

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Jonathan Jantsch

Charakterisierung der Rolle der NADPH-Oxidase Duox2 bei der Darm-Homöostase und der Immunabwehr von intestinalen Pathogenen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Paula Pia Rosa Schumacher
aus Moers

promoviert am 22.November 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Gereon R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. L. Schiffmann

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Herr Michael Schramm

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Michael Schramm von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den (18.03.2024)

Unterschrift:

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Martin Krönke, für die Möglichkeit bedanken, bei ihm am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene zu promovieren. Er hat mich durch seine konstruktiven Vorschläge durch die Finalisierung dieser Arbeit geführt und war damit maßgeblich an ihrer Fertigstellung beteiligt.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe. Dr. Marc Herb, Daniela Grumme, Dr. Alexander Gluschko und Dr. Alina Farid haben mir während meiner Zeit im Labor die Tage versüßt und mich mit ihrer willkommenheißen, offenen Art zu jeder Zeit sehr wohl fühlen lassen.

Auch meiner guten Freundin Felicitas Jaschke möchte ich von Herzen für ihre Hilfe und Unterstützung danken.

Ich danke meinen Eltern und meinen Schwestern, ohne euch wäre ich nicht diejenige, die ich jetzt bin!

Aus tiefstem Herzen bedanke ich mich bei meinem Partner Niklas Rösel, der mir in allen Lebenslagen so hingebungsvoll zur Seite steht. Ohne ihn und seine Hilfe, sowohl im Alltag als auch im Entstehungsprozess dieser Arbeit, wäre all dies nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt gilt ein ganz besonderer Dank meinem Betreuer Dr. Michael Schramm, der mich während meiner praktischen Arbeit im Labor, sowie im nachfolgenden Schreibprozess hervorragend unterstützt hat. Er stand mir jederzeit für Fragen und praktische Hilfe zur Verfügung und ich möchte ihm für all seine Mühen, für die Motivation, die Förderung und die vielen Stunden, die er in diese Doktorarbeit investiert hat, von Herzen danken.

Ich kann kaum in Worte fassen wie schön und beglückend es ist an die Menschen zu denken die mich in meinem Leben begleiten.

Ich danke allen aus tiefstem Herzen!

Ich widme diese Arbeit meiner Schwester, deren bedingungsloser Liebe ich mir immer sicher
sein kann.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
2 EINLEITUNG	11
2.1 Immunsystem Darm	11
2.1.1 Anatomie	11
2.1.2 Physische Barrieren	12
2.1.3 Chemische Barrieren	13
2.1.4 Das Mikrobiom als Barriere	14
2.1.5 Pathogene	16
2.2 NADPH Oxidasen	17
2.2.1 Duox2	18
2.2.2 ROS	19
2.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	21
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Material	22
3.1.1 Primer	22
3.1.2 Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien	23
3.1.3 Ausrüstung und Geräte	24
3.1.4 Software	24
3.1.5 Mäuse	25
3.1.6 Bakterien	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Probengewinnung	26
3.2.2 Histologie	27
3.2.3 Evaluierung der Histomorphologie	28
3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
3.2.5 Infektion	29
3.2.6 Monitoring des Krankheitsverlaufs	30
4 ERGEBNISSE	32

4.1	Charakterisierung der genetisch determinierten, darmspezifischen Duox2-Defizienz	33
4.1.1	Der Duox2 ^{IEC-KO} verursacht eine <i>Duox2</i> -Defizienz im intestinalen Epithel	33
4.1.2	Duox2 ^{IEC-KO} bewirkt keine kompensatorische Hochregulation anderer Nox-Isoformen im Darm	34
4.1.3	Duox2 ^{IEC-KO} hat keinen Einfluss auf den strukturellen Aufbau des Darmgewebes	36
4.1.4	Die Auswirkung des Duox2 ^{IEC-KO} auf ausgewählte Entzündungsparameter	41
4.1.5	Duox2 ^{IEC-KO} hat einen Einfluss auf den Mucus im Darmtrakt	45
4.1.6	Die Zusammensetzung der Mikrobiota ändert sich durch die Duox2-Defizienz	47
4.2	Die Rolle von Duox2 im Rahmen einer bakteriellen Infektion mit <i>C. rodentium</i>	51
4.2.1	Das Fehlen von Duox2 zieht keinen schwereren Verlauf der Infektion nach sich	51
4.2.2	Duox2-Defizienz führt nicht zu einer verstärkten Gewebsreaktion nach Infektion mit <i>C. rodentium</i>	53
4.2.3	Die Duox2-Defizienz führt nicht zu einer schwächeren Bakterienabwehr	55
4.2.4	Die Infektion mit <i>C. rodentium</i> führt zu einer Angleichung der Mucus-Zusammensetzung im Darm der Duox2 ^{IEC-KO} -Mäuse	58
5	DISKUSSION	61
5.1	Vor Infektion mit <i>C. rodentium</i>	61
5.2	Nach Infektion mit <i>C. rodentium</i>	64
5.3	Ausblick	66
6	LITERATURVERZEICHNIS	68
7	ANHANG	74
7.1	Abbildungsverzeichnis	74
7.2	Tabellenverzeichnis	75

Abkürzungsverzeichnis

A/E-Läsionen	<i>attaching and effacing</i> Läsionen
Ak	Antikörper
<i>C. rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
CLCA1	<i>Chloride channel activator 1</i>
CU	Colitis ulcerosa
d	Tag
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
Duox1	<i>Dual oxidase 1</i>
Duox2	<i>Dual oxidase 2</i>
DuoxA1	Duox Aktivator 1
DuoxA1 α	Duox Aktivator 1 α
DuoxA2	Duox Aktivator 2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNos	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Schwefelwasserstoff
hCLCA1	<i>human Chloride channel activator 1</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IEC	<i>intestinal epithelial cell</i>
iNos	<i>inducable nitric oxide synthase</i>
KO	<i>Knock-out</i>
mCLCA1	<i>murine Chloride channel activator 1</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mLN	mesenteriale Lymphknoten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Muc2	Mucin 2
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEC	nekrotisierenden Enterocolitis
nNos	<i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NO	Stickstoff
Nox1	NADPH-Oxidase 1
Nox2	NADPH-Oxidase 2
Nox3	NADPH-Oxidase 3
Nox4	NADPH-Oxidase 4
Nox5	NADPH-Oxidase 5
O ₂	Wasser
OH	Wasserstoff
PAS	Periodic-Acid-Schiff's
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PBS-T	<i>Phosphate buffered saline 0,4% Triton x100</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHD	Peroxidase Homologie Domäne
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
rDNA	<i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>
Reg3 α	<i>regenerating islet-derived protein 3 α</i>
Reg3 γ	<i>regenerating islet-derived protein 3 γ</i>
RNA	<i>ribonucleic acid/ Ribobukleinsäure</i>
ROS	<i>reactive oxygen species/ Reaktive Sauerstoffspezies</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
sek	Sekunden
ThOX	Thyroid Oxidase
TLR	Toll-like-Rezeptor
TPO	Thyreoperoxidase
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

1 Zusammenfassung

Duox2 ist eine von insgesamt sieben humanen und sechs murinen Isoformen der Noxe, deren Funktion darin besteht Sauerstoff (O_2) zu Reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) zu katalysieren. Das Endprodukt von Duox2, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), kann einerseits oxidativen Schaden verursachen und andererseits als Signalmolekül fungieren. Im Darm wird eine Über- oder Unterexpression von Duox2 mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert.

Welche genau Rolle Duox2 in der Darm-Homöostase und der Immunantwort gegen intestinale Pathogene hat, ist noch nicht bekannt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde in dieser Arbeit anhand von Mäusen mit einer spezifischen Defizienz für Duox2 in intestinalen Epithelzellen ($Duox2^{IEC-KO}$) die Darm-Homöostase sowie die Immunantwort gegen eine bakterielle Darminfektion mit *C. rodentium* untersucht.

Die durch den Intestinalen-Epithelzell-spezifischen-Knockout (IEC-KO) entstandene Duox2-Defizienz wurde dabei nicht durch die Hochregulierung anderer Nox-Isoformen kompensiert. Es ergaben sich keine strukturellen Veränderungen der einzelnen Darmabschnitte in Länge, Gewicht oder Beschaffenheit der Mucosa. Einzig der Darminhalt des Cecums der $Duox2^{IEC-KO}$ -Mäuse war schwerer als der der WT-Mäuse. Bei der Untersuchung der Auswirkung der Duox2-Defizienz auf ausgewählte Entzündungsparameter zeigte sich, dass das Gewicht der mLN in den $Duox2^{IEC-KO}$ -Mäuse geringer war als in den WT-Mäusen. Auch die Expressionen des antimikrobiellen Peptids *Reg3γ* und des mit chronischen Entzündungen assoziierten *iNos* wiesen eine verminderte Expression im Ileum bzw. im Ileum und Colon auf. Bei der Untersuchung des Mucus zeigte sich ein verringerter Anteil der Becherzellen an der Gesamtzellzahl im Colon der $Duox2^{IEC-KO}$ -Mäuse. Zusammen mit der niedrigeren Expression von *CLCA1* in allen drei Darmabschnitten der $Duox2^{IEC-KO}$ -Mäuse, welches an der Schichtung des Mucus mitwirkt, wiesen diese Ergebnisse auf eine veränderte mucosale Struktur in dem Duox2-defizienten Gewebe hin. Von den Mikrobiota, als im Mucus lebenden Organismen, wiesen die *γProteobakterien* ein vermehrtes Vorliegen im Cecum und Colon der $Duox2^{IEC-KO}$ -Mäuse auf.

Nach Infektion der $Duox2^{IEC-KO}$ -Mäuse mit *C. rodentium* ließ sich kein Unterschied bezüglich der Schwere der Infektion feststellen. Darüber hinaus waren die ohne Infektion festgestellten Unterschiede in der Expression von *Reg3γ* und *iNos* nach Infektion mit *C. rodentium* nicht mehr vorhanden. Auch *CLCA1* als Marker für eine mucosale Strukturveränderung wies nach Infektion nicht länger eine niedrigere Expression in den Darmabschnitten der $Duox2^{IEC-KO}$ -

Mäuse auf. Die bei nicht infizierten Duox2^{IEC-KO}-Mäusen festgestellten Veränderungen führten also nicht zu einer veränderten antibakteriellen Immunantwort.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Defizienz von Duox2 im intestinalen Gewebe sich auf mucosale Einflussfaktoren wie *CLCA1* und die Becherzellzahl, auf mit Entzündungen im Zusammenhang stehende Einflussfaktoren wie *iNos* und *Reg3γ* sowie auf die Mikrobiota im Darm auswirkt. Auf den Verlauf der Infektion mit *C. rodentium* hatte die Duox2-Defizienz hingegen keine Auswirkung. Die genaue Rolle von Duox2 innerhalb dieser komplexen Vorgänge und die funktionellen Auswirkungen der Veränderungen müssen weiter untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Immunsystem Darm

2.1.1 Anatomie

Unser Gastrointestinaltrakt lässt sich in unterschiedliche Abschnitte unterteilen, die in ihren Funktionen variieren. Während die oralen Teile hauptsächlich der Nahrungsaufspaltung dienen, findet aboral des Magens im Darm zusätzlich die Resorption von Nahrungsbestandteilen und Wasser statt (Collins et al., 2020). Um die verschiedenen Funktionen zu gewährleisten, setzt sich das intestinale Epithel aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Enterozyten, Becherzellen und Paneth-Zellen gehören zu den Hauptvertretern (Yoo and Mazmanian, 2017) und werden im weiteren Verlauf genauer in ihrer Funktion beschrieben.

Der Darm besteht aus dem Dünndarm und dem Dickdarm. Beide Einheiten haben ihre eigenen Mechanismen zur Oberflächenvergrößerung und spezifische anatomische Merkmale.

Der Dünndarm misst beim Menschen ca. 300 cm in der Länge und weist einen Durchmesser von 2,5 cm und eine Gesamtoberfläche von 30 m² auf (Helander and Fandriks, 2014). Diese Vergrößerung der resorptiven Fläche ist auf die Struktur der Mucosa zurückzuführen. Diese Zotten der Mucosa ragen in das Lumen hinein und schaffen somit eine Vergrößerung der resorptiven Fläche. Gleiches gilt für die Krypten, bei denen es sich um tubulöse Einsenkungen des Epithels handelt und die Ort der Zellerneuerung sind. In der Kryptenbasis sitzen sich rasch teilende multipotente Stammzellen. Deren Tochterzellen wandern von dort aus die Kryptenwand empor und differenzieren sich zu Enterozyten, Becherzellen oder endokrinen Zellen. Zwischen den Stammzellen sitzen in der sogenannten Stammzellnische Paneth-Zellen, die an ihren basophilen Granula erkennbar sind (Lüllmann-Rauch and Asan).

Im Dünndarm wird weiter zwischen Duodenum, Jejunum und Ileum unterschieden. Beim Ileum handelt es sich um den am weitesten aboral liegenden Teil. Charakteristisch für das Ileum sind die unter der Mucosa liegenden Ansammlungen von Lymphfollikeln, die auch Peyer-Plaques genannt werden (Lüllmann-Rauch and Asan).

Der Dickdarm ist mit einer Länge zwischen 110 und 190 cm kürzer als der Dünndarm und hat eine Oberfläche von 1,9 m² (Helander and Fandriks, 2014). Er besteht aus Cecum und

Appendix, der als blinder Zipfel am Cecum hängt, sowie Colon und Rectum (Kahai et al., 2020). Zotten fehlen hier. Cecum, Appendix und Colon haben die ausgeprägten Krypten gemeinsam, die wie im Dünndarm Ort der Zellerneuerung sind. Paneth-Zellen sind hier nur in sehr geringem Maße vorzufinden. Dafür wächst jedoch die Zahl der mucusbildenden Becherzellen (Lüllmann-Rauch and Asan).

2.1.2 Physische Barrieren

2.1.2.1 Mucosa

Der gesamte Verdauungstrakt ist als innerste Schicht von einer Schleimhaut, der Mucosa ausgekleidet, die sich von innen nach außen in das Epithel, die Lamina propria und die Muscularis mucosae gliedern lässt. Die Lamina propria beherbergt, neben Stromazellen, Blut- und Lymphgefäßen, Zellen der Immunabwehr. Insbesondere Lymphozyten wandern hier im Falle einer Infektion oder Entzündung vermehrt ein. Mit direktem Kontakt zur Außenwelt bildet das Epithel des Darmlumens eine Grenze zu potenziellen Erregern. Es besteht aus einschichtigem Zylinderepithelzellen und wird durchgängig von einem Schleimteppich, dem Mucus, überzogen (Lüllmann-Rauch and Asan).

2.1.2.2 Mucus

Mucus besteht hauptsächlich aus Mucinen. Dabei handelt es sich um große (> 154 kDa) Glykoproteine, die der Familie der MUC-Gen Mucine zugeordnet werden und zu der aktuell 14 Vertreter gehören (Dekker et al., 2002). Die einzelnen Vertreter unterscheiden sich stark in ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrem Vorkommen. So können sie sowohl Gele formen als auch als einzelne große Polymere bestehen und transmembranär oder extrazellulär vorliegen (Arike and Hansson, 2016). Der Hauptvertreter der gelformenden Mucine von Menschen und Mäusen im Gastrointestinaltrakt ist MUC2 (Gum et al., 1994).

Die Funktion des Mucus im Gastrointestinaltrakt ist es zum einen, das Epithel vor seiner Selbstverdauung zu schützen. Zum anderen reduziert die Mucus-Schicht die Zahl der Antigene, denen das Darmepithel ausgesetzt wird und spielt somit eine wichtige Rolle im körpereigenen Immunsystem (Pelaseyed et al., 2014).

Dabei gliedert sich der Mucus in eine äußere und eine innere Schicht, die einen unterschiedlichen Aufbau des Mucins aufweisen. Die innere Schicht besteht aus einem dichten Mucin-Netz und haftet dem Epithel an. Sie ist weitgehend frei von Bakterien und fungiert somit

als physikalische Barriere gegenüber pathogenen Bakterien (Johansson et al., 2008). Das Mucin-Netz der äußeren Schicht ist doppelt so dick wie das der inneren. Sie haftet nicht fest an ihrem Untergrund an und ist lockerer strukturiert (Johansson et al., 2011). Diese Unterschiede der beiden Mucin-Schichten sind nicht auf Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung zurückführen. Der Hauptbestandteil bleibt MUC2. Die aufgelockerte Struktur der äußeren Mucus-Schicht wird bewirkt durch die proteolytische Spaltung der langen Oligosaccharidketten. Beim Menschen geschieht dies durch die Metalloprotease *human calcium-activated chloride channel regulator-1* (*human chloride channel accessory 1*: hCLCA1) und bei Mäusen den *murine calcium-activated chloride channel regulator-1* (*murine chloride channel accessory 1*: mCLCA, hier: CLCA1) (Nystrom et al., 2018).

Zusätzlich stellt die äußere Schicht des Mucus den Lebensraum für kommensale Bakterien. Viele dieser Bakterien, die Teil unseres körpereigenen Mikrobioms sind, nutzen unter anderem die Oligosaccharide des Mucins als Nahrung (Arike and Hansson, 2016).

2.1.3 Chemische Barrieren

2.1.3.1 Reg3γ

Die Mucusschicht, ist nicht nur eine rein physische Barriere gegenüber eindringenden Bakterien, sondern sie beherbergt auch einige antimikrobielle Substanzen, die das Eindringen von nicht kommensalen Bakterien erschweren (Meyer-Hoffert et al., 2008).

Einer der Hauptproduzenten dieser antimikrobiellen Substanzen sind die sich in den Krypten des Dünndarms (*Lieberkühnkrypten*) befindenden Paneth-Zellen (Lüllmann-Rauch and Asan) (Bevins and Salzman, 2011).

Tauchen sie außerhalb des Dünndarms auf beispielsweise im Colon, sind dies Zeichen einer chronischen Entzündung. Zu den von ihnen sezernierten antimikrobiellen Substanzen zählt bspw. neben Defensinen das *regenerating islet-derived protein 3 α* (Reg3α) bzw. *regenerating islet-derived protein 3 γ* (Reg3γ) in Mäusen. Dies sind antimikrobielle C-Lectine, die bakterizid gegen grampositive Bakterien wirken (Bevins and Salzman, 2011). Durch diese und weitere antimikrobielle Substanzen sind Paneth-Zellen essenziell für die Reduktion des Eindringens von Pathogenen. Ihre Abwesenheit führt im Umkehrschluss zu einem schnelleren Durchdringen der Mucusschicht durch Bakterien. Wechselseitig hat die Bakterienlandschaft im Darm Einfluss auf die Expression eines komplexen antimikrobiellen Transkriptionsprogramms, das Reg3γ mit einschließt (Vaishnava et al., 2008).

2.1.3.2 iNos

Nitric oxide synthases (Nos) bezeichnet eine Enzymgruppe, die unter Zuhilfenahme von NADPH L-Arginin zu Citrulin und Stickstoffmonoxid (NO) umwandelt. Es gibt drei Isoformen von Nos: Nos1 auch neuronale Nos (nNos) genannt, Nos3 oder endotheliale Nos (eNos) und die *inducible Nos* (iNos) oder Nos2 (Guzik et al., 2003). Die ersten beiden, nNos und eNos, werden konstitutiv exprimiert, sind Calcium abhängig und produzieren nur sehr geringe Mengen NO. Die iNos hingegen ist Calcium unabhängig und wird bei Bedarf exprimiert, wenn große Mengen an NO gebraucht werden (Alderton et al., 2001).

NO ist in großen Mengen toxisch, hat jedoch zahlreiche regulatorische Effekte. Durch die Fähigkeit direkt mit z. B. strukturellen Elementen, Nukleinsäuren oder metabolischen Enzymen von infektiösen Pathogenen zu reagieren, wirkt NO direkt bakterizid, reduziert die Pathogenität von Erregern und behindert ihr Wachstum. Von iNos produziertes NO hat ebenfalls immunmodulatorische Effekte und stimuliert beispielsweise die Reifung von Phagosomen (Bogdan, 2015). Damit ist iNos ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort.

2.1.4 Das Mikrobiom als Barriere

Der Begriff Mikrobiota bezieht sich auf Mikroorganismen als Lebensform, während sich Mikrobiom auf die Summe ihrer Gene bezieht. Beide Begriffe umfassen die gesamte Population von Mikroorganismen an einem Ort und beinhaltet somit neben Bakterien auch Viren, Pilze, Archaea und eukaryotische Einzeller (Sekirot et al., 2010). Im Folgenden wird unter dem Begriff *Mikrobiom*, sowie synonym *Mikrobiota*, hauptsächlich auf die bakterielle Besiedelung speziell des Darms Bezug genommen.

Insbesondere unmittelbar nach der Geburt weist ebendiese bakterielle Besiedelung beim Menschen starke Variationen und Schwankungen auf. Die intraindividuelle Variabilität in Anzahl und Artenvielfalt nimmt innerhalb des ersten Lebensjahres ab, die interindividuelle Variabilität bleibt aber weiterhin bestehen (Palmer et al., 2007). Im Erwachsenenalter beträgt das Mikrobiom von Säugetieren geschätzte 10^4 - 10^7 CFU/ml im Dünndarm und sogar 10^{11} - 10^{12} CFU/ml im Colon (O'Hara and Shanahan, 2006).

