Karlsson FH FF, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012;3:1245.
26. Koeth RA WZ, Levison BS, Buffa JA et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(5):576-585.
27. Lau K, Srivatsav V, Rizwan A, Nashed A, Liu R, Shen R, et al. Bridging the Gap between Gut Microbial Dysbiosis and Cardiovascular Diseases. *Nutrients.* 2017;9(8).
28. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(11):790-801.
29. Sasaki D SK, Ikuta N, Yasuda T et al. Low amounts of dietary fibre increase in vitro production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure. *Sci Rep.* 2018;8(1):435.
30. Bui TP RJ, Boeren S, de Waard P et al. Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructoselysine by a human gut commensal. *Nat Commun.* 2015;6:10062.
31. W S. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1994;35(1 Suppl):S35-38.
32. Arpaia N CC, Fan X, Dikiy S et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451-455.
33. Sun M WW, Chen L, Yang W et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nat Commun.* 2018;9(1):3555.
34. Natarajan N HD, Flavahan S, Stepan J et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. *Physiol Genomics.* 2016;48(11):826-834.
35. Pluznick JL PR, Gevorgyan H, Peterlin Z et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(11):4410-4415.

36. Balmer ML SE, de Gottardi A, Lawson MAE et al. . The Liver May Act as a Firewall Mediating Mutualism Between the Host and Its Gut Commensal Microbiota. *Science Translational Medicine*. 2014;6(237):1-8.
37. Clarke TB DK, Lysenko ES, Zhou AY et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. 2010;16(2):228-231.
38. Huang Z WJ, Xu X, Wang H et al. Antibody neutralization of microbiota-derived circulating peptidoglycan dampens inflammation and ameliorates autoimmunity. *Nature Microbiology*. 2019.
39. Tang AT CJ, Kotzin JJ, Yang Y et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. *Nature*. 2017;545(7654):305-310.
40. Spadoni I ZE, Bertocchi A, Paolinelli R et al. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science*. 2015;350(6262):830-834.
41. Bäckhed F NS, Schweda EKH, Oscarson Stefan et al. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes and Infection*. 2003;5(12):1057-1063.
42. Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2009;32(1):4-16.
43. Löffler/Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag. 2014.
44. Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:29-39.
45. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3516-21.
46. Kawai T AS. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384.
47. Takeda K, Akira S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn J Infect Dis*. 2001;54(6):209-19.
48. Osamu Takeuchi SA. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology*. 2001.
49. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol*. 2005;77(6):886-92.
50. Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun*. 2015;21(8):827-46.
51. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Chou ML, Seghatchian J, Burnouf T, et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus Apher Sci*. 2015;53(2):159-67.
52. Cognasse F, Nguyen KA, Damien P, McNicol A, Pozzetto B, Hamzeh-Cognasse H, et al. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors. *Front Immunol*. 2015;6:83.
53. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:367.

9 Literatur

54. Bayer F, Dremova O, Khuu MP, Mammadova K, Pontarollo G, Kiouptsi K, et al. The Interplay between Nutrition, Innate Immunity, and the Commensal Microbiota in Adaptive Intestinal Morphogenesis. *Nutrients*. 2021;13(7).
55. Marin JJ, Macias RI, Briz O, Banales JM, Monte MJ. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab*. 2015;17(1):4-29.
56. Michael P. Manns SS. *Praxis der Hepatologie*. Springer Vorlag. 2016.
57. Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*. 2009;31(3):333-43.
58. Wake K, Decker K, Kirn A, Knook DL, McCuskey RS, Bouwens L, et al. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol*. 1989;118:173-229.
59. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol*. 2002;1(1):1.
60. Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der Smissen P, McCuskey RS. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology*. 1985;5(4):683-92.
61. McCuskey RS. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291(6):661-71.
62. Potente M, Mäkinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017;18(8):477-94.
63. DeLeve LD, Maretta-Mira AC. Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Semin Liver Dis*. 2017;37(4):377-87.
64. Géraud C, Evdokimov K, Straub BK, Peitsch WK, Demory A, Dörflinger Y, et al. Unique Cell Type-Specific Junctional Complexes in Vascular Endothelium of Human and Rat Liver Sinusoids. *PLOS ONE*. 2012;7(4):e34206.
65. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science*. 1998;279(5349):381.
66. Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *Journal of Cell Biology*. 1996;134(1):255-66.
67. Martin-Armas M, Simon-Santamaria J, Pettersen I, Moens U, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *J Hepatol*. 2006;44(5):939-46.
68. Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M, et al. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol*. 2005;77(5):626-33.
69. Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, et al. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*. 2010;129(3):363-74.
70. Trexler PC. The gnotobiotite-review and future. *Biomed Purv*. 1961;1:47-58.

71. George HFN, Thierfelder H. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Biological Chemistry*. 1896;21(2-3):109-21.
72. Heinecke Hea. The origins of the gnotobiotic technic. *Z Versuchstierkd*. 1990(0044-3697 (Print)).
73. Trexler PC, Reynolds LI. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Applied microbiology*. 1957;5(6):406-12.
74. Dietrich M. Klinische Gnotobiotik in der Hämatologie. *Blut*. 1974;28(5):317-20.
75. Pesti HAGaL. The Gnotobiotic Animal as a Tool in the Study of Host Microbial Relationships. *American Society for Microbiology*. 1971.
76. Jose´ Inzunza TM, Mona Fartoo, Elisabeth Norin, Ewa O´ sterlund, Anna-Karin Persson and Lars A´ hrlund-Richter. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. *Laboratory Animals*. 2005;39:421–7.
77. Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*. 2014;48(3):178-92.
78. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, et al. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn*. 2006;235(3):759-67.
79. Nordrehaug KVMFJE. Serotonin Is Associated with Coronary Artery Disease and Cardiac Events. *American Heart Association*. 1999.
80. Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. EFFECTS OF THE NORMAL MICROBIAL FLORA ON VARIOUS TISSUE ELEMENTS OF THE SMALL INTESTINE. *Cells Tissues Organs*. 1961;44(3):210-25.
81. Gordon HA, Bruckner-Kardoss E, Staley TE, Wagner M, Wostmann BS. CHARACTERISTICS OF THE GERMFREE RAT. *Cells Tissues Organs*. 1966;64(1-3):367-89.
82. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lunden G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*. 2012;483(7391):627-31.
83. Stappenbeck TS HL, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS*. 2002;99(24):15451-15455.
84. Carter PB, Pollard M. Host responses to "normal" microbial flora in germ-free mice. *J Reticuloendothel Soc*. 1971;9(6):580-7.
85. Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E, Knight PL, Jr. Cecal enlargement, cardiac output, and O₂ consumption in germfree rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968;128(1):137-41.
86. Levenson SM, Doft F, Lev M, Kan D. Influence of microorganisms on oxygen consumption, carbon dioxide production and colonic temperature of rats. *J Nutr*. 1969;97(4):542-52.
87. Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci*. 1983;33(1):46-50.
88. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57-63.

9 Literatur

89. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? (1743-0593 (Electronic)).
90. Zhang H, He L, Cai L. Transcriptome Sequencing: RNA-Seq. (1940-6029 (Electronic)).
91. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(4):461-72.
92. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(1):55-71.
93. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 2012;336(6086):1262-7.
94. Ramirez-Perez O, Cruz-Ramon V, Chinchilla-Lopez P, Mendez-Sanchez N. The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism. *Ann Hepatol.* 2017;16(Suppl. 1: s3-105.):s15-s20.
95. Faraj TA, Stover C, Erridge C. Dietary Toll-Like Receptor Stimulants Promote Hepatic Inflammation and Impair Reverse Cholesterol Transport in Mice via Macrophage-Dependent Interleukin-1 Production. *Front Immunol.* 2019;10:1404.
96. Busch CJ, Hendriks T, Weismann D, Jäckel S, Walenbergh SM, Rendeiro AF, et al. Malondialdehyde epitopes are sterile mediators of hepatic inflammation in hypercholesterolemic mice. (1527-3350 (Electronic)).
97. Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Loomba R, Schnabl B, et al. The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2018;15(7):397-411.
98. W.Pfaff M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Oxford University Press. 2001.
99. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
100. Abel T, El Filali E, Waern J, Schneider IC, Yuan Q, Munch RC, et al. Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells. *Blood.* 2013;122(12):2030-8.
101. Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. *The American journal of pathology.* 1993;142(2):481-8.
102. Filali EE, Hiralall JK, van Veen HA, Stolz DB, Seppen J. Human liver endothelial cells, but not macrovascular or microvascular endothelial cells, engraft in the mouse liver. *Cell Transplant.* 2013;22(10):1801-11.
103. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics.* 1998;14(8):656-64.
104. Wostmann BS, Wiech NL. Total serum and liver cholesterol in germfree and conventional male rats. *Am J Physiol.* 1961;201:1027-9.
105. Pontarollo G, Kiouptsi K, Reinhardt C. A holobiont view on thrombosis: unravelling the microbiota's influence on arterial thrombus growth. *Microb Cell.* 2020;7(1):28-31.