Die Menge an symbiontisch lebenden Mikroorganismen in uns hilft uns bei der Verdauung von Nahrungsbestandteilen und trägt zu der Funktionalität unserer Immunabwehr bei (Duerkop et al., 2009). So triggern die im Darm ansässigen kommensalen Mikrobiota einen Klassenwechsel von IgM zu IgA in intestinalen B-Zellen (He et al., 2007) und regulieren die Entwicklung von T-Zellen (Hall et al., 2008; Ivanov et al., 2008).

Zusätzlich stimulieren sie über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) die im Darmepithel sitzenden Paneth-Zellen und induzieren somit eine ständige Ausschüttung antimikrobieller Substanzen. Diese antimikrobiellen Substanzen wiederum bilden eine Barriere gegen das tiefere Eindringen von Kommensalen und von Pathogenen in die Mucosa-Schicht (Vaishnava et al., 2008).

Für diese Unterstützung des Immunsystems ist die Zusammensetzung und nicht die reine Anzahl der Mikrobiota entscheidend. Zwischen kommensalen Bakterienstämmen und Pathogenen findet eine Kolonisationskompetition statt. Kommensale Bakterienstämme konkurrieren mit pathogenen Bakterien um Nahrungsbestandteile, wie zum Beispiel Kohlenhydrate und Aminosäuren. Sind die Kommensalen in diesem Konkurrenzkampf stärker, können sie Pathogene an der Besiedelung des Darms hindern (Kamada et al., 2013).

Zahlenmäßig dominierend unter den Mikrobiota des Darmes von Labormäusen sind die Stämme *Firmicutes* und *Bacteroidetes*. Während bei wildlebenden Mäusen als nächstes die *Proteobakterien* folgen, sind diese bei Labormäusen kaum zu finden (Rosshart et al., 2017). Der Stamm der *Firmicutes* gilt als protektiv gegen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD), da eine verminderte Präsenz bei Patient*innen mit IBD im Vergleich zu Gesunden beobachtet wurde (Walters et al., 2014). Innerhalb des Stammes der *Firmicutes* gehören im Darm die meisten Vertreter der Klasse der *Clostridien* an (Eckburg et al., 2005). Wichtige Vertreter der grampositiven *Firmicutes* sind die *Lactobacilli*. Sie machen im murinen Dickdarm rund 25% aller Bakterien aus. Die Ordnung der *Lactobacilli* wird als probiotischer Nahrungsmittelzusatz genutzt. Eine Erniedrigung der *Lactobacilli* wird im Menschen mit Reizdarmsyndrom assoziiert. Morbus Crohn wird unterdessen mit einer Erhöhung der *Lactobacilli* im menschlichen Darm in Verbindung gebracht (Heeney et al., 2018).

Ähnlich wie der Stamm der *Firmicutes*, wird eine Verringerung des Stammes der gramnegativen *Bacteroidetes* im menschlichen Darm mit IBD assoziiert (Walters et al., 2014). Zu den Stämmen mit niedrigerem Vorkommen in der Maus gehören unter anderem grampositive *Aktinobakterien* und die bereits erwähnten gramnegativen *Proteobakterien* (Rosshart et al., 2017). Beide Stämme verhalten sich in der menschlichen Darmflora gegensätzlich zu *Firmicutes* und *Bacteroidetes* bei IBD. Sie liegen in diesem Zusammenhang vermehrt im Darm vor (Walters et al., 2014).

2.1.5 Pathogene

Einige Pathogene lösen eine Darminfektion aus, indem sie die Mucus-Schicht und die Schicht der kommensalen Bakterien aktiv durchdringen.

Eines der wenigen Bakterien, das dazu in der Lage ist, in der Maus ‚*attaching and effacing*‘ Läsionen (A/E-Läsionen) hervorzurufen, ist das gramnegative Bakterium *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*). Eine Infektion mit *C. rodentium* in der Maus ist daher, bezüglich des Effekts auf die Darmmucosa, vergleichbar mit einer Infektion des Menschen mit dem enteropathogenen *Escherichia coli* (*EPEC*) und dem enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (*EHEC*) (Collins et al., 2014). Beide Fälle sind gekennzeichnet durch die Anheftung der Bakterien an die Mucosa-Schicht des Darmepithels und einem anschließenden Angriff der Zellwand und des Zytosols der Enterozyten durch Toxine (Wales et al., 2005). Einige *EPEC*-Stränge sind *in vitro* zusätzlich dazu in der Lage, selbst in die Zellen einzudringen (Donnenberg et al., 1989).

Folge der Infektion sind eine Epithelzellvermehrung mit einhergehender Kryptenhyperplasie. Im Menschen geht eine *EPEC*- oder *EHEC*-Infektion mit einer Colitis mit fulminanter Diarrhö und einem stark verminderten Allgemeinzustand einher. Im Mausmodell einer *C. rodentium*-Infektion fallen sowohl Colitis als auch Diarrhö eher mild aus (Crepin et al., 2016).

2.2 NADPH Oxidasen

Bei den NADPH Oxidasen (Noxe) handelt es sich um verschiedene Isoformen von Transmembranmolekülen, die Elektronen von der einen auf die andere Seite biologischer Membranen befördern. Als Donator fungiert dabei NADPH oder NADP. Der Akzeptor auf der anderen Seite der Membran ist in der Regel Sauerstoff (O_2), wodurch als Endprodukt dieses Prozesses, Reaktive Sauerstoff Spezies (*reactive oxygen species*; ROS), entstehen (Bedard and Krause, 2007). Die Funktion der Nox Isoenzyme besteht ausschließlich darin, die Reduktion von O_2 zu ROS zu katalysieren.

Die Noxe Familie umfasst beim Menschen insgesamt 7 Isoformen: Nox1-5 sowie *dual oxidase 1* und 2 (Duox1, Duox2), von denen jede eigene spezifische Gewebeexpression aufweist (Krause, 2004). Bei der Maus wird Nox5 nicht exprimiert (Sirokmany et al., 2016).

Die ebenfalls nach einer ihrer Untereinheiten, gp91^{phox}, bezeichnete Nox2 wurde als erste Vertreterin der Familie der Noxe entdeckt. Sie wird sowohl im Menschen als auch in der Maus hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen exprimiert und deswegen oft als phagozytische Nox bezeichnet (Bedard and Krause, 2007). Auch in Endothelzellen von Hirnarterien wurde sie entdeckt (Ago et al., 2005) und mit sehr niedriger Expression in Enterozyten nachgewiesen (Lindquist et al., 2018). Fehlt Nox2, hat dies systemische Folgen. Der genetisch bedingte Funktionsverlust von Nox2 manifestiert sich im Menschen beispielweise in der Krankheitsentität Chronische Granulomatose (Panday et al., 2015). Eine Überexpression von Nox2 begünstigt die Entstehung einer nekrotisierenden Enterocolitis (NEC) (Welak et al., 2014).

Nox1 wurde als erstes Homolog von Nox2 entdeckt und weist, in der Maus sowie im Menschen, im Colon die höchste Expression auf (Banfi et al., 2000). Zudem lässt sie sich in einigen anderen Geweben, wie glattem Muskel, Prostata, Uterus und Placenta sowie in Endothelzellen detektieren (Bedard and Krause, 2007).

Nox3 wird bei Säugetieren nur in wenigen Geweben exprimiert. Im erwachsenen Organismus wird sie vor allem im Innenohr, aber auch in Colon und Niere exprimiert (Bedard and Krause, 2007).

Nox4 ist in Geweben und Zellen von Säugetieren weit verbreitet. Sie ist in Niere, Leber, Eierstöcken und Auge, sowie Mesangialzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen leicht zu detektieren (Panday et al., 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Nox4 in Enterozyten hoch exprimiert wird (Lindquist et al., 2018).

Nox5 wird im Menschen hauptsächlich in Lymphgewebe, Hoden und Niere exprimiert. Nagetiere sind Nox5-defizient. (Banfi et al., 2001).

Die Duale NADPH Oxidase 1 (Duox1) und die Duale NADPH Oxidase 2 (Duox2) sind, ebenso Teil der Nox-Familie. Aufgrund ihres hohen Vorkommens und der Erstentdeckung in der menschlichen Schilddrüse (Thyroidea) wurden die beiden Isoformen zunächst Thyroid Oxidasen (ThOX) genannt (Bedard and Krause, 2007). Detailliertere Unterschiede in der Funktion werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

Duox1 ist bei Säugetieren vorrangig in der Schilddrüse, in etwas geringeren Mengen im respiratorischen Epithel und Cerebellum sowie mit sehr schwacher Expression im Ileum und Colon zu finden. Im Fall von gravierenden miss-sense Mutationen der Maturationsfaktoren von Duox1 kann ein angeborener Hypothyroidismus die Folge sein (Liu et al., 2019).

2.2.1 Duox2

Während das Endprodukt von Nox1, Nox2, Nox3 und Nox5 Superoxid (O_2^-) ist, katalysieren die Duox1 und Duox2 sowie Nox4 die H_2O_2 Produktion. Alle Nox-Isoformen beinhalten in ihrer Struktur ein Motiv, das sich aus 6 transmembranären Domänen zusammensetzt und den katalytischen Kern bildet. Es enthält Histidinreste und hat einen langen zytoplasmatischen Schwanz mit NADPH und FAD *binding sites* (De Deken et al., 2014). Zusätzlich zu den 6 transmembranären Strukturen des katalytischen Kerns besitzt Duox2 ein weiteres transmembranäres Segment, das die Verbindung zu einer zusätzlichen intrazellulären Region darstellt. (Lewit-Bentley and Rety, 2000). Auf extrazellulärer Seite befindet sich in diesem 7. Segment eine Peroxidase Homologie Domäne (PHD) (De Deken et al., 2014).

Der Maturationsfaktor Duox Aktivator 2 (DuoxA2) ermöglicht Duox2 das Endoplasmatische Reticulum (ER) zu verlassen und zunächst zum Golgi-Apparat und anschließend an die Zelloberfläche zu wandern. Die gleiche Funktion übt DuoxA1 für Duox1 aus. Allerdings wurde festgestellt, dass eine der Splicing-Varianten von DuoxA1, DuoxA1 α , auch einen Transport von Duox2 zur Plasmamembran bewirkt (Morand et al., 2009). In dieser Konstellation produziert der Komplex Duox2/DuoxA1 α mehr O_2^- und wenig H_2O_2 . Der Komplex Duox2/DuoxA2 unterdessen produziert große Mengen H_2O_2 und nicht detektierbare Mengen O_2^- (Morand et al., 2009).

Ein weiterer Unterschied zu den übrigen Nox Enzymen besteht darin, dass Duox2 keine zytosolischen Aktivatoren oder organisatorischen Untereinheiten zur Aktivierung benötigt. Die

Bindung von Ca^{2+} am EF-Hand- Motiv reicht zur Aktivierung von Duox2 aus (Panday et al., 2015).

Ebenso wie Duox1 weist Duox2 eine starke Expression in der Schilddrüse von Vertebraten auf. Im Menschen ist Duox2 dort 2-5 mal höher exprimiert als Duox1 (Morand et al., 2009) und nimmt durch die Bereitstellung von H_2O_2 eine entscheidende Rolle in der Produktion von Schilddrüsenhormonen (Morand et al., 2009) ein. Varianten der Gensequenz von Duox2 werden mit mildem Hypothyroidismus assoziiert (Bedard and Krause, 2007) und schwerere inaktivierende Mutationen führen zum angeborenen Hypothyroidismus (Moreno et al., 2002). Außerdem wurde Duox2 mit hohen Expressionsleveln in sekretorischen Drüsengeweben und Schleimhäuten nachgewiesen und trägt dort zur Wundheilung bei (Lambeth and Neish, 2014). Inaktivierte Varianten von Nox1 und Duox2 sind mit *very early onset inflammatory bowel disease* (VEOIBD) assoziiert (Hayes et al., 2015), was auf einen proinflammatorischen Phänotyp im Falle einer verringerten Produktion von ROS hinweist. Im Gegensatz dazu wird bei Colitis ulcerosa-Patient*innen eine Überaktivierung von Duox2 beobachtet. *In vitro* nutzt im respiratorischen Trakt die Lactoperoxidase (LPO) das von Duox2 bereitgestellte H_2O_2 zur Oxidation von Thiocynat (SNC^-) zu Hypothiocyanit (OSCN^-), welches antimikrobielle Eigenschaften aufweist (Geiszt et al., 2003). Welche Rolle Duox2 *in vivo* in der Immunabwehr spielt, wurde bislang unzureichend untersucht, da ein *full body knock out* gleichzeitig zu einem schweren Hypothyroidismus führt, der jedwede Immundefekte überdeckt. (Sarr et al., 2018) .

2.2.2 ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (*engl. Reactive oxygen species*, ROS) bezeichnet eine Gruppe von reaktionsfreudigen Molekülen, die Sauerstoff enthalten, wie z.B. Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$). Sie sind, neben zahlreichen endogenen und exogenen Quellen, die Produkte der Nox-Isoformen und gehen vielfältige Interaktionen mit ihrer Umwelt ein. Sie können oxidativen Schaden an zellulären Biomolekülen verursachen und führen damit zu Entzündung und nachfolgendem Gewebsschaden verursachen. Weiterhin können sie als Signalmoleküle in zellulären Signaltransduktionen von eukaryotischen Zellen fungieren (Li et al., 2016). Bei der Bildung von Disulfidbrücken während der Faltung von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum entsteht H_2O_2 als Nebenprodukt durch die Oxidierung von O_2 . Das H_2O_2 fungiert als Oxidant und oxidiert unter anderem Thiolatanionen, welche danach mit Schwefelwasserstoff Disulfidbrücken formen und ist damit an der Faltung von Proteinen beteiligt (Rampon et al., 2018; Zhang et al., 2019). Auch bei der Thyroxin-Synthese in der Schilddrüse wird H_2O_2 als Elektronenakzeptor von der Thyroid Peroxidase (TPO) benötigt. Liegt hier zu wenig H_2O_2 vor, wirkt sich dies in einer

Schilddrüsenunterfunktion aus. Ein dauerhaftes Übergewicht von H_2O_2 kann hingegen zu Zellschäden auf lange Sicht zu einem Schilddrüsenkarzinom führen (Szanto et al., 2019).

Im Darm wird die übermäßige Produktion von ROS mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie IBD in Verbindung gebracht. Liegt eine Defizienz von ROS vor, wie z. B. im Falle eines Knock-outs aller Nox-Isoformen, führt dies zu Immundefizienz mit erhöhter Anfälligkeit für bakterielle Infektionen (Aviello and Knaus, 2018b).

2.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die bisherigen Publikationen zu den Auswirkungen einer Defizienz von Duox2 fußen auf der Verwendung von konventionellen *fullbody knock-out*-Mäusen von Duox2 (Duox2-KO-Mäuse). In den Duox2-KO-Mäusen dominiert die Duox2-Defizienz in der Schilddrüse in Form eines Hypothyreoidismus, sodass eine präzise und eindeutige Interpretation der Befunde im Darmepithel bei Duox2-defizienten Mäusen nicht möglich war.

Einige Arbeiten legen nahe, dass Duox2 neben der Produktion von Thyreoglobulin an der Interaktion des Darmepithels mit den Mikrobiota beteiligt ist (Aviello and Knaus, 2018a; Deken et al., 2013). Dies basiert vor allem auf *in vitro* Befunden, da bisher ein *in vivo* Modell für die spezifische Analyse der Funktion von Duox2 im Darm fehlte. Durch Kreuzen von Duox^{fl} (Kim et al., 2018) -Mäusen mit villin1Cre-Mäusen wurde eine Mauslinie generiert, in der Duox2 spezifisch in den Epithelzellen des Darms ausgeknockt ist (Duox2^{fllox/fllox} Villin1Cre^{+/-}).

Das Ziel meines Projektes war es, die Funktion von Duox2 im Darm anhand dieses Mausmodells zu charakterisieren. Spezifisch wurden im Rahmen des Projekts zwei Fragen untersucht:

1. Welche Konsequenzen hat die darmepithel-spezifische Defizienz für Duox2 für die Darm-Homöostase?
2. Welche Konsequenzen hat die darmepithel-spezifische Defizienz für Duox2 für die Immunantwort gegen intestinale Pathogene?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Primer

Tabelle 1 Primer Nox-Isoformen

Zielgen	Primer	Sequenz (5'–3')	Lage (Exon)	Länge (bp)	Kategorie (Pr.=Primer, A.=Amplicon)	Amplicon-Größe(bp)
Nox1	Nox1-F	TGGTCATGCAGCATTAACTTTG	12	23	innerhalb	92
	Nox1-R	CATTGTCCCACATTGGTCTCC	12	21	innerhalb	
Nox2	Nox2-F	GGTTCCAGTGC GTGTTGCT	3+4	19	Exon-übersp. Pr.	97
	Nox2-R	GCGGTGTGCAGTGCTATCAT	4	20	innerhalb	
Nox4	Nox4-F	GGAGACTGGACAGAACGATTCC	12+13	22	Exon-übersp. Pr.	103
	Nox4-R	TGTATAACTTAGGGTAATTTCTAGAGTGAATG A	13+14	33	Exon-übersp. Pr.	
Duox1	Duox1-F	AGCCCTGAAAGAACCCTAC	3	20	Exon-übersp. A.	198
	Duox1-R	TCCCATGCGGGATGTAAATG	4	20	Exon-übersp. A.	
Duox2	Duox2-F	CGCTACTGCCCAACCCTCGC	3	20	Exon-übersp. A.	140
	Duox2-R	TGGTGTTTCCACACTCACCAGGTCTG	4	26	Exon-übersp. A.	
Aktin	Aktin-F	AGACCTGTACGCCAACACAG	4	20	innerhalb	127
	Aktin-R	AGGAGGAGCAATGATCTTG	4+5	19	Exon-übersp. Pr.	

Tabelle 2 Primer Mikrobiota

Zielgen	Primer	Sequenz (5'–3')	Amplicon-größe (bp)	Quelle o. Referenz
Aktinobakterium	Act920F3	TACGGCCGCAAGGCTA	170	Bacchetti, et al. (2011)
	Act1200R	TCRTCCCCACCTTCTCCG R=G		
Bacteroidetes	Bac960F	GTTTAATTCGATGATACGCGAG	122	Yang, Y. W., et al. (2015)
	Bac1100R	TTAASCCGACACCTCACGG		
Firmicutes	Firm934F	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA Y=C	126	Guo, X., et al. (2008)
	Firm1060R	AGCTGACGACAACCATGCAC		
Lactobacillus	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	347	Helig, et al. (2002)
	Lab-0677	CACCGCTACACATGGAG		
γ-Proteobacteriae	1080F	TCGTCAGCTCGTGTGTGTGA Y=C	170	Bacchetti, et al. (2011)
	#1202R	CGTAAGGGCCATGATG		
universal 16S rDNA	UniF334	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT		Yang, Y. W., et al. (2015)

Tabelle 3 weitere Primer

Zielgen	Primer	Sequenz (5'–3')	Ampliconlänge (bp)	Quelle o. Referenz
RegIII	Primer for	TGCCTATGGCTCCTATTGCT	20	Bergstrom, et al. (2010)
	Primer rev	CACTCCCATCCACCTCTGTT	20	Bergstrom, et al. (2010)
Muc2	MUC2-F	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	22	Wlodarska, et al. (2011)
	MUC2-R	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	22	Wlodarska, et al. (2011)
CLCA1	Primer for	ACTAAGGTGGCCTACCTCCAA	101	Koroleva, et al. (2015)
	Primer rev	GGAGGTGACAGTCAAGGTGAG	101	Koroleva, et al. (2015)

3.1.2 Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien

Tabelle 4 Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien

Name	Details
2-Propanol	Roth, #9866.6
6x DNA Load	Thermo-Scientific, #R0611
Agarosepulver	Bio-Budget Technologies GmbH, #10-35-10xx
Carnoy's Solution	60 ml Ethanol (96%), 30 ml Chloroform, 10 ml Essigsäure (99%)
cDNA-Kit	Thermo-Scientific, #K1622
Chloroform	BioChemica, #A3691,1000
DNA Kit	QIAamp, #HB-2560-001
DNA Ladder (grün)	Thermo-Scientific, #SM0633
Dnase	Sigma-Aldrich, #AMPD1-1KT
Entellan	Merck, #1.07961.0500
Eosin G-Lösung	Roth, #X883.2
Ethanol	Roth, #9065.5
GelRed	Biotium, #41003
Hämalaulösung	Roth, #T865.2
Kit	Sigma-Aldrich, #395B-1KT
Periodic Acid	Sigma-Aldrich, #3951-100ML
Primer	s. Tab. Primer
qPCR Master-Mix	Steinbrenner, #SL-9002B-20ML
RNase H	Thermo-Scientific, #EN0202
Roth Histofix 4%	Roth, #P087.5
Schiffs Reagent	Sigma-Aldrich, #3952-50ML
TAE	0,8 mM Tris, 0,4 mM Na2 EDTA, pH 8,5
TaqBeats	illustra, #27955702
TritonX 100	Roth, #9002-93-1
Trizol	Life Technologies, #15596018
Xylol	Roth, #9713.5

3.1.3 Ausrüstung und Geräte

Tabelle 5 Geräte

Name	Details
Centrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5417 R
Dissoziator	Miltenyi Biotec, gentleMACS Octo Dissociator
Gelkammer	Biorad, Power Pac 200
Immagingsystem	Biorad, ChemiDoc
Light Cyclor	Biorad, C1000 Touch Thermal Cyclor
Mini Centrifuge	VWR, Galaxy Mini
Slidescanner	Leica
Spectrometer	Thermo Scientific, Nanodrop 2000
Spectrophotometer	Thermo Scientific, Nanodrop 2000
Spiralplattensystem	IUL, Eddy Jet 2W
Thermocycler	Biometra, T3000 Thermocycler
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer comfort
Vortex	neoLab, Vortex Mixer

3.1.4 Software

Tabelle 6 Software

Name	Firma	Produktversion
LinRegPCR	Medical Biology	1.0.0.0
GraphPad Prism	GraphPad Software	7.0.0
Microsoft Excel	Microsoft	

3.1.5 Mäuse

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um Mäuse, bei denen die Exons 1-3 des Duox2-Gens von loxP sites flankiert werden ($\text{Duox2}^{\text{fl/fl}}$). Sie wurden von der Firma Taconic-Artemis generiert und sind noch nicht publiziert (Abbildung 1). Die $\text{Duox2}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse wurden mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter dem Villin-1-Promoter exprimieren, verpaart (Madison et al., 2002). Diese $\text{Duox2}^{\text{fl/fl}}$ x Villin-1-Cre-Mäuse haben einen Duox2-spezifischen-Knockout in intestinalen Epithelzellen (engl. Intestinal epithelial cells, IEC) ($\text{Duox2}^{\text{IEC-KO}}$ -Mäuse).