106. Kusters A, Abebe DF, Felix JC, Dawson PA, Karpen SJ. Inflammation-associated upregulation of the sulfated steroid transporter Slc10a6 in mouse liver and macrophage cell lines. *Hepato Res.* 2016;46(8):794-803.
107. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch.* 2014;466(1):77-89.
108. Jager J, Greiner V, Strzoda D, Seibert O, Niopek K, Sijmonsma TP, et al. Hepatic transforming growth factor-beta 1 stimulated clone-22 D1 controls systemic cholesterol metabolism. *Mol Metab.* 2014;3(2):155-66.
109. Kiouptsi K, Jackel S, Pontarollo G, Grill A, Kuijpers MJE, Wilms E, et al. The Microbiota Promotes Arterial Thrombosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *MBio.* 2019;10(5).
110. Zhao T, Ding X, Du H, Yan C. Myeloid-derived suppressor cells are involved in lysosomal acid lipase deficiency-induced endothelial cell dysfunctions. *J Immunol.* 2014;193(4):1942-53.
111. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J.* 2000;348 Pt 1:71-6.
112. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:69-94.
113. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2001;276(14):10627-33.
114. McVerry BJ, Garcia JG. Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem.* 2004;92(6):1075-85.
115. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood.* 2005;105(8):3178-84.
116. Rafiq NBM, Nishimura Y, Plotnikov SV, Thiagarajan V, Zhang Z, Shi S, et al. A mechano-signalling network linking microtubules, myosin IIA filaments and integrin-based adhesions. *Nat Mater.* 2019;18(6):638-49.
117. Paradzik M, Humphries JD, Stojanovic N, Nestic D, Majhen D, Dekanic A, et al. KANK2 Links alphaVbeta5 Focal Adhesions to Microtubules and Regulates Sensitivity to Microtubule Poisons and Cell Migration. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:125.
118. Hou S, Li Z, Zheng X, Gao Y, Dong J, Ni Y, et al. Embryonic endothelial evolution towards first hematopoietic stem cells revealed by single-cell transcriptomic and functional analyses. *Cell Res.* 2020;30(5):376-92.
119. Teichmann M, Kretschy N, Kopf S, Jarukamjorn K, Atanasov AG, Viola K, et al. Inhibition of tumour spheroid-induced prometastatic intravasation gates in the lymph endothelial cell barrier by carbamazepine: drug testing in a 3D model. *Arch Toxicol.* 2014;88(3):691-9.
120. Lundqvist A, Sandstedt M, Sandstedt J, Wickelgren R, Hansson GI, Jeppsson A, et al. The Arachidonate 15-Lipoxygenase Enzyme Product 15-HETE Is Present in Heart Tissue from Patients with Ischemic Heart Disease and Enhances Clot Formation. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161629.