Die Mäuse wurden unter spezifisch keimfreien (*specific pathogen free, SFP*) Bedingungen gehalten. Sie besaßen keine zuvor ausgewählte Bakterienbesiedelung mit der Absicht durch Kontakt und Futter ein eigenes, undefiniertes Mikrobiom entwickeln zu können.

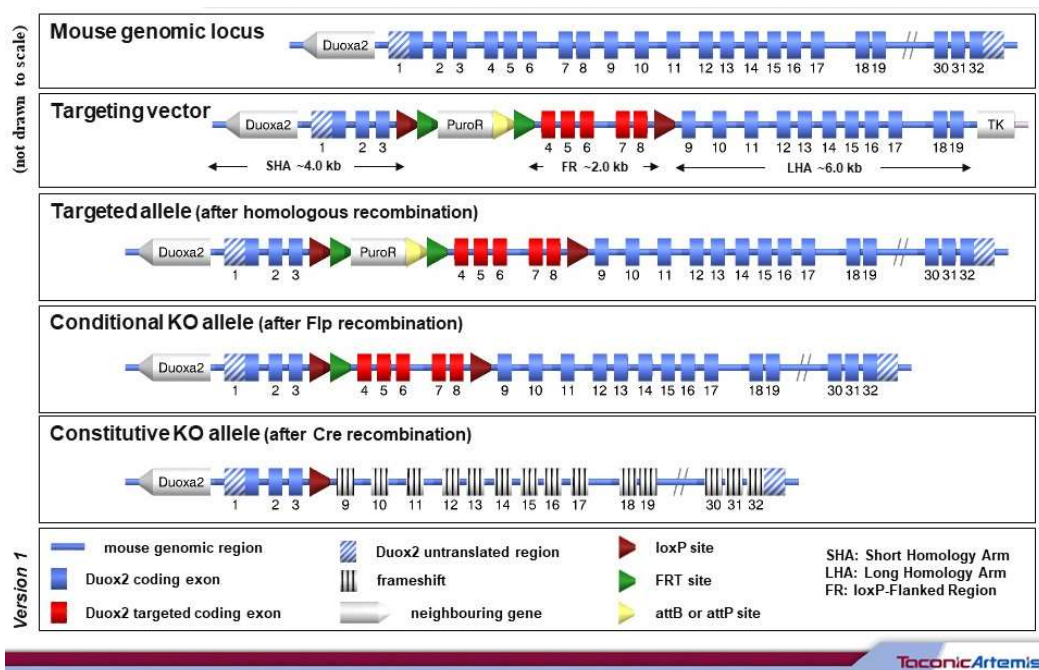


Abbildung 1 Material: Vektorstrategie $\text{Duox2}^{\text{fl/fl}}$ von Taconic-Artemis

3.1.6 Bakterien

Es wurde mit Bakterien der Gattung *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) aus dem Stamm DBS100 gearbeitet, mit der Bezeichnung ATCC-51459 (LGC Standards, #61603069). Die Bakterien wurden als Glycerol-stocks bei -80°C gelagert.

3.2 Methoden

3.2.1 Probengewinnung

Alle folgenden Versuche wurden anhand von Gewebeproben von Duox2^{IEC-KO}-Mäusen durchgeführt. Dabei wurde bei den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und den WT-Mäusen jeweils sichergestellt, dass Alter und Geschlecht gleichmäßig verteilt sind.

3.2.1.1 Organpräparation

Zur Gewinnung der Organe wurden die Duox2^{IEC-KO}-Mäuse und ihre WT-Geschwister im Alter zwischen 9 und 12 Wochen durch zervikale Dislokation getötet und anschließend Milz, mesenteriale Lymphknoten, sowie Ileum, Caecum und Colon anatomisch frei präpariert, entnommen und gewogen. Zusätzlich wurden die entnommenen Darmstücke vermessen und je ein 5mm langes Stück zur späteren RNA-Gewinnung abgetrennt und in 1 ml Trizol (Life Technologies, #15596018) bei -80°C gelagert. Die verbleibenden Gewebestücke wurden aufgerollt, in Carnoy's Solution (60 ml Ethanol (96%), 30 ml Chloroform, 10 ml Essigsäure (99%)) fixiert und im weiteren Verlauf für histologische Färbungen entwässert und in Paraffin gebettet.

3.2.1.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Die bei -80°C in Trizol gelagerten Darmgewebeproben wurden mit *Keramik-Beads* im Homogenisator (Bertin Technologies, Precellys 24) lysiert. Anschließend erfolgte unter Inkubation von Chloroform und folgender Zentrifugation eine Phasentrennung. Die obere flüssige Phase wurde in ein Reagiergefäß überführt und der Rest verworfen. Danach wurden die Proben mit Isopropanol inkubiert und anschließend zentrifugiert, um eine Prätizipation der RNA zu bewirken. Dieses Mal wurde die flüssige Phase verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 75% EtOH wurde die RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Verunreinigende DNA wurde mit DNase I (Sigma-Aldrich, #AMPD1-1KT) unter Verwendung des Herstellerprotokolls verdaut. Die Konzentration der RNA wurde im Spectrophotometer (Thermo-Scientific, Nanodrop2000) gemessen.

Im Anschluss wurde die RNA mit einem cDNA-Kit (Thermo-Scientific, #K1622) dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll folgend in cDNA umgeschrieben. Vor der Verwendung der entstandenen cDNA wurde eventuell verbliebene RNA mittel RNase H (Thermo-Scientific, #EN0202) verdaut und die cDNA 1:15 verdünnt.

3.2.1.3 Isolation Mikrobieller DNA

Die DNA der sich im Darm befindlichen Mikrobiota wurde mit einem DNA Kit (QIAamp, #HB-2560-001) dem Protokoll des Anbieters folgend aus dem Darminhalt von Ileum, Cecum und Colon isoliert. Dabei wurden die Faecesproben gemeinsam mit der Lösung *CD1* in ein *PowerBead Pro Tube* gegeben und anschließend im Homogenisator (Bertin Technologies, Precellys 24) homogenisiert um die Zellen zu lysieren. Der nach Zentrifugation entstandene Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß überführt. Um Inhibitoren zu entfernen wurde die Lösung *CD2* hinzugegeben. Nach Inkubation und Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und der Rest verworfen. Danach wurde, um die DNA zu binden, die Lösung *CD3* hinzugegeben und das Gemisch auf eine *MB Spin Column* geladen, durch die die DNA durch Zentrifugation herausgefiltert wurde. Abschließende wurde die DNA mit den Lösungen *EA* und *C5* gewaschen und in Lösung *C6* aufgenommen. Vor der Verwendung wurde die entstandene DNA 1:15 verdünnt.

3.2.2 Histologie

Aus dem in Paraffin eingebetteten Darmgewebe wurden am Mikrotom 3µm dünne Schnittpräparate gefertigt und auf einem Glasobjektträger (Engelbrecht, 76x26mm) aufgenommen.

3.2.2.1 PAS-Färbung

Zur Beurteilung der Becherzellen im Darmepithel wurden in den Histologieschnitten Kohlehydratstrukturen mit der Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) sichtbar gemacht und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Hierzu wurden die Schnitte zunächst in je 2minütigen Schritten in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert, im Anschluss 5 min lang mit Periodic Acid (Sigma-Aldrich, #3951-100ML) inkubiert und zwei Mal 5 min mit H₂O_{bidest} gewaschen. Als nächstes erfolgte eine Inkubation für 15 min mit Schiff's Reagent (Sigma-Aldrich, #2952-50ML) sowie ein 5-minütiger Waschschrift mit Leitungswasser. Die folgende Inkubationszeit mit Hämatoxylin betrug 90 s mit erneutem 5-minütigem Waschen mit Leitungswasser. Danach wurden die Histologieschnitte durch je 1-minütige Schritte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend mit Entellan (Merck, #1.07961.0500) eingedeckelt.

3.2.3 Evaluierung der Histomorphologie

Zur Beurteilung von Mucosa-Architektur und Epithelveränderungen wurden als Parameter die Längen der Krypten bzw. Zotten sowie die zugehörigen Zellzahlen in den jeweiligen Darmabschnitten untersucht. Hierfür wurde in mit PAS gefärbten Histologiebildern pro Schnitt die Länge von je 30 Krypten gemessen. Von den vermessenen Strukturen wurden nachfolgend die Gesamtheit der Zellen sowie die Becherzellen quantifiziert. In den Darmabschnitten des Ileums wurden zusätzlich die Zotten und Paneth-Zellen an der Kryptenbasis anhand des gleichen Rasters bestimmt.

Eventuell auftretende Immunzellinfiltrate und das verstärkte Vorliegen von Peyer-Plaques wurden als Entzündungszeichen gewertet.

3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.2.4.1 Farbstoffbasierte quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Tabelle 7 Reagenzien für die RT-qPCR

Reagenz	Menge für 25µl Ansatz
Primer forward (10µM)	1µl
Primer reverse (10µM)	1µl
qPCR-Mastermix	10µl
H ₂ O	7µl
cDNA/DNA	1µl

Zur Quantifizierung des Expressionsniveaus von Enzymen, Proteinen und Mikrobiota auf genetischer Ebene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative Real-time polymerase chain reaction*; qRT-PCR) wurde die zuvor synthetisierte cDNA bzw. DNA mit einer Konzentration von 1:15 verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Steinbrenner, #SL-9002B-20ML) wurde als Reporter eingesetzt, sodass die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

Es wurde ein PCR-Ansatz (Tabelle 7) zusammengegeben. Anschließend wurde im Thermocycler (Bio-Rad, C1000 Touch Thermal Cycler) die cDNA bzw. DNA in der Initialisierungsphase 3 min lang auf 95°C erhitzt. Die darauffolgenden Schritte der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation fanden je für 10 sek bei 95°C, 60°C und 72°C statt. Abschließend wurde ein weiteres Mal für 10 sek auf 95°C, für 1 min auf 65°C und

für weitere 5 sek auf 95°C erhitzt. Lediglich für die Quantifizierung der Mikrobiota fand aufgrund der Primereigenschaften die Elongation bei 63°C statt. Die Auswertung wurde mit LinRegPcr (s. Material Software) durchgeführt.

3.2.4.2 Echtzeit PCR (RT-PCR)

Tabelle 8 Reagenzien für die RT-PCR

Reagenz	Menge für 25µl Ansatz
Primer forward (10µM)	1µl
Primer reverse (10µM)	1µl
H ₂ O	22µl
cDNA/DNA	1µl

Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-time polymerase chain reaction*; RT-PCR) wurde in Einzelfällen für allgemeinere Fragestellungen angewendet. Hierfür wurde die zuvor synthetisierte cDNA bzw. DNA mit einer Verdünnung von 1:15 eingesetzt. Der in Tab (Tabelle 8) dargestellte PCR-Ansatz wurde in vom Hersteller mit PCR-beads versehene Tubes (GE Healthcare, #279555702) gegeben und im Thermocycler (Biometra, T3000 Thermocycler) unter dem Programm *RT-PCR* amplifiziert.

3.2.4.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Amplifikationsprodukten der RT-PCR wurden 2%ige Agarose-Gele zur Auftrennung von Amplifikationsprodukten der RT-PCR verwendet. Dazu wurde Agarosepulver (Bio-Budget Technologies GmbH, #10-35-10xx) in TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und mit GelRed (Biotium, #41003) als Gel gegossen. Die Proben wurden mit einem Probenpuffer 6x DNA Load (Thermo-Scientific, #R0611) versetzt und mithilfe des Gelelektrophorese-Gerätes (Biorad, PowerPac 200) aufgetrennt. Die Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente erfolgte mittels einer DNA-Leiter (Termo Scientific, #SM0633).

3.2.5 Infektion

Für die Infektion der Mäuse mit *C. rodentium* via Schlundsonde wurde eine Bakterienkultur angesetzt und bei 37°C für 24 h inkubiert. Vor der Durchführung der Infektion wurde den Tieren für 4 h das Futter entzogen (um die gastrointestinale Aufnahme der Krankheitserreger zu

optimieren). Anschließend wurden pro Tier 0,5 ml der Kultur über eine Schlundsonde appliziert. Die ungefähre Bakterienmenge betrug dabei 2×10^{10} Kolonien/Dosis.

3.2.6 Monitoring des Krankheitsverlaufs

Tabelle 9 *Scoring* zur täglichen Kontrolle der infizierten Mäuse

Gewicht		Zustand		Verhalten		Diarrhö	
0%	0	normal	0	normal	0	keine	0
<5 %	1	leicht	1	gering	1		
<10%	5	ungepflegt	5	eingeschränkt	5	leicht	5
<20%	10	schmutzig	10	Koordinationsstörung	10	stark	10
>20%	20	Lähmung	20	Schmerzen	20	blutig	20

Um ein engmaschiges Monitoring des Krankheitsverlaufes zu gewährleisten, erfolgte nach Infektion der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse mit *C. rodentium* zwei Mal täglich ein *Scoring* des Allgemeinzustandes anhand festgelegter Kriterien und Punktevergabe (Tabelle 9). Zusätzlich wurden eine tägliche Gewichtsmessung sowie die Quantifizierung der Diarrhoe und die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (*Colony forming units*; CFU) in den Faeces der Versuchstiere zur Beurteilung der Schwere der Infektion genutzt

3.2.6.1 Diarrhoe Quantifizierung

Im Zuge der täglichen Gewichtskontrolle der Versuchstiere wurde je ein Pellet pro Tier in ein zuvor gewogenes Reagiergefäß überführt und ein weiteres Mal mitsamt Inhalt gewogen. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C wurde erneut das Gewicht bestimmt. Aus dem Anteil des Gewichts des getrockneten Pellets am Gesamtgewicht ließ sich der Anteil des H₂O errechnen und somit das Ausmaß der Diarrhoe bestimmen.

3.2.6.2 CFU-Bestimmung

Eine Beurteilung der Kolonisierung der infizierten Tiere mit *C. rodentium* über Nachweis und Quantifizierung von *C. rodentium* Kolonien erfolgte an d0, d1, d3, d7 und d10 des Infektionsexperiments. Hierzu wurde je Maus ein Pellet in 1 ml *Phosphate buffered saline* (PBS) in einem zuvor gewogenen, sterilen Reagiergefäß lysiert.

An d10 wurde zusätzlich die CFU in Cecum und Colon, sowie mesenteriale Lymphknoten (mLN), Milz, Leber und bestimmt.

Für die Bestimmung im Blut wurden dem noch lebenden Versuchstier etwa 75 µl Blut in ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, #20.1288) abgenommen und später in ein PCR-tube mit 75 µl 0,1 % Triton x100 (Roth, 9002-93-1) in PBS transferiert.

Die Organe wurden je in ein C-Tube (Milenyi Biotec, #130-093-237) mit 2 ml 0,1 % Triton in PBS gegeben und im GentleMACS (Milenyi Biotec, gentleMACS Octo Dissociator) mit dem Protokoll m_spleen_1_01 lysiert.

Von allen Lysaten wurden nach gründlichem Vortexen jeweils 50 µl in PBS zur seriellen Verdünnung logarithmisch mittels Eddy-Jet (IUL, Eddy Jet 2W) auf MacConkey-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4 Ergebnisse

Duox2 wurde mit hohen Expressionsleveln in sekretorischen Drüsengewebe wie zum Beispiel dem Darmepithel nachgewiesen, wo es ROS ins Lumen sezerniert (Lambeth and Neish, 2014). Im Fall einer Duox2-Defizienz ist von weniger Duox2-generiertem ROS auszugehen. Sollte dieses fehlende ROS nicht durch eine vermehrte Produktion anderer Nox-Isoformen kompensiert werden, ist von weniger verfügbarem ROS auszugehen. In diesem Fall wäre anzunehmen, dass die mikrobielle Homöostase durch die veränderten ROS-Leveln beeinflusst wird. Duox2 könnte so eine wichtige Rolle bei der Abwehr von pathogenen Erregern spielen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Cre loxP-Technologie benutzt, um Duox2 in Mäusen gewebespezifisch im Darmepithel auszuschalten. Anhand dieser Mauslinie sollte die Funktion von Duox2 in der allgemeinen Darmhomöostase sowie die Auswirkungen einer Duox2-Defizienz auf die Darm-Mikrobiota im Allgemeinen und auf eine Infektion mit den Darmpathogen *C. rodentium* im Speziellen untersucht werden.

4.1 Charakterisierung der genetisch determinierten, darmspezifischen *Duox2*-Defizienz

4.1.1 Der *Duox2*^{IEC-KO} verursacht eine *Duox2*-Defizienz im intestinalen Epithel

Eine zentrale Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen stellte die Verifikation der *Duox2*-Defizienz im intestinalen Epithel der *Duox2*^{IEC-KO} Mäuse dar.

Dazu erfolgte initial eine Überprüfung der Primer für *Duox2* mittels RT-PCR anhand von *fullbody-knock-out*-Mäusen von *Duox2* (*Duox2*-KO-Mäuse) (Abbildung 2A). Dabei wurde festgestellt, dass der Primer für *Duox2* zwischen den *Duox2*-KO-Mäusen und den WT-Mäusen differenzieren kann. Lediglich in einer der drei Proben des Colongewebes der WT-Mäuse zeigt sich keine Bande.

Die eigens für die Fragestellung kreierten *Duox2*^{IEC-KO} Mäuse wurden vor Beginn weiterer Experimente überprüft. Durch den für das Darmepithelgewebe spezifischen KO sollte *Duox2* in den drei zu untersuchenden Darmabschnitten, Ileum, Cecum und Colon, möglichst nahe an der Nachweisgrenze liegen. Dies wurde durch eine qRT-PCR (Abbildung 2B) geprüft. Als Strukturprotein, das keiner gewebe- oder stadienspezifischen Regulierung unterliegt, diente hierbei *Aktin* als *housekeeping gene*, welches für die Normalisierung als Bezugsgröße herangezogen wurde. Dabei wurde bestätigt, dass das Darmgewebe als *Duox2*-defizient angesehen werden kann. Es zeigte sich, dass *Duox2* im Darm der *Duox2*^{IEC-KO}-Mäuse einen Maximalwert von <0,02 relativ zu *Aktin* erreichte (Abbildung 2B). Das bedeutet, dass *Duox2* im intestinalen Gewebe der *Duox2*^{IEC-KO}-Mäuse maximal 0,02-mal so häufig vorlag wie *Aktin*. *Duox2* wurde damit im Darm der *Duox2*^{IEC-KO}-Mäuse um ein Vielfaches höher exprimiert als im Darm der WT-Mäuse. Im Darm der WT-Mäuse lag *Duox2* maximal 1,0-mal so häufig vor wie *Aktin*. Da es sich bei dem Probenmaterial um komplette Gewebslysate des Darms und nicht ausschließlich um *Duox2*-defizientes Epithel handelte, war der Wert hinreichend gering um einen KO im IEC als plausibel zu erachten.