9 Literatur

121. Holzner S, Brenner S, Atanasov AG, Senfter D, Stadler S, Nguyen CH, et al. Intravasation of SW620 colon cancer cell spheroids through the blood endothelial barrier is inhibited by clinical drugs and flavonoids in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;111:114-24.
122. Hampton JA, Klaunig JE, Goldblatt PJ. Resident sinusoidal macrophages in the liver of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): an ultrastructural, functional and cytochemical study. *Anat Rec*. 1987;219(4):338-46.
123. Krenacs T, Rosendaal M. Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(11):1125-37.
124. Tan KS, Kulkeaw K, Nakanishi Y, Sugiyama D. Expression of cytokine and extracellular matrix mRNAs in fetal hepatic stellate cells. *Genes Cells*. 2017;22(9):836-44.
125. Sakamuri S, Watts R, Takawale A, Wang X, Hernandez-Anzaldo S, Bahitham W, et al. Absence of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 (TIMP4) ameliorates high fat diet-induced obesity in mice due to defective lipid absorption. *Sci Rep*. 2017;7(1):6210.
126. Zhao H, Han Z, Liu X, Gu J, Tang F, Wei G, et al. The chromatin remodeler Chd4 maintains embryonic stem cell identity by controlling pluripotency- and differentiation-associated genes. *J Biol Chem*. 2017;292(20):8507-19.
127. Mendonca MC, Koles N, Doi SQ, Sellitti DF. Transforming growth factor-beta1 regulation of C-type natriuretic peptide expression in human vascular smooth muscle cells: dependence on TSC22D1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(6):H2018-27.
128. Tippens AS, Gruetter CA. Detection of histidine decarboxylase mRNA in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Inflamm Res*. 2004;53(6):215-6.
129. Meng F, Onori P, Hargrove L, Han Y, Kennedy L, Graf A, et al. Regulation of the histamine/VEGF axis by miR-125b during cholestatic liver injury in mice. *Am J Pathol*. 2014;184(3):662-73.
130. Asashima T, Hori S, Ohtsuki S, Tachikawa M, Watanabe M, Mukai C, et al. ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells. *Pharm Res*. 2006;23(6):1235-42.
131. Lindner S, Halwachs S, Wassermann L, Honscha W. Expression and subcellular localization of efflux transporter ABCG2/BCRP in important tissue barriers of lactating dairy cows, sheep and goats. *J Vet Pharmacol Ther*. 2013;36(6):562-70.
132. Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, et al. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10477-86.
133. Sand FW, Hornblad A, Johansson JK, Loren C, Edsbacke J, Stahlberg A, et al. Growth-limiting role of endothelial cells in endoderm development. *Dev Biol*. 2011;352(2):267-77.
134. Ito T, Kuriyama N, Kato H, Matsuda A, Mizuno S, Usui M, et al. Sinusoidal protection by sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist in liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2018;222:139-52.
135. Yang S, Yang C, Yu F, Ding W, Hu Y, Cheng F, et al. Endoplasmic reticulum resident oxidase ERO1-L α promotes hepatocellular carcinoma metastasis and angiogenesis through the S1PR1/STAT3/VEGF-A pathway. *Cell Death Dis*. 2018;9(11):1105.

136. Tani M, Okino N, Mitsutake S, Tanigawa T, Izu H, Ito M. Purification and characterization of a neutral ceramidase from mouse liver. A single protein catalyzes the reversible reaction in which ceramide is both hydrolyzed and synthesized. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3462-8.
137. Li Y, Dong J, Ding T, Kuo MS, Cao G, Jiang XC, et al. Sphingomyelin synthase 2 activity and liver steatosis: an effect of ceramide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 suppression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1513-20.
138. Li Z, Fan Y, Liu J, Li Y, Huan C, Bui HH, et al. Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7):1577-84.
139. Eto N, Miyagishi M, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1553-63.
140. Midorikawa Y, Tsutsumi S, Taniguchi H, Ishii M, Kobune Y, Kodama T, et al. Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93(6):636-43.
141. Favre CJ, Mancuso M, Maas K, McLean JW, Baluk P, McDonald DM. Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(5):H1917-38.
142. Chen W, Zheng D, Mou T, Pu J, Dai J, Huang Z, et al. Tle1 attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing NOD2/NF-kappaB signaling. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84(6):1176-82.
143. Joko T, Nanba D, Shiba F, Miyata K, Shiraishi A, Ohashi Y, et al. Effects of promyelocytic leukemia zinc finger protein on the proliferation of cultured human corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 2007;13:649-58.
144. Rho SB, Choi K, Park K, Lee JH. Inhibition of angiogenesis by the BTB domain of promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Cancer Lett.* 2010;294(1):49-56.
145. Farber MJ, Rizaldy R, Hildebrand JD. Shroom2 regulates contractility to control endothelial morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 2011;22(6):795-805.
146. Eelen G, Dubois C, Cantelmo AR, Goveia J, Bruning U, DeRan M, et al. Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis. *Nature.* 2018;561(7721):63-9.
147. Guichet PO, Guelfi S, Teigell M, Hoppe L, Bakalara N, Bauchet L, et al. Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. *Stem Cells.* 2015;33(1):21-34.
148. Lu XJ, Shi Y, Chen JL, Ma S. Kruppel-like factors in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(2):533-41.
149. Lenzi C, Stevens J, Osborn D, Hannah MJ, Bierings R, Carter T. Synaptotagmin 5 regulates Ca(2+)-dependent Weibel-Palade body exocytosis in human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2019;132(5).
150. Norden PR, Sun Z, Davis GE. Control of endothelial tubulogenesis by Rab and Ral GTPases, and apical targeting of caveolin-1-labeled vacuoles. *PLoS One.* 2020;15(6):e0235116.
151. Han S, Ray JW, Pathak P, Sweet DR, Zhang R, Gao H, et al. KLF15 regulates endobiotic and xenobiotic metabolism. *Nat Metab.* 2019;1(4):422-30.

9 Literatur

152. Jung DY, Chalasani U, Pan N, Friedline RH, Prosdocimo DA, Nam M, et al. KLF15 is a molecular link between endoplasmic reticulum stress and insulin resistance. *PLoS One*. 2013;8(10):e77851.
153. Zhou J, Tan T, Tian Y, Zheng B, Ou JH, Huang EJ, et al. Kruppel-like factor 15 activates hepatitis B virus gene expression and replication. *Hepatology*. 2011;54(1):109-21.
154. Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, et al. Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metab*. 2007;5(4):305-12.
155. Sato F, Otsuka T, Kohsaka A, Le HT, Bhawal UK, Muragaki Y. Smad3 Suppresses Epithelial Cell Migration and Proliferation via the Clock Gene Dec1, Which Negatively Regulates the Expression of Clock Genes Dec2 and Per1. *Am J Pathol*. 2019;189(4):773-83.
156. Ma Q, Yu M, Zhou B, Zhou H. QSOX1 promotes mitochondrial apoptosis of hepatocellular carcinoma cells during anchorage-independent growth by inhibiting lipid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;532(2):258-64.
157. Nwosu ZC, Battello N, Rothley M, Pioronska W, Sitek B, Ebert MP, et al. Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):211.
158. Rinaldo JE, Clark M, Parinello J, Shepherd VL. Nitric oxide inactivates xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in interferon-gamma-stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11(5):625-30.
159. Schroder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(9):1353-60.
160. Yeung BH, Shek FH, Lee NP, Wong CK. Stanniocalcin-1 Reduces Tumor Size in Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139977.
161. Palma PFS, Bock C, Silva TS, Guerreiro PM, Power DM, Portner HO, et al. STC1 and PTHrP Modify Carbohydrate and Lipid Metabolism in Liver of a Teleost Fish. *Sci Rep*. 2019;9(1):723.
162. Wang S, Amato KR, Song W, Youngblood V, Lee K, Boothby M, et al. Regulation of endothelial cell proliferation and vascular assembly through distinct mTORC2 signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2015;35(7):1299-313.
163. Toffoli S, Delaive E, Dieu M, Feron O, Raes M, Michiels C. NDRG1 and CRK-I/II are regulators of endothelial cell migration under Intermittent Hypoxia. *Angiogenesis*. 2009;12(4):339-54.
164. Li W, Ji M, Lin Y, Miao Y, Chen S, Li H. DEPP/DEPP1/C10ORF10 regulates hepatic glucose and fat metabolism partly via ROS-induced FGF21. *FASEB J*. 2018;32(10):5459-69.
165. Stepp MW, Folz RJ, Yu J, Zelko IN. The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(6):1076-88.
166. Hahn RT, Hoppstadter J, Hirschfelder K, Hachenthal N, Diesel B, Kessler SM, et al. Downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes vascular inflammation. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):391-400.
167. Brinks J, van Dijk EHC, Habeeb M, Nikolaou A, Tsonaka R, Peters HAB, et al. The Effect of Corticosteroids on Human Choroidal Endothelial Cells: A Model to Study Central Serous Chorioretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(13):5682-92.