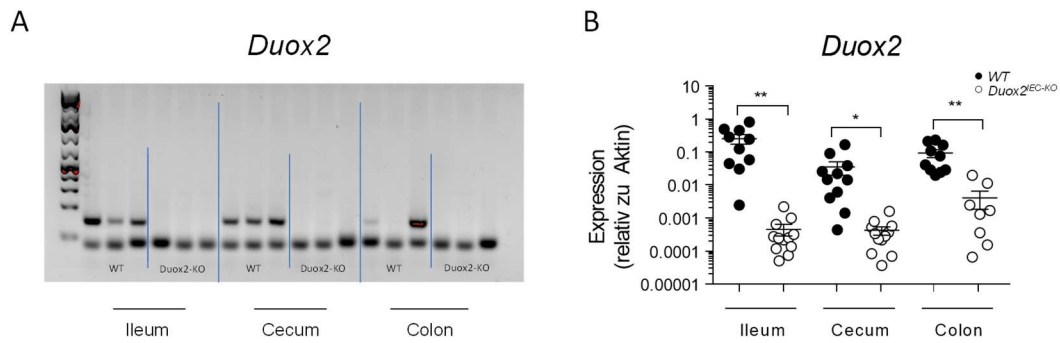


Abbildung 2 Expression von Duox2 im Darmgewebe der *Fullbody-KO-Mäuse* und der *Duox2*^{IEC-KO}-Mäuse

Gewebe von Ileum, Cecum und Colon aus WT, Duox2-Fullbody-KO-Mäusen (hier bezeichnet als Duox2-KO) und Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wurde lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde, mittels RT-PCR, *Duox2* in den Duox2-KO-Mäusen und zugehörigen WT-Mäusen amplifiziert und das Amplifikationsergebnis auf ein Agarose-Gel aufgetragen (A). Die Expressionslevel von *Duox2* in den Duox2^{IEC-KO}- und zugehörigen WT-Mäusen wurde mittels RT-qPCR bestimmt und in Relation zu *Aktin* gesetzt (B).

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

4.1.2 Duox2^{IEC-KO} bewirkt keine kompensatorische Hochregulation anderer Nox-Isoformen im Darm

Nox Enzyme werden in zahlreichen Geweben unseres Körpers exprimiert. Dabei sind die verschiedenen Nox-Isoformen nicht gleichmäßig verteilt, sondern ihre Expressionsmuster unterscheiden sich gewebeabhängig voneinander. Von den insgesamt sieben Nox-Isoformen werden Nox1 und Duox2 am stärksten in den Epithelzellen des Darms exprimiert (Panday et al., 2015). Die verschiedenen Nox-Isoformen katalysieren die Reduktion von O₂ zu (Bedard and Krause, 2007). Daher stellte sich die Frage, ob das Fehlen von Duox2 eine der anderen Nox-Isoformen kompensatorisch hochreguliert würde.

Entsprechend wurden im Folgenden die Expressionslevel der zuvor erwähnten *Nox1* sowie *Nox2*, *Nox4* und *Duox1*, in Duox2^{IEC-KO} Mäusen mit denen in WT-Mäusen verglichen. Hierfür wurde aus Gewebeproben von Ileum, Cecum und Colon RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels qRT-PCR die Expression auf mRNA-Ebene bestimmt.

Nox1 war im Colon am höchsten exprimiert, wies jedoch keinen Unterschied in der Expression zwischen dem Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse und dem ihrer WT-Geschwister auf (Abbildung 3A). *Nox4* und *Nox2* ließen sich mit geringem Expressionsniveau in Ileum, Cecum und Colon nachweisen. *Nox4* war dabei mit einem Faktor von *Aktin* von unter 0,007 nur sehr niedrig

exprimiert (Abbildung 3C). *Nox2* und *Nox4* sind vorrangig für ihr Vorliegen in Phagozyten (*Nox2*) und Mesangialzellen (*Nox4*) bekannt (Bedard and Krause, 2007). In ausschließlich aus Darmepithelzellen gewonnenen Proben wäre eine Expression von *Nox2* und *Nox4* demnach nicht zu erwarten. Da es sich bei den Proben um ein Lysat aus komplettem Darmgewebe handelte, lag der Nachweis der beiden Noxe nicht außerhalb der Erwartungen. Im Expressionsmuster wiesen *Nox2* und *Nox4* keine signifikante Änderung der Expression im WT/*Duox2*^{IEC-KO}-Vergleich auf (Abbildung 3B,C). Auch zwischen den verschiedenen Darmabschnitten ergeben sich im Falle von *Nox2* und *Nox4* keine signifikanten Häufigkeitsunterschiede.

Duox1 zeigte im Cecum und Colon keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Duox2*^{IEC-KO}-Mäusen und dem ihren WT-Geschwistern (Abbildung 3D). Die *Duox1* Expression im Ileum hingegen war in den *Duox2*^{IEC-KO}-Mäusen leicht niedriger als in den WT-Mäusen (Abbildung 3D). *Duox1* war dabei nicht höher sondern niedriger exprimiert. Bei der Veränderung handelte es sich also nicht um eine kompensatorische Hochregulation von *Duox1* als Reaktion auf die *Duox2*-Defizienz. Vielmehr war ein paralleler Effekt zur Defizienz von *Duox2* zu beobachten. *Duox2* und *Duox1* weisen in ihrer Struktur eine Homologie von 83% auf (De Deken et al., 2000). Daher wäre es möglich gewesen, dass einer der Primer für *Duox1* an Genabschnitte von *Duox2* bindet. Dadurch wäre die parallele Veränderung der beiden Noxe zu erklären. Um dies auszuschließen, wurden die Primersequenzen der *Duox1*-Primer mit der Kodierungssequenz von *Duox2* verglichen. Daraus ergab sich, dass die Primer für *Duox1* zwar in ihren Startsequenzen komplementär zu *Duox2* waren, eine Amplifikation aufgrund fehlender Bindungsstellen aber nicht möglich war. Die verringerte Expression von *Duox1* im Ileum der *Duox2*^{IEC-KO}-Mäuse war also nicht auf eine Bindung eines *Duox1*-Primers an *Duox2* zurückzuführen. Ob diese Veränderung funktionelle Bedeutung hat, wurde nicht untersucht.

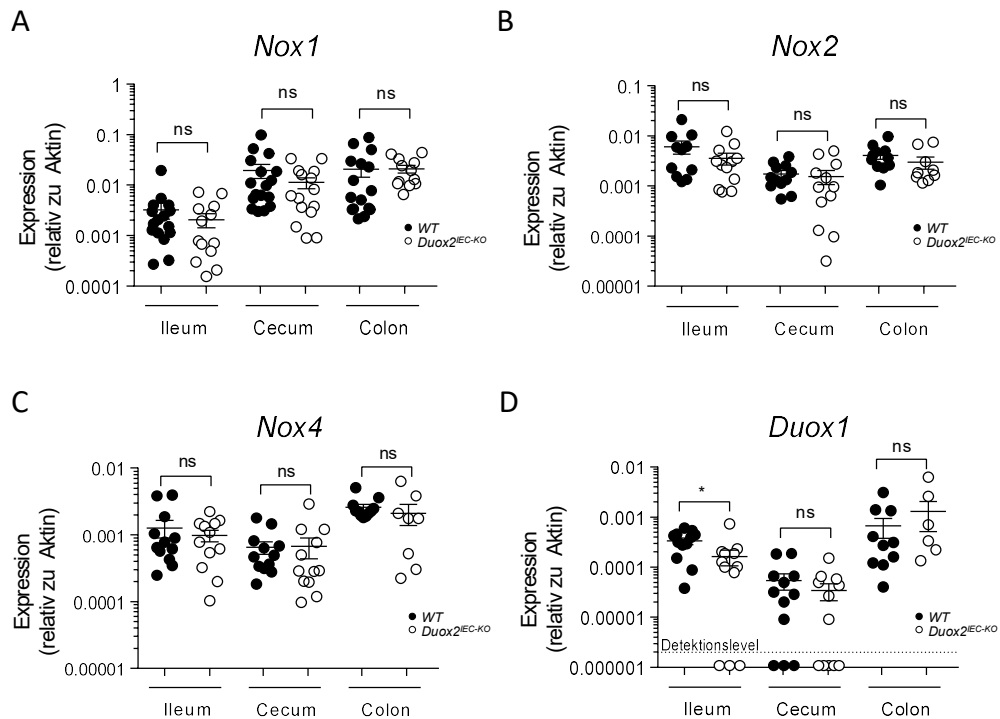


Abbildung 3 Genexpression der Nox-Isoformen

Gewebe von Ileum, Cecum und Colon aus WT und *Duox2*^{IEC-KO}-Mäusen wurde lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden mittels RT-qPCR die Expressionslevel von *Nox1* (A), *Nox2* (B), *Nox4* (C) und *Duox1* (D) bestimmt und in Relation zu Aktin gesetzt.

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

Die Hypothese, eine Defizienz für *Duox2* könnte zu einer kompensatorischen Hochregulation einer der anderen Nox-Isoformen führen, ließ sich durch die beschriebenen Experimente nicht bestätigen. Das bedeutet, dass eine Defizienz für *Duox2* in intestinalen Epithelzellen funktionell zumindest nicht ohne Stimulus durch eine stärkere Expression einer anderen Nox-Isoform kompensiert wird.

4.1.3 *Duox2*^{IEC-KO} hat keinen Einfluss auf den strukturellen Aufbau des Darmgewebes

Die hohe Expression von *Duox2* im unteren Gastrointestinaltrakt suggeriert eine wichtige Rolle des Enzyms im Darm. Eine Defizienz von Darmepithelzellen hatte für *Duox2* keine kompensatorische Hochregulation der anderen Nox-Isoformen zur Folge. Dadurch könnte es durch die fehlende Kompensation der *Duox2*-Defizienz zu funktionalen Veränderungen kommen. Es stellte sich daher die Frage, ob eine Defizienz in Darmepithelzellen von *Duox2*

Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des umliegenden Gewebes hat. Um dies zu überprüfen, wurden Duox2^{IEC-KO}-Mäuse und ihre WT-Geschwister zunächst auf makroskopischer und später auf mikroskopischer Ebene auf strukturelle Veränderungen hin untersucht.

Als Parameter einer generellen makroskopischen Veränderung wurden die Länge der jeweiligen Darmabschnitte und das Gewicht des Gewebes analysiert. Die Menge des Darminhaltes diente als Maß für die Funktionalität der Verdauung.

Der Anatomie von oral nach aboral folgend, wurde zunächst das Ileum genauer betrachtet. In der Länge des Ileums zeigte sich keine Veränderung (Abbildung 4A). Auch das Gewicht des Ileums der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse wies keinen Unterschied zu dem Gewicht des Ileums der WT-Mäuse auf (Abbildung 4B).

Ähnliches galt für das Colon. Sowohl die Länge (Abbildung 4C) als auch das Gewebegewicht des Colons (Abbildung 4D) blieben in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen unverändert im Vergleich zu den WT-Mäusen. Zusätzlich wurde das Gewicht des Coloninhaltes bestimmt. Dabei ließ sich, kein signifikanter Unterschied feststellen (Abbildung 4E).

Im Cecum zeigte sich keine Änderung in Länge (Abbildung 4F) und Gewebegewicht bei den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen (Abbildung 4G). Der Inhalt des Cecums der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse hingegen war leicht schwerer verglichen mit dem der WT-Mäuse (Abbildung 4 H).

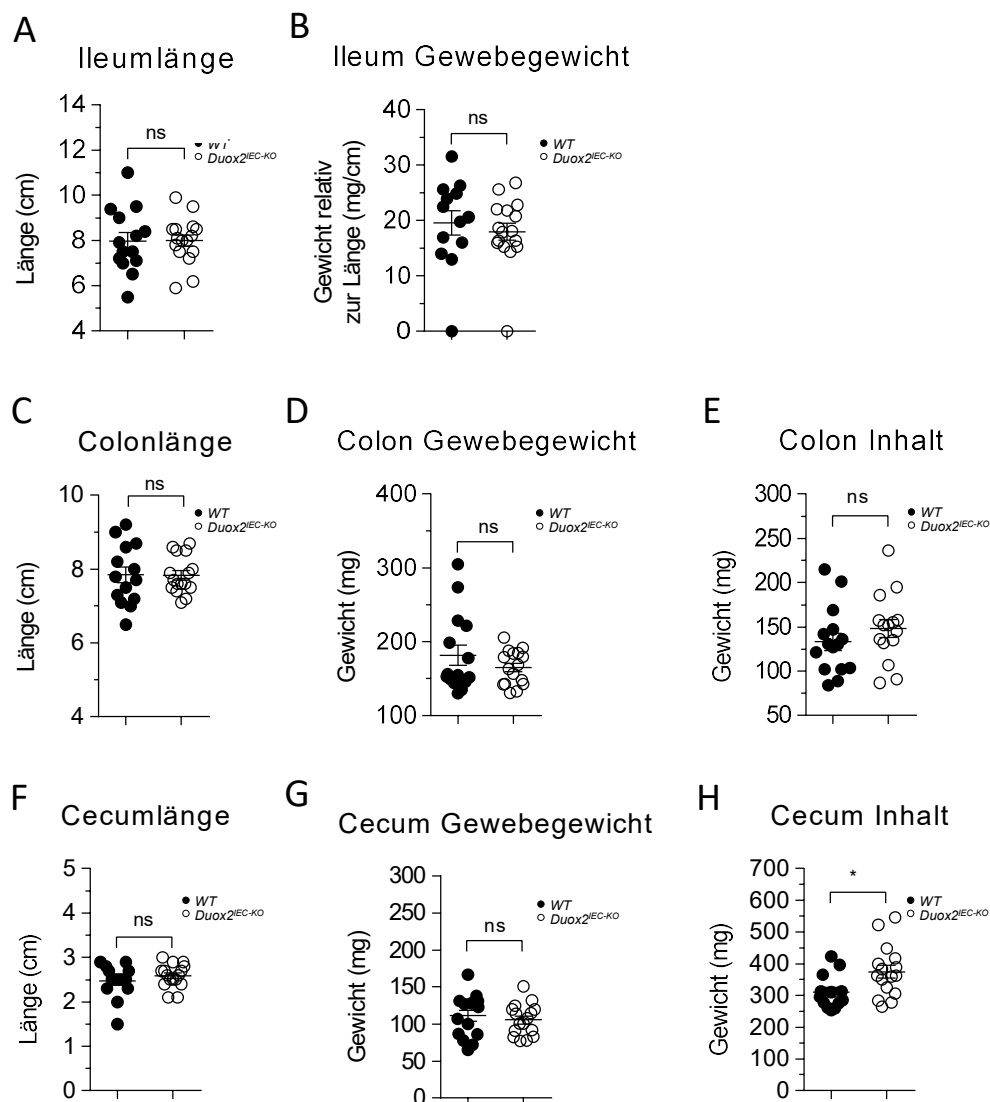


Abbildung 4. Makroskopische Analyse von Duox2^{IEC-KO}-Mäusen auf strukturelle Veränderungen des Darms

Nach Messung des Mausgewichtes wurden WT- und Duox^{IEC-KO}-Mäusen Ileum, Cecum und Colon entnommen. Für das Ileum wurde die Länge (B) und das Gewicht des Gewebes (C) und für Cecum und Colon je Länge (D,G), das Gewicht des Gewebes (E,H) sowie das Gewicht des Inhaltes (F,I) bestimmt.

n.s., nicht signifikant; *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001

Als nächstes wurde der strukturelle Aufbau mikroskopisch genauer untersucht.

Dazu wurden histologische Schnitte angefertigt und mittels PAS-Reaktion eingefärbt. In den Schnittbildern waren Zellkerne und -grenzen als dunkelblau-violette Strukturen erkennbar, während Mucin und damit Becher- und Paneth-Zellen in magentaroter Farbe auftraten. Die Evaluation der einzelnen Histologieschnitte erfolgte nach einem festgelegten Schema (s. Methoden 3.2.2). Rein optisch war weder im Ileum noch im Cecum oder im Colon ein Unterschied in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erkennbar

(Abbildung 5A). Um dies genauer zu evaluieren, erfolgte anhand der Schnittbilder eine Längenbestimmung der Krypten. Da das Ileum neben Krypten zusätzlich Zotten aufweist, wurden sowohl Zotten als auch Krypten in ihrer Länge bestimmt. Die Kryptenlänge (Abbildung 5B) und die Zottenlänge (Abbildung 5C) zeigten keine Veränderung im Ileum der *Duox*^{IEC-KO} Mäuse. Im Cecum (Abbildung 5D) und im Colon (Abbildung 5E) blieb die Länge der Krypten unverändert.

Die Regulierung der Epithelerneuerung im Darm erfolgt Nox1-ROS-abhängig (Perez et al., 2017). Bei vermindertem Vorliegen von *Duox2* bestünde demzufolge die Möglichkeit, dass die Zellproliferation beeinflusst wird.

Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Epithelzellen pro Zotte bzw. Krypte bestimmt. Im Ileum blieb auf den Zotten (Abbildung 5F) und in den Krypten (Abbildung 5G) des *Duox2*-defizienten Epithels die Zellzahl unverändert. Im Cecum (Abbildung 5H) und im Colon (Abbildung 5I) war die Streuung etwas größer. Es zeigte sich keine Veränderung in der Anzahl der Epithelzellen.

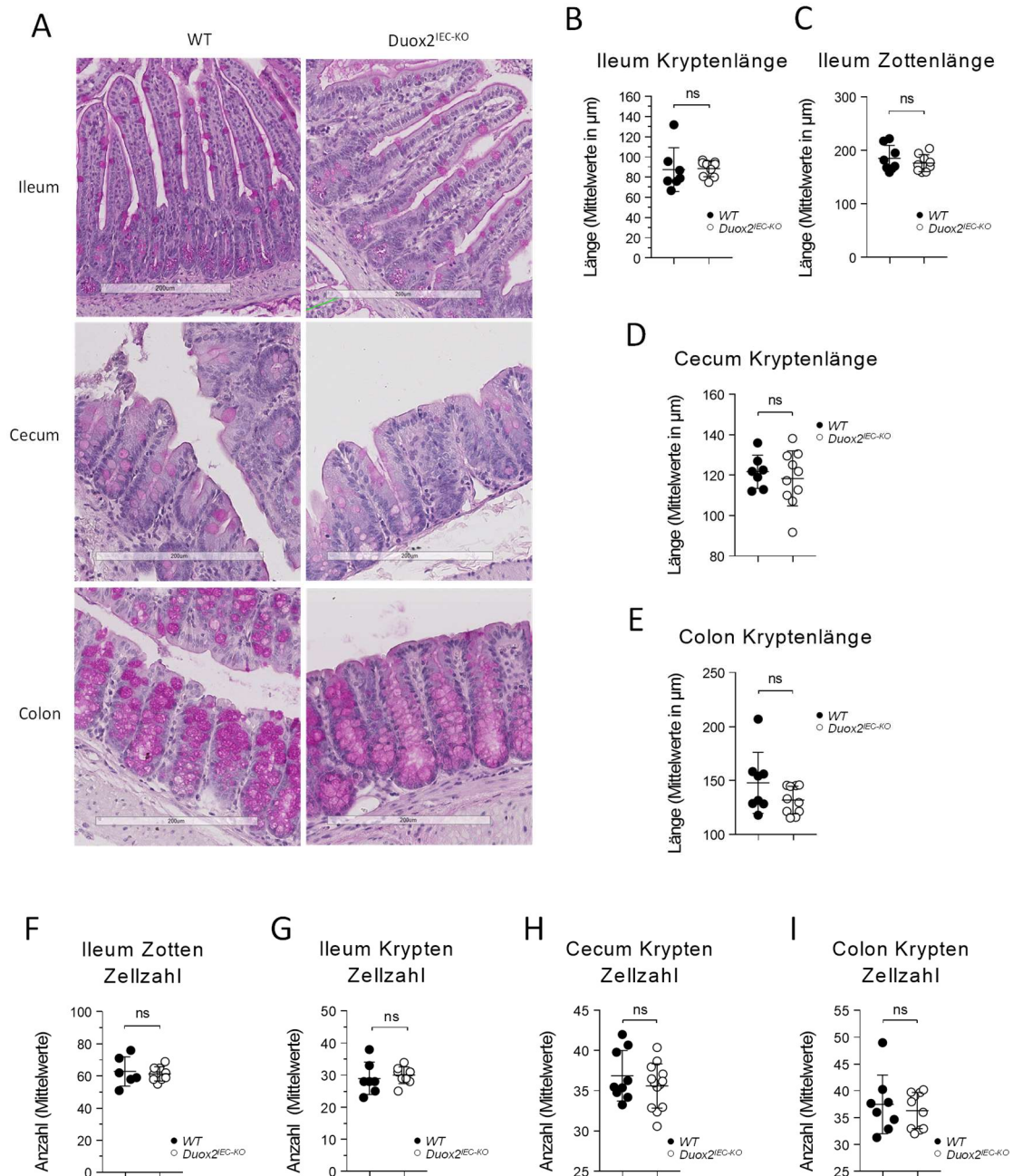


Abbildung 5 Mikroskopische Analyse von Duox2^{IEC-KO}-Mäusen auf strukturelle Veränderungen des Darms

Es wurden Histologieschnitte von Ileum, Cecum und Colon angefertigt und mittels PAS-Reaktion angefärbt (A). Anschließend wurde anhand der Schnittbilder die Länge der Zotten im Ileum (B) sowie die Länge der Krypten im Ileum (C), Cecum (D) und Colon (E) bestimmt. An den Zotten des Ileums (F) und in den Krypten des Ileums (G), des Cecums (H) und des Colons (I) wurden die Epithelzellen gezählt und deren Mittelwerte errechnet.

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Duox2 keinen Einfluss auf den untersuchten strukturellen Aufbau von Ileum, Cecum oder Colon hatte. Weder makroskopische noch mikroskopische Parameter gaben dafür einen Anhaltspunkt. Das Gewicht des Gewebes,

Krypten- und Zottenlänge sowie die Anzahl der Epithelzellen waren unverändert. Ein Einfluss der *Duox2*-Defizienz auf die Zellproliferation ist daher unwahrscheinlich. Die zuvor beschriebene *Duox1*-Runterregulation hatte in diesem Fall keine sichtbare Veränderung der Epithelerneuerung zur Folge. Allerdings deutete der vermehrte Cecum-Inhalt auf funktionelle Auswirkungen mit möglicher verminderter Darmmobilität hin.

4.1.4 Die Auswirkung des *Duox2*^{IEC-KO} auf ausgewählte Entzündungsparameter

Es ist bekannt, dass eine Hochregulierung von *Duox2* mit ulzerativer Colitis assoziiert ist (Yanai et al., 2015). Daher stellte sich die Frage, welche Folge die Abwesenheit von *Duox2* auf das Darmepithel und das Entzündungsgeschehen im Darm hat. Bei einer verstärkten mechanischen oder humoralen Beanspruchung, beispielsweise im Rahmen einer Entzündung, würde sich eine Hyperplasie des Epithels zeigen (Eckmann, 2006). Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Morphologie des Epithels auf entzündungsspezifische Veränderungen des Gewebes untersucht.

Erster untersuchter Aspekt war das Körpergewicht der Mäuse. Im Rahmen einer Entzündung geht es oft zurück und wird als allgemeiner Parameter für das Wohlbefinden des jeweiligen Versuchstieres genutzt. Das Körpergewicht war bei den *Duox2*^{IEC-KO}-Mäusen nicht signifikant verändert (Abbildung 6A). Weiterhin bot sich unter der Annahme eines inflammatorischen Geschehens die Betrachtung der lymphatischen Organe an, die als lokales Reservoir für einen Großteil der Immunzellen fungieren. Im Zuge dessen wurden jeweils die mesenterialen Lymphknoten (mLN) und die Milz freipräpariert, entnommen und gewogen. Im Falle einer Entzündungsreaktion wäre eine Gewichtszunahme der mLN und der Milz durch Immunzellmigration und -proliferation, sowie gesteigertem Lymphfluss zu erwarten (Bronte and Pittet, 2013). Die Milz blieb auf ihr Gewicht bezogen unverändert (Abbildung 6B). Das Gewicht der mLN war in den *Duox2*^{IEC-KO}-Mäusen vermindert (Abbildung 6C). Die Ergebnisse wiesen nicht auf eine akute Immunantwort oder generalisierte Entzündung hin. Gegenteilig wies das verringerte mLN-Gewicht auf eine geringere Aktivität und Proliferation der Immunzellen hin.

Die Möglichkeit, dass eine lokale subklinische Entzündung in dem betroffenen Darmgewebe vorliegen könnte, blieb bestehen. Um dem nachzugehen, wurden von den entnommenen Darmabschnitten histologische Präparate angefertigt und mittels PAS-Reaktion eingefärbt.

Der Fokus lag hierbei auf Veränderungen der Mucosa-Architektur und dem möglichen Vorliegen von Immunzell-Infiltraten.

Einer der Parameter, der zur Beurteilung der Mucosa-Architektur diene, ist die Zotten- bzw. Kryptenlänge. Im Falle einer Entzündungsreaktion wäre eine Verlängerung und Aufzweigung der Krypten bzw. Abnutzung und damit Verkürzung der Zotten zu erwarten. Gleichzeitig dienten Zotten- und Kryptenlänge als stellvertretendes Maß für die Dicke der Mucosa-Schicht der Darmwand. Diese würde sich im Rahmen einer Entzündung durch Einwanderung von Immunzellen und Einlagerung von Flüssigkeit verdickt darstellen. Wie bereits im vorigen Kapitel festgestellt (4.1.3), zeigte sich weder im Ileum noch im Cecum oder im Colon ein Unterschied in Zotten- oder Kryptenlänge im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse (Abbildung 5B, C, E, G).

Im Ileum waren weder im Epithel noch in Mucosa und Submucosa der Präparate der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse vermehrt Immunzellen zu entdecken (Abbildung 6D). Auch im Gewebe des Cecums (Abbildung 6E) und des Colons (Abbildung 6F) gab es keine vermehrten Infiltrationen von Immunzellen.

Neben den Leukozyten als klassischen Immunzellen tragen Paneth-Zellen wesentlich zur bakteriellen Immunabwehr bei (Vaishnava et al., 2008). Diese am Boden der Krypten des Ileums sitzenden Zellen enthalten mit antimikrobiellen Proteinen gefüllte Granula und sind im Rahmen von entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn vermindert oder dysfunktional (Cadwell et al., 2008). Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Paneth-Zellen mit untersucht. Sie waren unverändert im Duox2-defizienten Epithel aufzufinden (Abbildung 6G).

Eine dritte Ebene zur Prüfung eines entzündlichen Geschehens erfolgte mittels RT-qPCR.

Eine der von den Paneth-Zellen sezernierten antimikrobiellen Substanzen in Mäusen ist Reg3γ, ein antimikrobielles C-Lectin, das bakterizid gegen grampositive Bakterien wirkt (Bevins and Salzman, 2011). Trotz unveränderter Paneth-Zellen-Zahl, wurde ihre Häufigkeit anhand der Reg3γ Expression mittels qRT-PCR auf einer zweiten Ebene untersucht. Weiterhin stand Reg3γ stellvertretend für die Gesamtheit der antimikrobiellen Peptide im Darm. Dabei ließ sich feststellen, dass im Ileum, sowie im Cecum die Expression von Reg3γ im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse unverändert war. Im Colon lag im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse eine signifikant geringere Expression als im Colongewebe der WT-Mäuse vor.

Als Hauptproduzent von Stickstoffmonoxid (NO) spielt die iNos in der Immunantwort eine entscheidende Rolle und gilt deswegen nicht nur als Marker für bakterielle Infektionen, sondern wurde als wesentlicher Faktor bei chronischen Entzündungen identifiziert (Guzik et al., 2003). Daher wurde die Expression von iNos als weiterer, sensitiverer Entzündungsmarker verwendet, um die Ergebnisse der Auswertung der histologischen Schnittbilder zu prüfen. Eine

Erhöhung von *iNos* im Gewebe würde als Hinweis auf das Ablaufen einer Immunantwort und der damit einhergehenden Entzündung gewertet. Bei der Quantifizierung der *iNos* Expression mittels qRT-PCR im Gewebe von Cecum und Colon ergaben sich geringe Expressionslevel. Im Cecum war die Schwankung der Expression von *iNos* zu groß, um eine genaue Aussage über einen Unterschied zum Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse treffen zu können. Im Colon hingegen lag trotz des niedrigen Expressionslevels von *iNos* mit einem Faktor von Aktin von unter 0,02 eine signifikante Erniedrigung im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse vor (Abbildung 6I). Eindeutiger war die Veränderung im Ileum. Bei insgesamt höherem Expressionslevel ließ sich im Ileum eine verringerte Expression von *iNos* detektieren (Abbildung 6I).

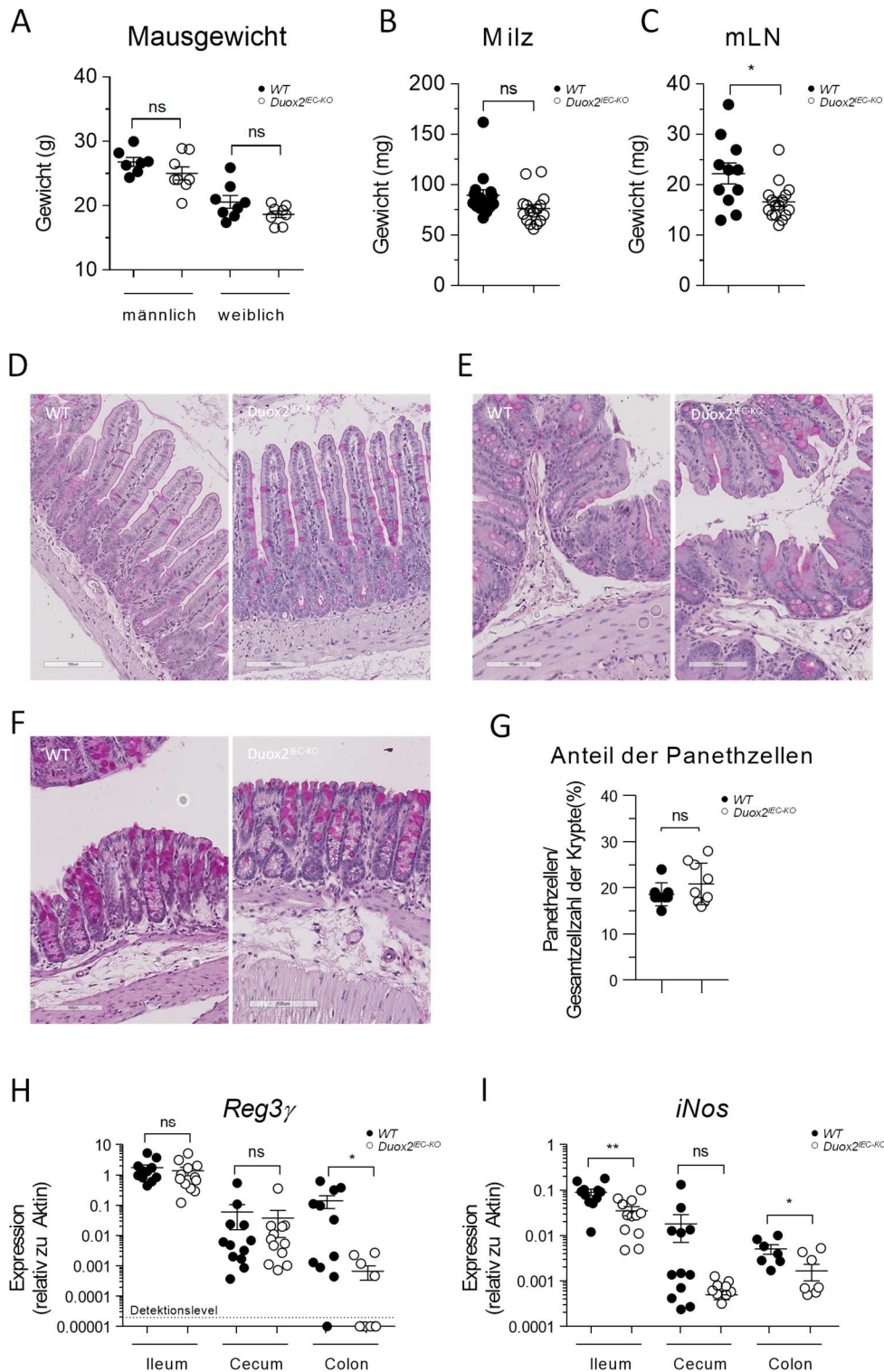


Abbildung 6 Entzündungsgeschehen im Darmgewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse

Nach Messung des Mausgewichtes (A) wurden WT- und Duox^{IEC-KO}-Mäusen Milz (B) und mLN (C) entnommen und gewogen. Es wurden histologische Schnitte von Ileum (D), Cecum (E) und Colon (F) angefertigt, mittels PAS-Reaktion gefärbt und auf Immunzellinfiltrate untersucht. Anschließend wurde die Zahl der Paneth-Zellen in den Krypten des Ileums als Anteil an der Gesamtzellzahl bestimmt (G). Das Expressionslevel von *Reg3γ* (H) und *iNOS* (I) wurde mittels RT-qPCR untersucht. n.s., nicht signifikant; *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001

Es ließen sich keine Anzeichen für eine chronische Entzündung in den unterschiedlichen Darmgewebsabschnitten detektieren. Jedoch fiel das verringerte Gewicht der mLN sowie eine verminderte Expression von Reg3γ im Colon und iNos in Ileum und Colon auf.

4.1.5 Duox2^{IEC-KO} hat einen Einfluss auf den Mucus im Darmtrakt

Bei der makroskopischen Analyse von Duox2^{IEC-KO}-Mäusen auf strukturelle Veränderungen des Darms war eine vermehrte Füllung des Cecums festgestellt worden. Dieser vermehrte Inhalt im Cecum lässt auf eine verlängerte Transitzeit der Nahrung schließen. Eine längere Transitzeit und damit potenziell verminderte Mobilität im Cecum und/oder Colon kann diverse Gründe haben. Als einer dieser Gründe wird eine verminderte Mucus-Produktion beschrieben (Mukai et al., 2020). Daher wurde die Mucus-Schicht und deren Produktion inspiziert.

Daher erwies es sich als sinnvoll, die Mucus-Schicht und deren Produktion zu untersuchen. Produzent des Mucus im gastrointestinalen Trakt sind Becherzellen (Pelaseyed et al., 2014), weswegen sie als erstes genauer betrachtet wurden. Hierfür wurden Gewebeschnitte angefertigt und durch eine PAS-Reaktion angefärbt.

Bei der Betrachtung der Histologie-Schnitte ließ sich mikroskopisch weder im Ileum noch im Cecum oder Colon ein Unterschied bezüglich der Häufigkeit der Becherzellen erkennen (Abbildung 7A). Die Berechnung des prozentualen Anteils der Becherzellen an der Gesamtzellzahl ergab, dass der Anteil der Becherzellen im Ileum und Cecum gleich blieb. Im Colon war er im Epithel der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse signifikant niedriger (Abbildung 7B).

Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte Mucus-Produktion hin. Mucus besteht neben Wasser aus hoch glykosylierten Glykoproteinen, Mucine genannt. Im Intestinaltrakt von Menschen und Mäusen handelt es sich hauptsächlich um Muc2, eines von mehreren gelformenden Mucinen (Karlsson et al., 1996). Im Folgenden wurde daher die Expression von *Muc2* mittels qRT-PCR untersucht. Die Expression von *Muc2* im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse war in allen drei Darmabschnitten unverändert (Abbildung 7C). Die Menge des Mucus war demzufolge nicht verändert. Allerdings basiert das funktionelle Gleichgewicht des Mucus nicht ausschließlich auf der Mucus-Produktion und Sekretion. Ebenso die anschließende Proteolyse der Bestandteile ist wichtig für die Funktionalität (Ambort et al., 2012). Diese erfolgt durch die Metalloprotease CLCA1. Sie wird von Becherzellen sezerniert und ist unter anderem für die Organisation des Mucus in zwei Schichten mitverantwortlich (Nystrom et al., 2018). Daher wurde *CLCA1* zusätzlich zu *Muc2* untersucht. Die Expression von *CLCA1* war sowohl im Ileum als auch im Cecum und im Colon vermindert war (Abbildung 7D).

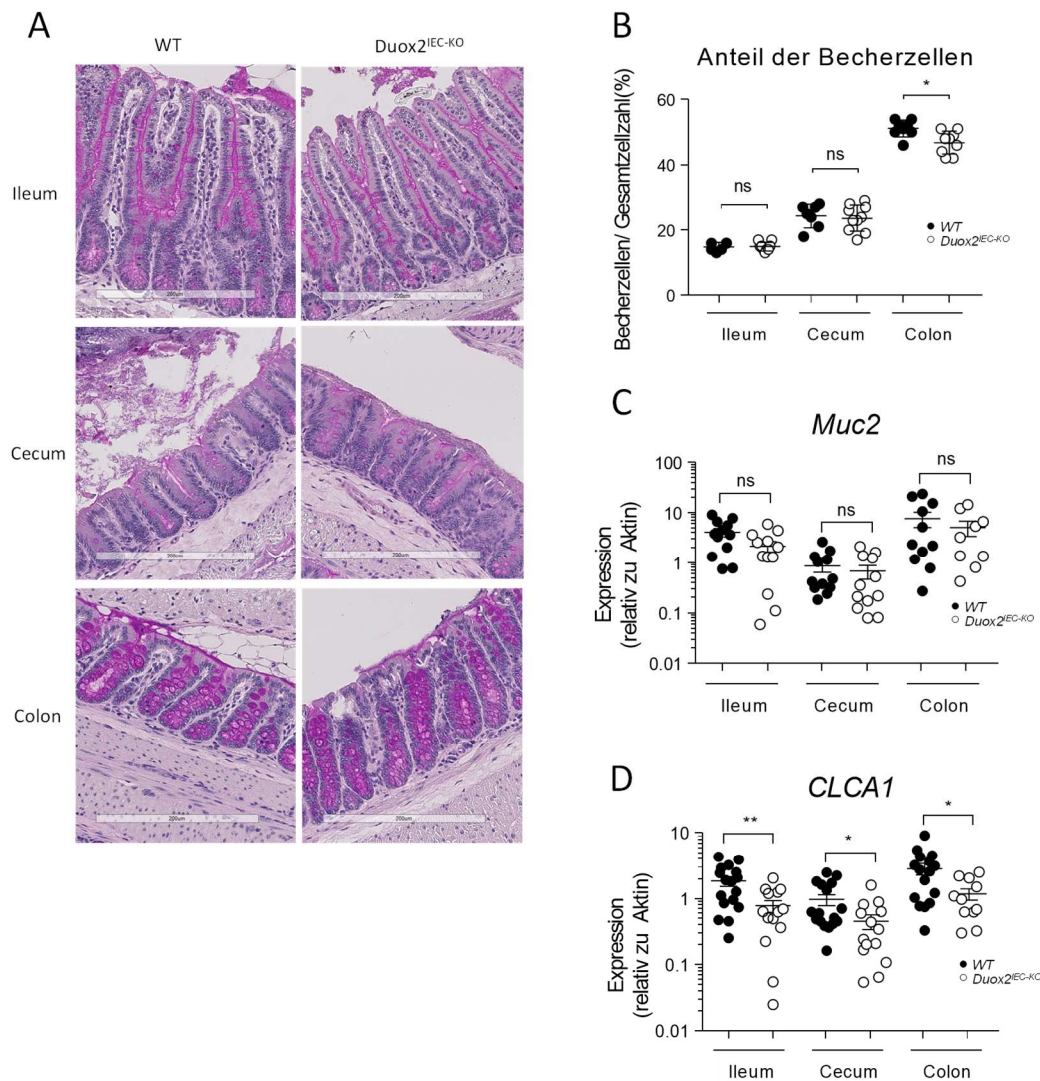


Abbildung 7 Mucosale Veränderungen im Darmepithel der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse

Es wurden histologische Schnitte von Ileum, Cecum und Colon angefertigt, mittels PAS-Reaktion gefärbt und anschließend die Becherzellen der Schnitte analysiert (A). Nach festgelegtem Protokoll (s.Methoden) erfolgte die Bestimmung des Anteils der Becherzellen an der Gesamtzellzahl (B). Mittels RT-qPCR wurden die Expressionslevel von *Muc2* (C) und *CLCA1* (D) untersucht.

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

Das prozentual verringerte Vorliegen von Becherzellen im Epithel des Colons der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse ließ sich nicht durch eine verringerte *Muc2*-Expression bestätigen. Allerdings war die verminderte Expression von *CLCA1* im Duox2-defizienten Gewebe auffällig und wirft Fragen nach der Struktur der Mucusschicht auf.

4.1.6 Die Zusammensetzung der Mikrobiota ändert sich durch die Duox2-Defizienz

Das Habitat der Mikrobiota im Darm ist der Mucus (Harel et al., 1993). Sie befinden sich in der lockereren, äußeren Mucus-Schicht (Johansson et al., 2008). Eine veränderte Struktur oder Zusammensetzung dieser Schicht könnte die Diversität dieser im Mucus lebenden Organismen beeinflussen. Gerät die Bakterienlandschaft aus dem Gleichgewicht, wird das Dysbiose genannt. Eine derartige Dysbiose wiederum wird mit reduzierter Darmmobilität assoziiert (Chandrasekharan et al., 2019). Mit der Verminderung von *CLCA1* im Duox2-defizienten Epithel (Abbildung 7D), wurde sowohl die Zusammensetzung des Mucus verändert als auch potenziell die Motilität des Darmes herabgesetzt. Dies äußerte sich anhand des vermehrten Cecum-Inhaltes (4.1.3). Des Weiteren reguliert Duox2 das Zusammenspiel der Mucosa und intestinaler Mikrobiota. (Grasberger et al., 2015). Im Folgenden wurde daher die Zusammensetzung der Mikrobiota im Darminhalt der unter semisterilen Bedingungen gehaltenen Duox2^{IEC-KO}-Mäuse analysiert. Zur Untersuchung ausgewählter Vertreter wurde die jeweilige Expression in den Faeces durch qRT-PCR bestimmt und in Relation zu den Ergebnissen eines Primers für die insgesamt vorhandene 16s rDNA gesetzt.

Der größte Vertreter im murinen Darm ist der Stamm der *Firmicutes* (Rosshart et al., 2017). Eine Erniedrigung dieses Stammes wird allgemein mit IBD und insbesondere mit Colitis ulzerosa (CU) assoziiert (Chen et al., 2017). *Firmicutes* werden daher als protektiv bei entzündlichen Vorgängen im Darm angesehen. Ein vermehrtes Vorliegen von Duox2 wird mit IBD bzw. speziell mit VEOIBD in Verbindung gebracht (Hayes et al., 2015). Da sich *Firmicutes* und Duox2 dem Anschein nach gegensätzlich verhalten, ließe sich ein verändertes Vorkommen der *Firmicutes* in den Faeces der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse als Hinweis für eine mögliche Kompensation des Duox2-Defizits im Gewebe interpretieren. Es zeigte sich aber keine signifikante Veränderung der *Firmicutes* in den Faeces der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse (Abbildung 8A).