168. Waterfield M, Khan IS, Cortez JT, Fan U, Metzger T, Greer A, et al. The transcriptional regulator Aire coopts the repressive ATF7ip-MBD1 complex for the induction of immunotolerance. *Nat Immunol*. 2014;15(3):258-65.
169. Supek F, Bošnjak M Fau - Škunca N, Škunca N Fau - Šmuc T, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. (1932-6203 (Electronic)).
170. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15451-5.
171. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*. 2003;299(5615):2074-6.
172. Ascher S RC. The gut microbiota: An emerging risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. *Eur J Immunol*. 2017;00:1-12.
173. Formes H, Reinhardt C. The gut microbiota - a modulator of endothelial cell function and a contributing environmental factor to arterial thrombosis. *Expert Rev Hematol*. 2019:1-9.
174. Fontaine CA, Skorupski AM, Vowles CJ, Anderson NE, Poe SA, Eaton KA. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut microbes*. 2015;6(4):225-33.
175. Bayer F, Ascher S, Pontarollo G, Reinhardt C. Antibiotic Treatment Protocols and Germ-Free Mouse Models in Vascular Research. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2174-.
176. Khare A, Gaur S. Cholesterol-Lowering Effects of Lactobacillus Species. *Current Microbiology*. 2020;77(4):638-44.
177. Kriaa A, Bourgin M, Potiron A, Mkaouar H, Jablaoui A, Gérard P, et al. Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *Journal of Lipid Research*. 2019;60(2):323-32.
178. Rao A, Kosters A, Mells JE, Zhang W, Setchell KD, Amanso AM, et al. Inhibition of ileal bile acid uptake protects against nonalcoholic fatty liver disease in high-fat diet-fed mice. *Sci Transl Med*. 2016;8(357):357ra122.
179. Zhao T, Ding X, Yan C, Du H. Endothelial Rab7 GTPase mediates tumor growth and metastasis in lysosomal acid lipase-deficient mice. *J Biol Chem*. 2017;292(47):19198-208.
180. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development (Cambridge, England)*. 2014;141(1):5-9.
181. Blaho VA, Hla T. Regulation of Mammalian Physiology, Development, and Disease by the Sphingosine 1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Receptors. *Chemical Reviews*. 2011;111(10):6299-320.
182. Krebs Christian F, Paust H-J, Krohn S, Koyro T, Brix Silke R, Riedel J-H, et al. Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney. *Immunity*. 2016;45(5):1078-92.
183. Gaengel K, Niaudet C Fau - Hagikura K, Hagikura K Fau - Laviña B, Laviña B Fau - Muhl L, Muhl L Fau - Hofmann JJ, Hofmann Jj Fau - Ebarasi L, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. (1878-1551 (Electronic)).

9 Literatur

184. Mizugishi K, Yamashita T Fau - Olivera A, Olivera A Fau - Miller GF, Miller Gf Fau - Spiegel S, Spiegel S Fau - Proia RL, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. (0270-7306 (Print)).
185. Wilkerson BA, Argraves KM. The role of sphingosine-1-phosphate in endothelial barrier function. (0006-3002 (Print)).
186. Johnson EL, Heaver SL, Waters JL, Kim BI, Bretin A, Goodman AL, et al. Sphingolipids produced by gut bacteria enter host metabolic pathways impacting ceramide levels. *Nat Commun.* 2020;11(1):2471.
187. Di Rienzi SC, Johnson EL, Waters JL, Kennedy EA, Jacobson J, Lawrence P, et al. The microbiome affects liver sphingolipids and plasma fatty acids in a murine model of the Western diet based on soybean oil. (1873-4847 (Electronic)).
188. Wieland Brown LC, Penaranda C, Kashyap PC, Williams BB, Clardy J, Kronenberg M, et al. Production of alpha-galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. *PLoS Biol.* 2013;11(7):e1001610.
189. Mahajan-Thakur S, Böhm A, Jedlitschky G, Schrör K, Rauch BH. Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation. *Mediators of Inflammation.* 2015;2015:1-11.
190. Mouzaki M, Loomba R. An update on the role of the microbiome in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis, diagnosis, and treatment. (1092-8472 (Print)).
191. Armandi AA-O, Schattenberg JA-O. Beyond the Paradigm of Weight Loss in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Pathophysiology to Novel Dietary Approaches. *LID - 10.3390/nu13061977 [doi] LID - 1977.* (2072-6643 (Electronic)).
192. Huber YA-O, Pfirrmann D, Gebhardt I, Labenz CA-O, Gehrke N, Straub BK, et al. Improvement of non-invasive markers of NAFLD from an individualised, web-based exercise program. (1365-2036 (Electronic)).
193. Le Couteur DG, Fraser R, Cogger VC, McLean AJ. Hepatic pseudocapillarisation and atherosclerosis in ageing. *Lancet.* 2002;359(9317):1612-5.
194. Loomba RA-O, Ling L, Dinh DM, DePaoli AM, Lieu HD, Harrison SA, et al. The Commensal Microbe *Veillonella* as a Marker for Response to an FGF19 Analog in NASH. (1527-3350 (Electronic)).
195. Knolle PA, Wohlleber D. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. (2042-0226 (Electronic)).