Zum Stamm der *Firmicutes* gehören die *Lactobacilli*. Ihr verringertes Vorliegen wird speziell mit dem Reizdarmsyndrom in Verbindung gebracht (Heeney et al., 2018) und sie werden häufig als Probiotika verwendet. So führt *Lactobacillus acidophilus* beispielsweise in Mäusen mit DSS-induzierter Colitis zu einer Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen (Park et al., 2018). Das Vorkommen der *Lactobacilli* präsentierte sich parallel zu der ihres übergeordneten Stammes (Abbildung 8B). In keinem der drei Darmabschnitte ergab sich ein signifikanter Unterschied.

Zweitgrößter Repräsentant der Domäne der Bakterien im murinen Darm ist der Stamm der *Bacteroidetes*. Ähnlich wie die *Firmicutes* sind sie erniedrigt bei Patient*innen mit IBD (Walters et al., 2014). Ebenfalls parallel zu den *Firmicutes* gab es in keinem der drei Darmabschnitte eine signifikante Veränderung im Vorkommen der *Bacteroidetes* in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen (Abbildung 8C).

Ein weiterer, eher in geringem Maße im murinen Darm vorkommender, Bakterienstamm sind die *Aktinobakterien* (Rosshart et al., 2017). Um die regelhaft vorkommenden Vertreter der murinen Darmflora zu komplettieren, wurde ihre Expression in den Faeces untersucht. Es ließen sich weder im Ileum noch im Cecum oder Colon signifikante Unterschiede feststellen (Abbildung 8D).

Aus dem Stamm der Proteobakterien wurde beispielhaft die der Klasse der *γProteobakterien* untersucht. Diese liegen anders als die zuvor analysierten Vertreter der Mikrobiota vermehrt bei IBD vor (Walters et al., 2014). Der Darminhalt des Ileums der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse wies unter großer Streuung keinen Unterschied im Vorkommen der *γProteobakterien* auf (Abbildung 8E). Im Cecum und im Colon der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse lagen die *γProteobakterien* im Vergleich zu dem Darminhalt der WT-Mäuser vermehrt vor. Der Unterschied erwies sich dabei im Cecum als hoch- und im Colon als signifikant (Abbildung 8E).

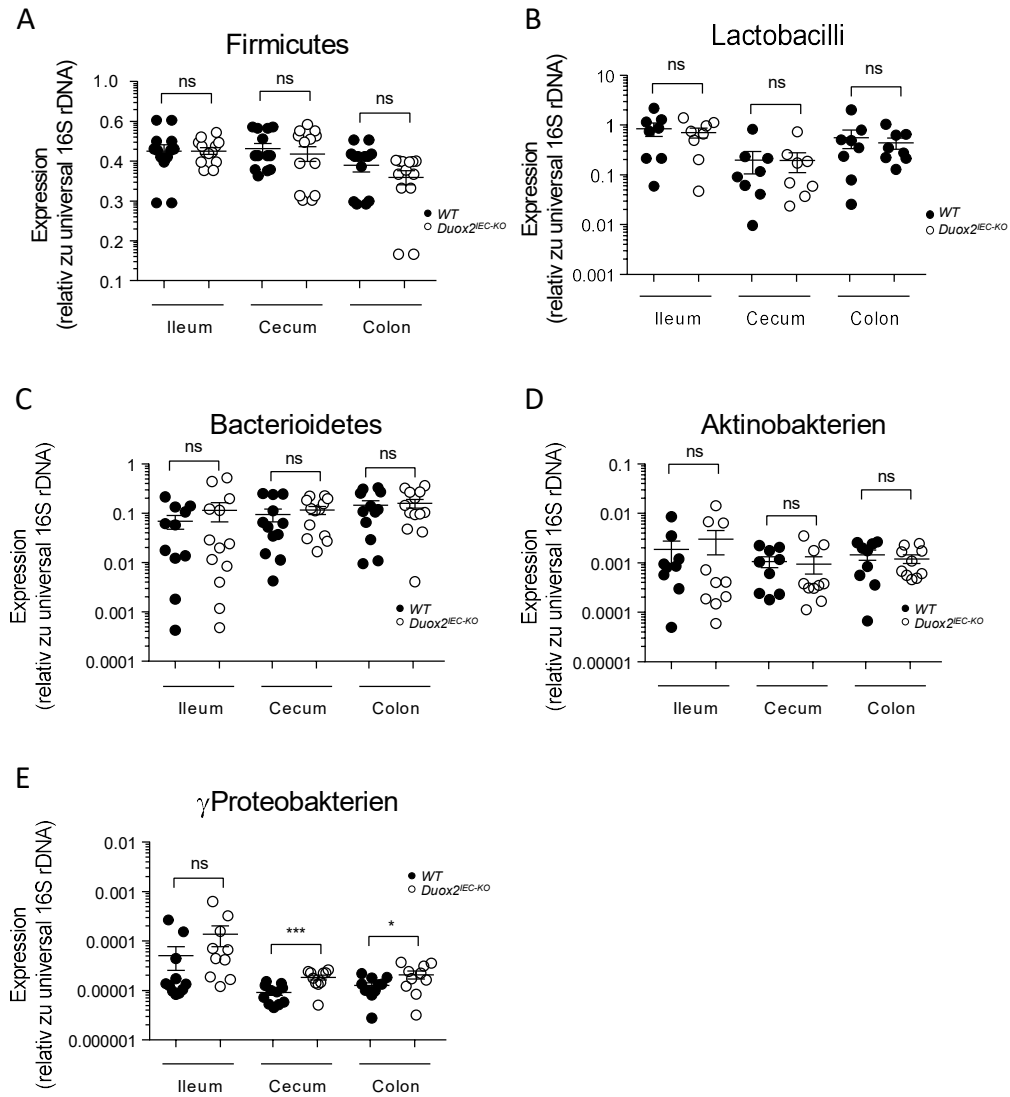


Abbildung 8 Vorkommen von Mikrobiota im Darminhalt

Darminhalt aus Ileum, Cecum und Colon von WT und Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wurde lysiert und die mikrobielle DNA isoliert. Anschließend wurden mittels RT-qPCR die Expressionslevel von *Firmicutes* (A), *Lactobacilli* (B), *Bacteroidetes* (C), *Aktinobakterien* (D) und γ *Proteobakterien* (E) bestimmt anhand der jeweiligen 16s rDNA, die in Bezug zur allgemein vorhandenen 16s rDNA gesetzt wurde.

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

Die Hauptvertreter der regelhaft im murinen Darm lebenden Mikrobiota zeigten sich unverändert in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen. Als einzige der untersuchten Bakterienklassen waren die *γProteobakterien* auffällig. Sie waren im Colon der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse signifikant und im Cecum hochsignifikant erhöht.

4.2 Die Rolle von Duox2 im Rahmen einer bakteriellen Infektion mit *C. rodentium*

4.2.1 Das Fehlen von Duox2 zieht keinen schwereren Verlauf der Infektion nach sich

Es ist bekannt, dass ROS wichtig für die antibakterielle Immunabwehr ist. (Nguyen et al., 2017) Die Duox2-Defizienz in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wurde nicht durch andere Nox-Isoformen kompensiert (s. 4.1.2). Eine geringere Produktion von ROS kann damit einhergehen. Dies hätte eine ineffektivere Immunantwort zur Folge (Panday et al., 2015). Dadurch stellt sich die Frage, ob eine bakterielle Infektion der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse eine stärkere Immunreaktion nach sich zieht.

Dabei wird nicht allein eine verringerte Produktion von ROS mit einer schwächeren Immunabwehr in Verbindung gebracht. Zusätzlich bildet die intestinale Mucusschicht die erste Verteidigungslinie gegen pathogene Darmbakterien (Johansson et al., 2008). Die im ersten Teil gezeigte Veränderung der Mucus-Zusammensetzung (s. 4.1.5), stützt mit der potenziell verminderten ROS-Produktion durch die Duox2-Defizienz die Hypothese, eine bakterielle Infektion könnte unter Duox2-Defizienz fulminanter ablaufen.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Infektion mit dem pathogenen Darmbakterium *C. rodentium* durchgeführt. Die Stärke der Immunreaktion und der damit verbundene Allgemeinzustand der Tiere wurde im Folgenden auf drei verschiedenen Ebenen untersucht. Ähnlich wie im Rahmen einer Entzündungsreaktion lymphatische Organe unter Umständen an Gewicht zulegen, kann sich auch das Gesamtgewicht der Maus im Zuge einer Besiedelung des Darmes mit pathogenen Erregern verändern. Dabei gilt: Je schlechter es der Maus geht, desto weiter sinkt ihr Gewicht. Dass diese Reduktion des Mausgewichts in der Regel parallel zur Verschlechterung des Allgemeinzustandes stattfindet, lässt sich dieser Wert optimal als Monitoring des Krankheitsverlaufs nutzen.

Demnach wurde der Gewichtsverlauf als Monitoring des Krankheitsverlaufs eingesetzt. Es erfolgte dafür eine tägliche Gewichtskontrolle der Versuchstiere, die graphisch als Verlaufskurve festgehalten wurde (Abbildung 9A). Es ließ sich feststellen, dass das Gewicht der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse im Schnitt innerhalb der ersten 2 Tage zunahm, während das der WT-Mäuse absank. Doch aufgrund der Fehlerbalkengröße und der fehlenden Signifikanz ist dieser ohnehin kleine Unterschied von rund 3% zu vernachlässigen.

Dies bestätigt die Analyse der Konsistenz der Faeces. Da es sich bei *C. rodentium* um einen Durchfallerreger handelt, ließ sich die Schwere der Diarrhoe als weitere Maßeinheit für das Wohlbefinden der Mäuse, bzw. die Schwere der Infektion verwenden. Um das Ausmaß der Diarrhoe zu objektivieren, wurde der Wassergehalt in den Faeces der Mäuse an Tag 0,1,3,7 und 10 nach Infektion bestimmt. Insgesamt wich die Kurve der Diarrhoe-Verläufe nicht signifikant voneinander ab. Anfangs- sowie Endpunkt erwiesen sich als nahezu deckungsgleich (Abbildung 9B).

Die dritte Ebene zur Überprüfung der Stärke der Immunreaktion war die Bestimmung der CFU in den Faeces der Mäuse. Ab dem 2. Tag nach Infektion lag die CFU in den Faeces der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse im Durchschnitt leicht unter der der WT-Mäuse, ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht (Abbildung 9C).

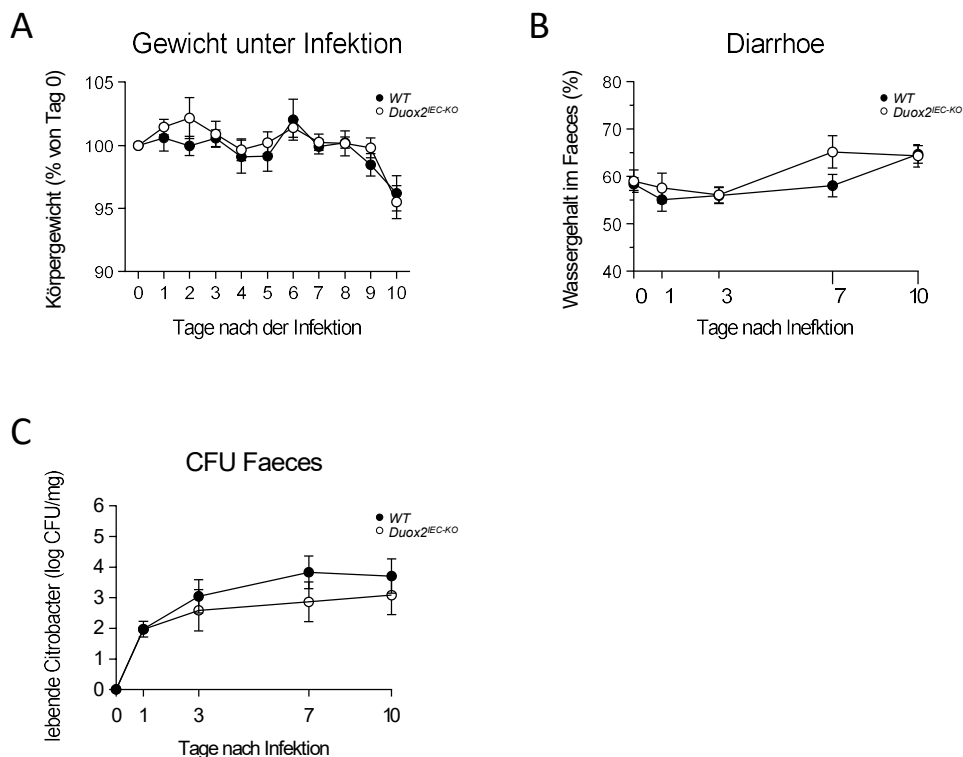


Abbildung 9 Monitoring der Schwere des Infektionsverlaufs der Duox2^{IEC}-Mäuse

Nach oraler Infektion mit *C. rodentium* wurde täglich das Gewicht der Mäuse festgehalten (A). An Tag 0,3,7 und 10 wurde der Faeces abgesammelt und auf den Wassergehalt (B) und die CFU (C) hin untersucht.

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

Der Übersichtlichkeit halber wurde, wenn sich keine signifikanten Unterschiede ergaben, das Ergebnis des statistischen Tests nicht explizit angegeben.

Die Duox2^{IEC-KO}-Mäuse befanden sich nach einer Infektion mit *C. rodentium* nicht in einem schlechteren Allgemeinzustand als ihre WT-Geschwister. Allein der Bakteriengehalt in den Faeces wies in Richtung eines möglichen Unterschieds. Allerdings war die Bakteriendichte anders als erwartet in den Faeces der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse geringer.

4.2.2 Duox2-Defizienz führt nicht zu einer verstärkten Gewebsreaktion nach Infektion mit *C. rodentium*

Um zu untersuchen, ob die Infektion mit *C. rodentium* zu stärkeren Gewebeveränderungen in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen führt, wurden Cecum und Colon am 10. Tag der Infektion wie im naiven Setting sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch analysiert.

Da es sich bei *C. rodentium* um ein Pathogen handelt, das im Rahmen der Durchfallerkrankung Gewebsreaktionen hauptsächlich im Dickdarm verursacht (Luperchio and Schauer, 2001), wurde das Ileum nicht mit in die Untersuchungen eingeschlossen.

Die Länge der einzelnen Gewebeabschnitte diente als Parameter einer generellen Gewebsveränderung. Da es zusätzlich im Rahmen einer entzündlichen Reaktion zur Verdickung und Verkürzung des Darmgewebes kommen kann, wurde die Länge der Darmabschnitte nach der Infektion mit *C. rodentium* bestimmt. Im Colon und im Cecum zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse und den WT-Mäusen (Abbildung 10A, B). Der Darminhalt, der vor Infektion im Cecum der Duox2^{IEC-KO}-Mäusen erhöht war (4.1.3) war nach Infektion bei den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und ihren WT-Geschwistern trotz erheblicher Streuung gleich (Abbildung 10C, D). Gleiches galt für das Gewebegewicht des Colons (Abbildung 10F). Einzig beim Gewebegewicht des Cecums ließ sich in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen nach Infektion eine abnehmende Tendenz erkennen (Abbildung 10G). Ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht.

Ebenso wie die makroskopische Ebene, war die mikroskopische Ebene anhand naiver Mäuse bereits untersucht und mittels eines histomorphologischen Schemas analysiert worden (siehe Abschnitt 4.1.3). Ohne Infektion hatte sich kein Anhalt für einen gravierenden strukturellen Unterschied ergeben. Die zuvor beschriebenen makroskopischen Analyseparameter deuteten nach Infektion mit *C. rodentium* nicht in die Richtung einer Veränderung des Duox2-defizienten Epithels. Daher wurde darauf verzichtet, eine quantitative Auswertung der Histomorphologie zu erstellen. Es wurden stattdessen einige repräsentative Histologieschnitte angefertigt und mittel PAS-Reaktion eingefärbt.

Es stellte sich weder im Colon noch im Cecum eine optisch wahrnehmbare strukturelle Veränderung im Duox2-defizienten Epithel dar (Abbildung 10H).

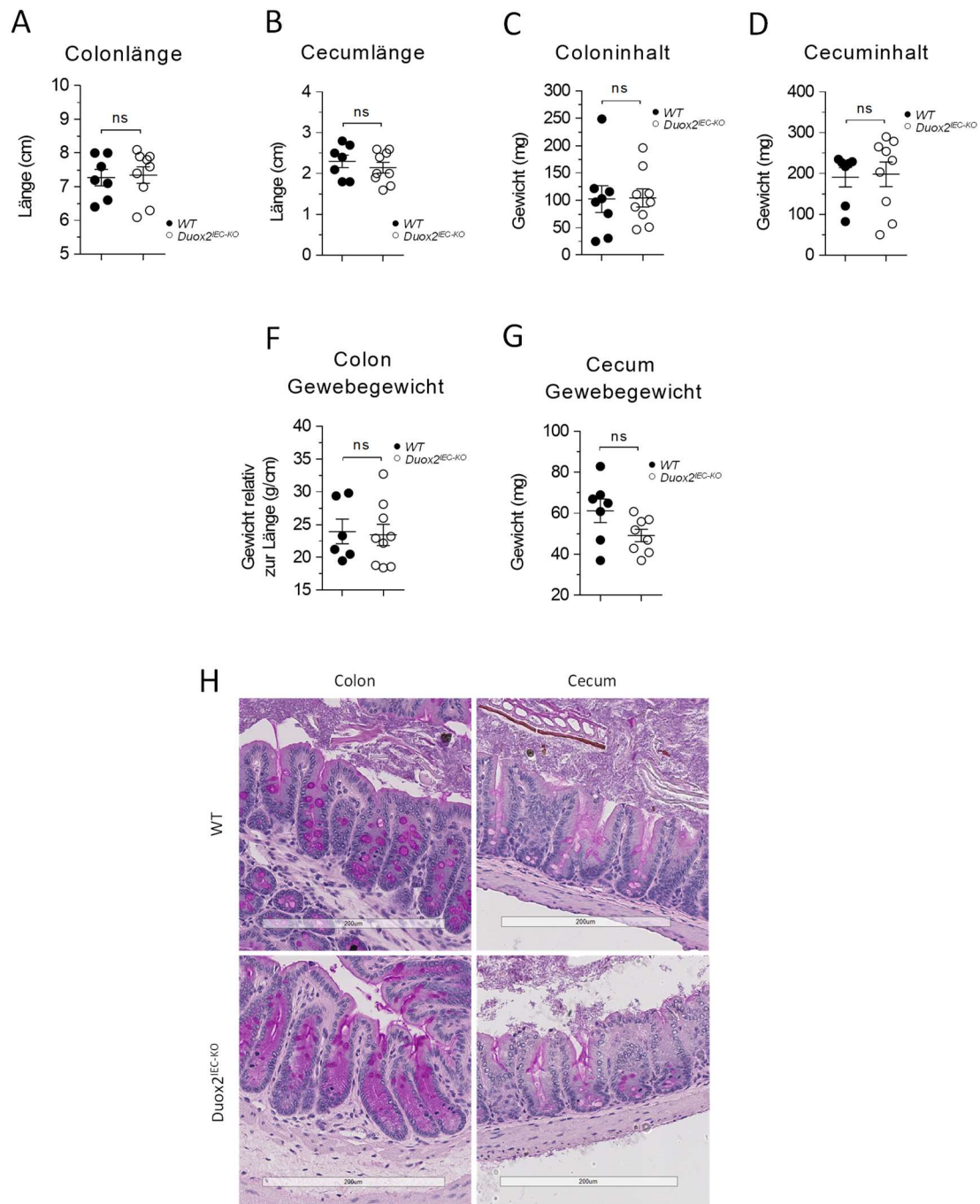


Abbildung 10 Analyse der Veränderungen im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse nach Infektion mit *C. rodentium*

Den mit *C. rodentium* infizierten WT- und Duox^{IEC-KO}-Mäusen wurden Cecum und Colon entnommen. Es wurden je die Länge (A, B), das Gewicht des Inhaltes (C, D) sowie das Gewicht des Gewebes (F, G) bestimmt. Zusätzlich wurden Histologieschnitte von Cecum und Colon angefertigt und mittels PAS-Reaktion angefärbt (H).

n.s., nicht signifikant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$

Weder in der Länge der Gewebsstücke noch in dem Gewicht ihres Inhalts oder Optik ihres Epithels ergab sich ein Unterschied zwischen den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und ihren WT-Geschwistern. Die Hypothese, die angedeutete geringere Bakterienausscheidung der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse könnte mit einer stärkeren Gewebsreaktion einhergehen, hat sich nicht bestätigt. Alle Ergebnisse wiesen eine große Streuung auf.

4.2.3 Die Duox2-Defizienz führt nicht zu einer schwächeren Bakterienabwehr

Trotz fehlender Unterschiede in der Gewebsreaktion zwischen den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und ihren WT-Geschwistern stellte sich die Frage, ob die bakteriellen Pathogene sich in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen schneller ausbreiten könnten, ohne dabei eine stärkere Reaktion des umliegenden Gewebes hervorzurufen. Um diese Frage zu erforschen, wurde dem Infektionsweg von *C. rodentium* vom Darmlumen hin zum Körperinneren, nachgegangen. Daher lag der Fokus der Untersuchungen zunächst auf dem Darminhalt. Anschließend wurden die Darmwand und das Lymph- und Blutsystem als dem Darm direkt nachgeschaltete Organe genauer untersucht.

Die Untersuchung des Darminhaltes, bestand in der Bestimmung der Anzahl der lebensfähigen Bakterien. Die Streuung der Bakteriendichte war sowohl im Cecum als auch im Colon mit einer Schwankung zwischen log10 von <1 und log10 von 6 CFU/mg Darminhalt sehr groß. Das hatte zur Folge, dass die Mittelwerte jeweils für die Duox2^{IEC-KO}-Mäuse niedriger waren, sich aber kein signifikanter Unterschied ergab (Abbildung 11A, B).

Ähnlich verhielt es sich mit der Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der Darmwand. Besonders im Cecumgewebe waren die Ergebnisse breit gestreut (Abbildung 11C). Im Colongewebe zeigte sich eine umgekehrte Tendenz zu der des Cecumgewebes (Abbildung 11D). Im Colon war die CFU im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäusen im Ansatz höher, bei fehlender Signifikanz.

Als dem Darm nachgeschaltete Organe wurden die mLN und die Leber sowie die Milz vorerst metrisch auf Veränderungen überprüft und später die lebensfähigen Bakterien im Gewebe bestimmt. Was das Gewicht der Organe betraf, war weder in Bezug auf die mLN (Abbildung 11E) noch die Leber (Abbildung 11F) oder die Milz (Abbildung 11G) ein Unterschied der aus den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen stammenden Organen im Vergleich zu denen der WT-Geschwister auszumachen.

Die CFU in Milz, mLN und Leber zeigte sich insgesamt niedrig. Sowohl bei den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen als auch bei ihren WT-Geschwistern lag sie häufig bei 0 (Abbildung 11H, I, J) und die Mittelwerte der CFU in der Milz lagen für die Duox2^{IEC-KO}-Mäuse auf dem gleichen Level wie die ihrer WT-Geschwister (Abbildung 11H). In mLN und Leber hingegen war eine leichte Tendenz in Richtung einer höheren bakteriellen Besiedelung der Organe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse erkennbar (Abbildung 11I, J).

Auf die Rolle von iNos als Marker für Entzündungsprozesse wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (siehe Abschnitt 0). Aus diesem Grund wurde an Tag 10 (d10) der Infektion mit *C. rodentium* die Höhe des Expressionslevels von iNos in Ileum, Cecum und Colon mittels RT-qPCR bestimmt.

Weder im Ileum noch im Cecum oder Colon zeigte sich ein Unterschied zwischen den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und den WT-Mäusen (Abbildung 11K). Die Streuung der Expression von *iNos* im Cecum und Colon war sehr groß. (Faktor von 250 relativ zu Aktin, im Colon der WT-Mäuse bis hin zu ca. Faktor 1500 im Cecum der WT-Mäuse) Dies macht eine Einordnung der Ergebnisse schwierig.

Im Ileum präsentierte sich die Streuung geringer (Abbildung 11K). Es ließ sich eine Tendenz einer geringeren Expression von *iNos* im Duox2-defizienten Epithel erkennen. Damit zeichnet sich eine Parallele zu der Untersuchung von *iNos* vor der Infektion ab, wo bei den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen die Expression von *iNos* im Ileum sowie im Colon erniedrigt war (Abbildung 6H). Während naiv die einzelnen Werte der Expressionslevel von *iNos* im Ileum mehrheitlich < 0,1 relativ zu Aktin lagen (Abbildung 6H), lagen sie nach der Infektion mit *C. rodentium* mehrheitlich >0,1 relativ zu Aktin. Insgesamt wurde demnach die Expression von *iNos* nach Infektion mit *C. rodentium* erhöht.

Auch bei der Untersuchung von *Reg3γ* mittels qPCR ergab sich in keinem der Darmabschnitte ein Unterschied in der Expression zwischen dem Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse und dem ihrer WT-Geschwister (Abbildung 11L).

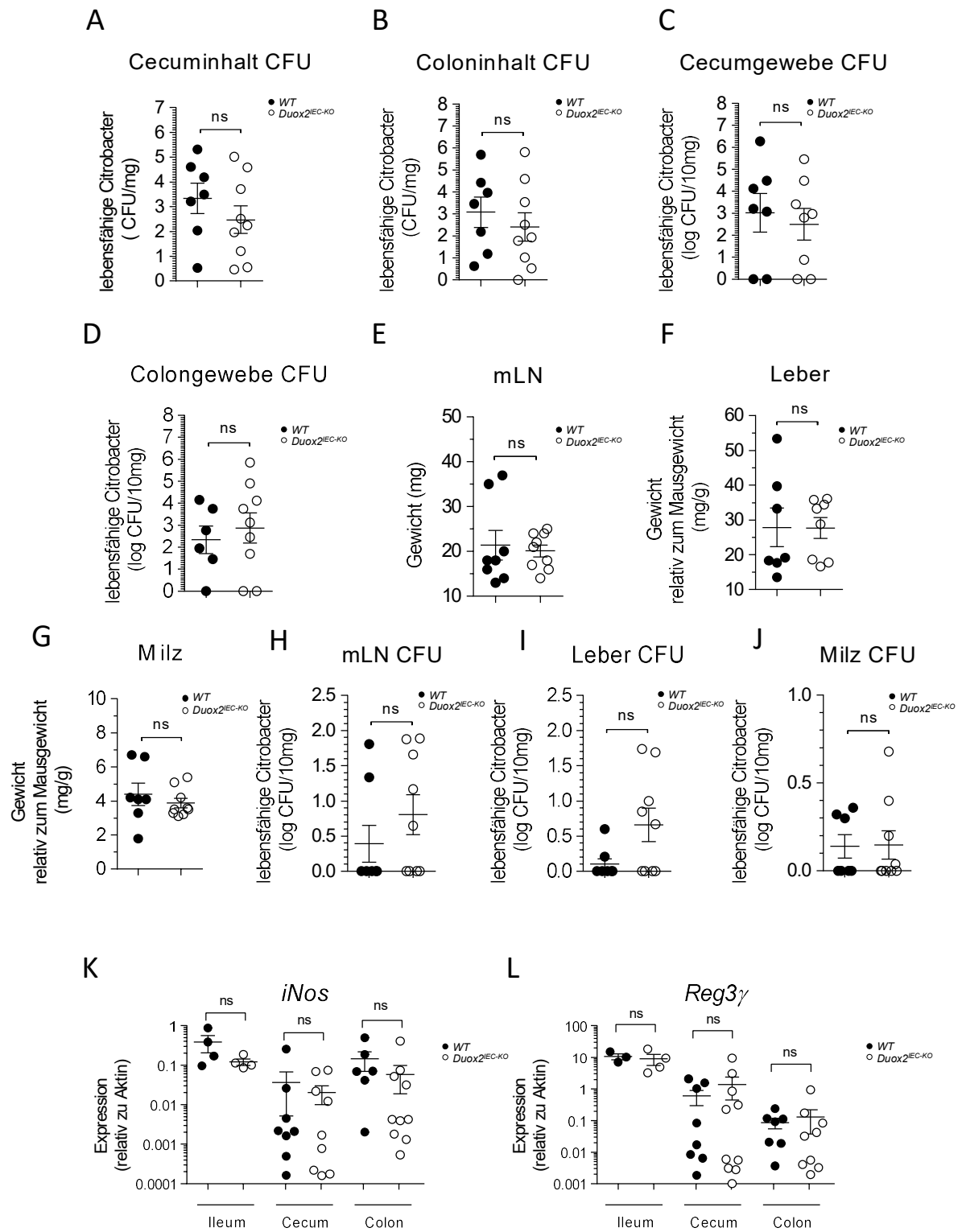


Abbildung 11 Analyse der Bakterieninvasion und nachfolgenden Entzündungsreaktion im Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse nach Infektion mit *C. rodentium*

Den mit *C. rodentium* infizierten WT- und Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wurden Milz, Leber und mLN sowie Cecum und Colon entnommen. Es wurden je das Gewicht von Milz (A), Leber (B) und mLN (C) sowie nach der Lyse des Gewebes deren CFU (D, E, F) sowie die CFU von Cecum (G) und Colon (H) bestimmt. Außerdem wurde der Inhalt von Cecum und Colon gesammelt und darin die CFU bestimmt (I, J). Das Gewebe von Cecum und Colon aus WT und Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wurde lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden mittels RT-qPCR die Expressionslevel von *iNos* (K) bestimmt und in Relation zu Aktin gesetzt.

n.s., nicht signifikant; *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001

Weder die Bakterienlast in den Geweben der Organe und der verschiedenen Darmabschnitte noch die Bakterienlast im Darminhalt war in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen signifikant verändert. Auch in der Expression von *iNos* und *Reg3γ* gab es keinen Unterschied zwischen den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und den WT-Mäusen. Diese Ergebnisse zusammengekommen ergaben keinen Beleg für eine erleichterte Bakterieninvasion in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen.

4.2.4 Die Infektion mit *C. rodentium* führt zu einer Angleichung der Mucus-Zusammensetzung im Darm der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse

Die Mucus-Schicht im Darm erfüllt verschiedene Funktionen. Eine davon ist die Bildung einer physikalischen und chemischen Barriere gegenüber pathogenen Darmbakterien (Johansson et al., 2008; Meyer-Hoffert et al., 2008). Ist die Mucus-Schicht beschädigt oder in ihrer Zusammensetzung verändert, erleichtert dies das Eindringen von Bakterien. So entwickeln beispielsweise *Muc2*-defiziente Mäuse einen schwereren Krankheitsverlauf nach Infektion mit *C. rodentium* (Bergstrom et al., 2010). Naiv wurde eine geringere Expression von *CLCA1* und damit eine Veränderung der Zusammensetzung des Mucus der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse festgestellt (4.1.5). Im Zusammenhang mit dem Ausbleiben eines gravierenderen Krankheitsverlauf der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse nach Infektion mit *C. rodentium* stellte sich die Frage, ob die Zusammensetzung des Mucus verändert war.

In der Expression von *Muc2* lag kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse und dem der WT-Mäuse vor (Abbildung 12A). Insgesamt war die *Muc2*-Expression breit gestreut. Insbesondere im Ileum und Cecum der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse zeigten sich vereinzelt Werte unter 0,01 relativ zu Aktin. Derart niedrige Werte waren zuvor im naiven Setting nicht erreicht worden (Abbildung 7C). Generell präsentierte sich die Expression von *Muc2* nach der Infektion mit *C. rodentium* höher als vor der Infektion. Es ist bekannt, dass sich die Expression von *Muc2* innerhalb eines Infektionsgeschehens mit *C. rodentium* dynamisch

verhält. Nach einer anfänglichen Steigerung der Mucus-Produktion fällt die mRNA-Expression nach d10 unter das Ausgangsniveau (Gustafsson et al., 2013). Dies passt zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen. An d10 der Infektion war die *Muc2*-Expression im Colon signifikant niedriger als ohne Infektion mit *C. rodentium* (Abbildung 12B).

CLCA1, das ohne Infektion mit *C. rodentium* in dem Duox2-defizienten Gewebe in allen drei Darmabschnitten signifikant erniedrigt war (Abbildung 7D), wies unter Infektion keine Unterschiede auf (Abbildung 12B). Zwar zeigte sich im Colon der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse eine Tendenz der verringerten Expression von *CLCA1*, allerdings war hier die Streuung groß, sodass sich keine Signifikanz zeigte. Bis auf die Tendenz im Gewebe des Colons haben sich die signifikanten Unterschiede in der Expression von *CLCA1*, die naiv im Duox2-defizienten Gewebe festgestellt wurden, nach Infektion mit *C. rodentium* ausgeglichen. *CLCA1* wurde im Darmgewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse nach der Infektion stärker hochreguliert als im Darmgewebe der WT-Geschwister.

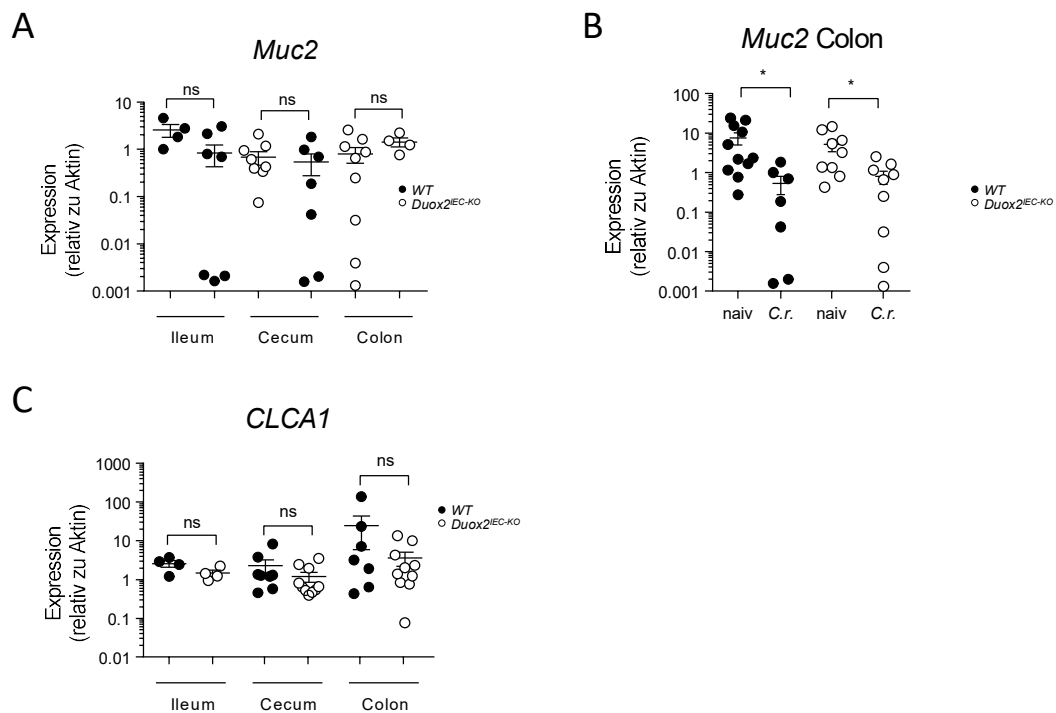


Abbildung 12 Genexpression von *Muc2* und *CLCA1*

Gewebe von Ileum, Cecum und Colon aus WT- und Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wurde lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden mittels RT-qPCR die Expressionslevel von *Muc2* (A, B) und *CLCA1* (C) bestimmt und in Relation zu Aktin gesetzt. Die Expressionslevel von *Muc2* wurden zusätzlich zum Vergleich zwischen WT- und Duox2^{IEC-KO}-Mäusen an d10 der Infektion mit *C. rodentium* (A, C) im Vergleich zwischen naiv und d10 der Infektion mit *C. rodentium* (B) aufgetragen.

n.s., nicht signifikant; *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001

In den nichtinfizierten Mäusen hatten sich in der Expression von *Muc2* keine Veränderungen im Duox2-defizienten Gewebe gezeigt. Dabei blieb es unter Infektion mit *C. rodentium*. Die Expression von *CLCA1* hingegen war nach Infektion anders als ohne Infektion. Die vor der Infektion detektierten Unterschiede der *CLCA1*-Expression im Gewebe mit Duox2-defizientem Epithel lagen nach einer Infektion mit *C. rodentium* nicht länger vor. Daraus folgt, dass *CLCA1* in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen nach Infektion stärker hochreguliert wurde als in den WT-Mäusen.

5 Diskussion

Duox2 wird in zahlreichen Geweben des Körpers exprimiert. Eine wichtige Rolle spielt es beispielsweise bei der Produktion von Schilddrüsenhormonen in der Schilddrüse. Kommt es dort zu Mutationen von Duox2, hat dies einen schweren angeborenen Hypothyroidismus zur Folge (Bedard and Krause, 2007). Unklar ist, welche Rolle Duox2 im Darm spielt, wo es ebenfalls stark exprimiert wird. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass Duox2 im Rahmen von IBD und Darmkrebs des Colon und Rektum (*Colorectal cancer*, CR) hochreguliert ist (Derakhshani et al., 2022), wodurch sich seine Position als möglicher Baustein des Entzündungsprozesses im Darm noch verstärkt. Dennoch ist nicht verstanden, welche Funktion es insbesondere in der intestinalen Immunabwehr übernimmt.

Im naiven Zustand waren wenig Unterschiede der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern feststellbar. Es lag lediglich eine leichte Dysbiose, eine verminderte Genexpression antimikrobieller Substanzen sowie eine veränderte Mucus-Zusammensetzung vor. Auch nach Infektion mit *C. rodentium* gab es kaum Veränderungen. Das Infektionsverhalten der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse erwies sich als ähnlich zu dem der WT-Mäuse.

5.1 Vor Infektion mit *C. rodentium*

Die Nox-Isoformen fungieren als ROS-Produzenten. Die von ihnen produzierten ROS haben wichtige regulatorische und antimikrobielle Funktionen. Daher wäre es möglich, dass der Ausfall eines der Mitglieder aus der Familie durch die Hochregulierung eines der anderen Mitglieder kompensiert wird, um ein ROS-Defizit zu vermeiden. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen jedoch, dass keine der Nox-Isoformen in der Abwesenheit von Duox2 im Darm hochreguliert wird. Dies macht Funktionseinbußen im betroffenen Gewebe und dessen Umgebung aufgrund von fehlenden ROS wahrscheinlicher.

Stattdessen zeigte sich eine Veränderung der Mikrobiota. Der Stamm der *γProteobakterien* wurde in Cecum und Colon der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse vermehrt detektiert und könnte im Zusammenhang mit dem vermehrten Inhalt im Cecum der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse stehen. Mehr Inhalt im Cecum lässt auf eine verlängerte Transitzeit der Nahrung schließen. Der Grund dafür kann entweder im Cecum selbst oder im darauffolgenden Colon liegen und kann in Zusammenhang mit einer verminderten Mobilität des Cecums und/oder des darauffolgenden

Colons stehen. Das vermehrte Vorkommen von *γProteobakterien* im Cecum der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse weist auf eine bestehende Dysbiose hin, die Einfluss auf die Mobilität des Darmes haben könnte. In mit Antibiotika behandelten Mäusen wurde beispielsweise eine, mit der veränderten Darmbakterienlandschaft in Verbindung stehende, verminderte Expression von nNos und eine herabgesetzte Mobilität des Darmtraktes festgestellt (Anitha et al., 2012). Es ist demnach möglich, dass die, durch die vermehrt im Cecum der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse vorkommenden *γProteobakterien* sichtbare, Dysbiose eine verminderte Mobilität des Cecums verursacht.

Erhöhte Vorkommen von *γProteobakterien* können außerdem mit weiteren Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden. Andere Ergebnisse zeigen, dass eine Duox2-Defizienz in intestinalen Epithelzellen eine Expansion von nicht genau klassifizierten *Proteobakterien* im Darm verursacht. Diese gehen mit höheren Plasmaspiegeln von Interleukin 17C (IL17C) einher (Grasberger et al., 2021). Sowohl erhöhte Level von IL17C als auch Dysbiosen im Allgemeinen werden dabei mit IBD in Verbindung gebracht. Ob die Klasse der *γProteobakterien* tatsächlich die einzige Bakterienklasse ist, die mit einer anderen Häufigkeit vorlag, lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend sagen. Um dies herauszufinden, wäre eine Analyse der Mikrobiota durch *Next-Generation-Sequencing* (Sequenzierung) erforderlich. Durch die Sequenzierung ließen sich die Ordnungen und Familien innerhalb der *γProteobakterien* genauer differenzieren.

Ebenfalls im Zusammenhang mit IBD steht eine geringere Expression von iNos (Binion et al., 2000). Generell kann iNos zugleich inflammatorische sowie immunmodulierende antiinflammatorische Effekte haben (Bogdan, 2015). Unter anderem bewirkt es eine Blockade der T-Zell-Expansion in Lymphknoten (Lukacs-Kornek et al., 2011). Da iNos in der vorliegenden Arbeit im Duox2-defizienten Gewebe niedriger exprimiert war deutet dies auf eine möglicherweise ungehemmtere Proliferation der aktivierten T-Zellen hin. Eine solche Expansion geht in der Regel mit einer Hypertrophie des lymphatischen Gewebes, sprich der mLN, einher. Die mLN waren nach Infektion mit *C. rodentium* jedoch leichter als vor der Infektion. Dies spräche eher gegen ungehemmtere Proliferation der aktivierten T-Zellen. Zusätzlich wäre im Rahmen einer ungehemmten Proliferation aktivierter T-Zellen eine Überschießende Immunreaktion zu erwarten gewesen. Dies war nicht der Fall. Ein weiteres Szenario wäre eine ineffektivere Immunantwort durch die verringerte Expression der antimikrobiellen iNos und die kleineren Lymphknoten gewesen. Auch dies traf nicht zu.

Dass weder eine überschießende noch eine ineffektivere Immunreaktion der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse vorlag, passt zu anderen Daten. Sie belegen, dass eine intestinale Duox2-Defizienz in Mäusen zu einer höheren Expression von Interleukin 17c (Il17c) führt, welches T-Zell-unabhängig produziert wird (Grasberger et al., 2021). An einer erhöhten Produktion von T-

Zell-unabhängigem IL17c wären die mLN nicht beteiligt und somit auch nicht vergrößert. Dennoch wäre ein antibakterieller Effekt vorhanden.

Ein weiteres Ergebnis, mit möglichem Einfluss sowohl auf Entzündungsprozesse als auch auf die Darmpassage und damit den Darminhalt, ist die Veränderung der Mucus-Komposition. Da Mucus mit dem Nahrungsbrei, dem Chymus, im Darm interagiert (Yildiz et al., 2015), kann jedwede Veränderung der Mucus-Zusammensetzung einen Rückstau des Darminhaltes in das Cecum verursachen. Der Transit des Chymus ist nicht der einzige Punkt, auf den eine veränderte Mucus-Komposition einwirken kann. Verändert sich die Zusammensetzung des Mucus ist potenziell die Struktur beeinflusst. So beherbergen zum Beispiel Mäuse mit einer leichter zu durchdringender Mucus-Schicht mehr *Proteobakterien* in ihrem Darm (Jakobsson et al., 2015). In diesem Zusammenhang war die verringerte Expression von *CLCA1* interessant. In unseren Untersuchungen war *CLCA1* in allen drei Darmabschnitten der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse geringer exprimiert. *CLCA1* ist eine Metalloprotease, die an der Strukturierung und Auflockerung der äußeren Mucus-Schicht mitwirkt (Liu and Shi, 2019). Im Kontrast gibt es auch Arbeiten, in denen sich *CLCA1* als nicht verantwortlich für die Strukturierung oder Barrierefunktion des Mucus herausgestellt hat (Erickson et al., 2015). Die Ergebnisse beruhen dabei auf der Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Colitis in *CLCA1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Da bei dieser Methode eine chemische Beeinflussung des Mucus stattfindet, ist nicht klar, ob die anfängliche Struktur und Dicke des Mucus, die bei *CLCA*-defizienten Mäusen potenziell verändert ist, eine entscheidende Rolle beim Outcome spielt. Aktuelle ex vivo Ergebnisse zeigten, dass *CLCA1* eine Zunahme der Mucus-Dicke und damit einhergehend durch den Dichteverlust eine größere Penetrierbarkeit des Mucus verursacht (Nystrom et al., 2018). Da *CLCA1* für die Aufspaltung und Expansion des Mucus zuständig ist (Nystrom et al., 2018), könnte eine verminderte Expression von *CLCA1* dichterem Mucus bewirken. Dichter Mucus wiederum könnte vorteilhaft bei Infektionen mit *C. rodentium* sein, da *C. rodentium* zu den Mucus-penetrierenden Bakterien zählt (Wales et al., 2005). Daher könnte sich die verminderte Expression von *CLCA1* im Falle der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse protektiv auf die Infektion mit *C. rodentium* auswirken.

Weiterführend wurde herausgefunden, dass die *CLCA1*-Defizienz durch Cystein-Proteasen kompensiert und eine volle Mucus-Expansion wieder hergestellt werden konnte (Nystrom et al., 2018). Trotz verringerter Expression von *CLCA1* in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen könnte demnach die Mucus-Expansion funktional nicht beeinträchtigt sein. Eine Kompensation der verringerten Expression von *CLCA1* durch Cystein-Proteasen könnte dafür verantwortlich sein, dass der Infektionsverlauf der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse sich nicht von dem ihrer WT-Geschwister unterscheidet, obwohl sie weniger *CLCA1* im Darmgewebe exprimieren.

Um diese Thesen zu festigen, wären weiterführende Untersuchungen zur tatsächlichen Mucus-Struktur sowie der Dicke und Penetrierbarkeit des Mucus nötig.

5.2 Nach Infektion mit *C. rodentium*

Die Befunde nach der Infektion mit *C. rodentium* waren durch ihre große Streuung sehr uneindeutig. Viele Ergebnisse hingen maßgeblich vom Erfolg der Infektion mit *C. rodentium* ab, da sie als Reaktion auf die Besiedelung zu werten waren. Der Erfolg der Infektion wiederum hängt von weiteren Faktoren ab. So stellt sich beispielsweise die Frage, ob eine veränderte Mucus-Struktur für eine schlechtere Penetrierbarkeit der Mucusschicht gesorgt haben könnte. Alternativ bestünde die Möglichkeit, dass *C. rodentium* es in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen erfolgreicher schafft, sich im Darm anzusiedeln und deswegen weniger ausgeschieden wird. Im Falle des zweiten Szenarios wäre unter Umständen eine stärkere Immunreaktion im Darmgewebe der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse zu beobachten gewesen, die sich mit den gemessenen Parametern nicht bestätigen lässt.

Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass sich *C. rodentium* in den Duox2^{IEC-KO} Mäusen aufgrund eines feindlicheren Milieus, einer veränderten Mucus-Komposition mit mehr γ Proteobakterien, schlechter vermehren konnte. Die unterschiedlichen Bakterienstämme verhalten sich mitunter kompetitiv zueinander. So konkurrieren sie beispielsweise um Nahrung und ökologische Nischen, produzieren Toxine, die schädlich für andere Bakterienarten sind, oder induzieren über Immunzellen eine Steigerung der Produktion von antimikrobiellen Substanzen. Im Falle von *C. rodentium* beeinflusst die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren durch ansässige Bakterien die Infektionskinetik maßgeblich (Osbelt et al., 2020). Es ist also davon auszugehen, dass in der vorliegenden Arbeit der stark variierende Infektionserfolg, und somit die große Streuung der Ergebnisse, zum Teil auf Interaktionen zwischen *C. rodentium* und den im Darm ansässigen Mikrobiota zurückzuführen ist. Abhängig von den individuellen Schwankungen in den WT- und den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen in der bakteriellen Darmbesiedelung setzt sich *C. rodentium* mal besser und mal schlechter durch. Eine Möglichkeit, die Streuungseffekte zu minimieren, wäre eine Wiederholung der Experimente mit einer größeren Probenanzahl gewesen. Trotz großer Streuung innerhalb der Ergebnisse lässt sich dennoch festhalten, dass die Reaktion der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse auf die Infektion mit *C. rodentium* ähnlich zu der der WT-Mäuse war.

Im Kontrast dazu steht, dass Duox2 während der akuten Phase einer Cholerainfektion höher exprimiert wird (Bourque et al., 2018), was Rückschlüsse auf einen Zusammenhang der Duox2-Expression mit der Inflammation durch die bakteriellen Infektionen zulässt. Gleichzeitig wurde gezeigt, wie sich eine allgemeine Defizienz der Nox-Isoformen protektiv auf eine Infektion mit *C. rodentium* auswirken kann. Dabei wurde durch eine Inaktivierung von Nox1-4 verursacht, dass Duox2 weniger aktiviert wird. Nahcfolgend wurde beobachtet, dass die im Darm ansässigen Mikrobiota die Produktion von H₂O₂ übernehmen. Das von intestinalen

Mikrobiota produzierte H₂O₂ wirkt sich im Rahmen einer Infektion mit *C. rodentium* protektiv aus (Pircalabioru et al., 2016). Die erwähnte Studie macht deutlich, dass die Mikrobiota Einfluss auf H₂O₂-Produktion nehmen können. Eine veränderte Mikrobiota-Komposition, in diesem Fall sichtbar anhand der in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen vermehrt vorliegenden *γ*Proteobakterien, könnte demnach eine Duox2-Defizienz im Zusammenhang mit einer Infektion mit *C. rodentium* kompensieren. Einer der möglichen Kompensationsmechanismen könnte eine Hochregulierung von IL17C sein. So wurde gezeigt, dass bei Mäusen mit Duoxa-Defizienz im intestinale Epithel *IL17c* höher exprimiert wurde und insbesondere von gramnegativen Bakterien, zu denen *C. rodentium* gehört, induziert wurde. Ebenfalls erhöht war in dieser Studie das Vorliegen von Proteobakterien, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt (Grasberger et al., 2021).

Hinzu kommen Hinweise, dass die Nox-Isoformen im Darmepithel hoch exprimiert sind, aber nur bei Bedarf aktiviert werden (Lindquist et al., 2018). Eine stärkere Hochregulierung der Nox-Isoformen in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen wäre als Kompensationsmechanismus der Duox2-Defizienz denkbar. Dies würde den ähnlichen Infektionsverlauf bei Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und ihren WT-Geschwistern trotz geringerer Duox2-Expression in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen erklären. Da in der vorliegenden Arbeit die Nox-Isoformen nur auf Genebene und nicht auf Proteinebene untersucht wurden, lässt sich zu einer möglichen Expression auf Bedarf keine Aussage treffen.

Für die Hypothese, dass der Grund für den ähnlichen Infektionsverlauf von den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und ihren WT-Geschwistern im veränderten Mikrobiom liegt, spricht die in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen stärkere Hochregulierung antimikrobieller Substanzen nach *C. rodentium* Infektion.

So war *Reg3γ* im Colon naiver Duox2-defizienter Mäuse vermindert exprimiert, was zusammen mit der verminderten Expression von *iNos* für eine schwächere bakterielle Immunabwehr spräche. Nach Infektion mit *C. rodentium* war jedoch nicht nur kein Unterschied im Infektionsverlauf zwischen den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen und ihren WT-Geschwistern zu erkennen, sondern sowohl *Reg3γ* als auch *iNos* wiesen keine Verminderung mehr in ihrer Expression im Duox2-defizienten im Vergleich zum WT-Gewebe auf. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in Kombination mit einer veränderten Häufigkeit der *γ*Proteobakterien bereits in anderen Arbeiten (Vaishnava et al., 2008). In dieser Studie wurde gezeigt, dass kommensale Bakterien ihre Wirte nicht nur durch kompetitives Verhalten vor einer Kolonisation durch pathogen Bakterien schützen, sondern direkt (über MyD88) mit ihren Wirten kommunizieren und sie zur Produktion von Reg3g anregen. Die in den Duox2^{IEC-KO}-Mäusen gefundene veränderte Mikrobiota-Komposition könnte demnach Einfluss auf die Kommunikation der Kommensalen mit den Paneth-Zellen haben und eine effektivere Immunantwort bei der Infektion mit *C. rodentium* zur Folge haben.

Ähnliches gilt für die Expression von *iNos* und *CLCA1*. Beide Proteine waren im naiven Setting im Ileum und im Colon, *CLCA1* auch im Cecum, der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse geringer exprimiert. Dass dieser Unterschied nach der Infektion mit *C. rodentium* nicht mehr vorhanden war, ließe sich ebenfalls der bereits erwähnten möglichen Kompensation durch Mikrobiota-bedingte Veränderungen im Darm Milieu zuschreiben.

5.3 Ausblick

Es lässt sich festhalten, dass die in den nichtinfizierten Mäusen detektierten Veränderungen in der Mucus-Zusammensetzung der Duox2^{IEC-KO}-Mäuse nach Infektion ebenso verschwunden waren wie die verringerte Expression der antimikrobiell wirkenden *Reg3γ* und *iNos*. Welcher der erwähnten Faktoren den größten Anteil an dem *Rescuing* der Expression von *CLCA1*, *Reg3γ* und *iNos* hat, ist Gegenstand weiterer Forschung.

Generell wird Duox2 als funktional wichtig für den Darm angesehen, da es nicht nur im Gastrointestinaltrakt hoch exprimiert wird, sondern dort auch die Hauptquelle für H₂O₂ darstellt (Geiszt et al., 2003). Des Weiteren hat Duox2 als Bestandteil eines Duox2/H₂O₂/LPO-Systems bakteriostatische Effekte und spielt damit eine entscheidende Rolle in der mucosalen Immunität (Sarr et al., 2018). Verglichen mit den Duox2 zugeschriebenen Charakteristika zeigen die Duox2^{IEC-KO}-Mäuse sowohl vor als auch nach Infektion wenig Unterschiede im Vergleich mit ihren WT-Geschwistern.

Duox2 wird immer enger mit IBD, insbesondere CU, verknüpft. Im gesamten Dickdarm von CU-Patient*innen ist Duox2 und dessen Maturationsfaktor DuoxA2 maßgeblich stärker exprimiert (MacFie et al., 2014). Der Komplex Duox2/DuoxA2 wird als wichtiger Teil intrazellulärer Signalwege, die zu einer Progression von CU führen, angesehen. DuoxA2 könnte sogar als möglicher Biomarker für Gewebsbiopsien von CU-Patient*innen fungieren (Zhang et al., 2020). CU ist eine chronische entzündliche Darmerkrankung von unbekannter Genese die zu den IBD's zählt. Zwar sind bestimmte umweltbedingte und genetische Risikofaktoren bekannt, doch der genaue auslösende Mechanismus der Erkrankung ist bis heute nicht verstanden. Betroffene leiden unter einer chronischen Entzündung der Darmmucosa, die typischerweise im Rectum beginnt, sich kontinuierlich weiter nach proximal ausbreitet und mitunter zu blutigen Stühlen führt. Die Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankung sind limitiert. Sie können bestenfalls Exazerbationen verhindern und die Progression verlangsamen, bieten aber keine Aussicht auf Heilung. Die *ultima ratio* ist weiterhin eine Operation mit Colektomie (Ordas et al., 2012).

Dementsprechend ist es wichtig, die Rolle von Duox2 im Darm und der mucosalen Immunität genauer zu verstehen. Eine genauere Erforschung der Zusammenhänge von Duox2 und intestinaler Entzündung könnte helfen, die Entstehung und Progression von CU zu verstehen und neue Behandlungsmöglichkeiten von CU-Patient*innen eröffnen.

Ähnliches gilt für die gesamte übergeordnete Gruppe der IBD's. Es wurde gezeigt, dass eine Duox2-Defizienz im Darm zu höheren IL17C Levels im Plasma und darüber zur Dysbiose führt, welche wiederum einer der Haupttreiber für IBD ist und bereits im präklinischen Stadium vorliegt (Grasberger et al., 2021). Ein detailreicheres Verständnis der Funktion von Duox2 im intestinalen Epithel könnte nicht nur zielgerichtete Behandlungsmöglichkeiten erschließen, sondern auch mit der Etablierung von geeigneten Biomarkern zur Früherkennung von IBD's beitragen. Die weitere Untersuchung des in dieser Arbeit veränderten CLCA1 und der Mucusstrukturierung, sowie des mucosalen Mikrobioms inklusive der *γProteobakterien* könnte dafür einen geeigneten Ansatzpunkt bieten.

6 Literaturverzeichnis

- Ago, T., T. Kitazono, J. Kuroda, Y. Kumai, M. Kamouchi, H. Ooboshi, M. Wakisaka, T. Kawahara, K. Rokutan, S. Ibayashi, and M. Iida. 2005. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* 36:1040-1046.
- Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* 357:593-615.
- Ambort, D., M.E. Johansson, J.K. Gustafsson, H.E. Nilsson, A. Ermund, B.R. Johansson, P.J. Koeck, H. Hebert, and G.C. Hansson. 2012. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:5645-5650.
- Anitha, M., M. Vijay-Kumar, S.V. Sitaraman, A.T. Gewirtz, and S. Srinivasan. 2012. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* 143:1006-1016 e1004.
- Arike, L., and G.C. Hansson. 2016. The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *J Mol Biol* 428:3221-3229.
- Aviello, G., and U.G. Knaus. 2018a. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunol*
- Aviello, G., and U.G. Knaus. 2018b. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal immunology* 11:1011-1023.
- Banfi, B., A. Maturana, S. Jaconi, S. Arnaudeau, T. Laforge, B. Sinha, E. Ligeti, N. Demaurex, and K.H. Krause. 2000. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287:138-142.
- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex, and K.H. Krause. 2001. A Ca(2⁺)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *The Journal of biological chemistry* 276:37594-37601.
- Bedard, K., and K.H. Krause. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87:245-313.
- Bergstrom, K.S., V. Kissoon-Singh, D.L. Gibson, C. Ma, M. Montero, H.P. Sham, N. Ryz, T. Huang, A. Velcich, B.B. Finlay, K. Chadee, and B.A. Vallance. 2010. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog* 6:e1000902.
- Bevins, C.L., and N.H. Salzman. 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9:356-368.
- Binion, D.G., P. Rafiee, K.S. Ramanujam, S. Fu, P.J. Fisher, M.T. Rivera, C.P. Johnson, M.F. Otterson, G.L. Telford, and K.T. Wilson. 2000. Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion. *Free Radic Biol Med* 29:881-888.
- Bogdan, C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol* 36:161-178.
- Bourque, D.L., T.R. Bhuiyan, D.P. Genereux, R. Rashu, C.N. Ellis, F. Chowdhury, A.I. Khan, N.H. Alam, A. Paul, L. Hossain, L.M. Mayo-Smith, R.C. Charles, A.A. Weil, R.C. LaRocque, S.B. Calderwood, E.T. Ryan, E.K. Karlsson, F. Qadri, and J.B. Harris. 2018. Analysis of the Human Mucosal Response to Cholera Reveals Sustained Activation of Innate Immune Signaling Pathways. *Infect Immun* 86:

- Bronte, V., and M.J. Pittet. 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39:806-818.
- Cadwell, K., J.Y. Liu, S.L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J.K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J.A. Carrero, S. Hunt, C.D. Stone, E.M. Brunt, R.J. Xavier, B.P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T.S. Stappenbeck, and H.W.t. Virgin. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456:259-263.
- Chandrasekharan, B., B.J. Saeedi, A. Alam, M. Houser, S. Srinivasan, M. Tansey, R. Jones, A. Nusrat, and A.S. Neish. 2019. Interactions Between Commensal Bacteria and Enteric Neurons, via FPR1 Induction of ROS, Increase Gastrointestinal Motility in Mice. *Gastroenterology* 157:179-192 e172.
- Chen, G.L., Y. Zhang, W.Y. Wang, X.L. Ji, F. Meng, P.S. Xu, N.M. Yang, F.Q. Ye, and X.C. Bo. 2017. Partners of patients with ulcerative colitis exhibit a biologically relevant dysbiosis in fecal microbial metacommunities. *World J Gastroenterol* 23:4624-4631.
- Collins, J.T., A. Nguyen, and M. Badireddy. 2020. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. In StatPearls. Treasure Island (FL).
- Collins, J.W., K.M. Keeney, V.F. Crepin, V.A. Rathinam, K.A. Fitzgerald, B.B. Finlay, and G. Frankel. 2014. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* 12:612-623.
- Crepin, V.F., J.W. Collins, M. Habibzay, and G. Frankel. 2016. *Citrobacter rodentium* mouse model of bacterial infection. *Nat Protoc* 11:1851-1876.
- De Deken, X., B. Corvilain, J.E. Dumont, and F. Miot. 2014. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. *Antioxid Redox Signal* 20:2776-2793.
- De Deken, X., D. Wang, M.C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J.E. Dumont, and F. Miot. 2000. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *The Journal of biological chemistry* 275:23227-23233.
- Deken, X.D., B. Corvilain, J.E. Dumont, and F. Miot. 2013. Roles of DUOX-Mediated Hydrogen Peroxide in Metabolism, Host Defense, and Signaling. *Antioxidants & redox signaling* 25:25.
- Dekker, J., J.W. Rossen, H.A. Buller, and A.W. Einerhand. 2002. The MUC family: an obituary. *Trends in biochemical sciences* 27:126-131.
- Derakhshani, A., D. Javadrashid, N. Hemmat, A. Dufour, A.G. Solimando, M. Abdoli Shadbad, P.H.G. Duijf, O. Brunetti, N. Silvestris, and B. Baradaran. 2022. Identification of Common and Distinct Pathways in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: A Hypothesis Based on Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *Front Genet* 13:848646.
- Donnenberg, M.S., A. Donohue-Rolfe, and G.T. Keusch. 1989. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J Infect Dis* 160:452-459.
- Duerkop, B.A., S. Vaishnava, and L.V. Hooper. 2009. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 31:368-376.
- Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, and D.A. Relman. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
- Eckmann, L. 2006. Animal models of inflammatory bowel disease: lessons from enteric infections. *Ann N Y Acad Sci* 1072:28-38.

- Erickson, N.A., E.E.L. Nystrom, L. Mundhenk, L. Arike, R. Glauben, M.M. Heimesaat, A. Fischer, S. Bereswill, G.M.H. Birchenough, A.D. Gruber, and M.E.V. Johansson. 2015. The Goblet Cell Protein Clca1 (Alias mClca3 or Gob-5) Is Not Required for Intestinal Mucus Synthesis, Structure and Barrier Function in Naive or DSS-Challenged Mice. *Plos One* 10:
- Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, K. Lekstrom, and T.L. Leto. 2003. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J* 17:1502-1504.
- Grasberger, H., J. Gao, H. Nagao-Kitamoto, S. Kitamoto, M. Zhang, N. Kamada, K.A. Eaton, M. El-Zaatari, A.B. Shreiner, J.L. Merchant, C. Owyang, and J.Y. Kao. 2015. Increased Expression of DUOX2 Is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine. *Gastroenterology* 149:1849-1859.
- Grasberger, H., A.T. Magis, E. Sheng, M.P. Conomos, M. Zhang, L.S. Garzotto, G. Hou, S. Bishu, H. Nagao-Kitamoto, M. El-Zaatari, S. Kitamoto, N. Kamada, R.W. Stidham, Y. Akiba, J. Kaunitz, Y. Haberman, S. Kugathasan, L.A. Denson, G.S. Omenn, and J.Y. Kao. 2021. DUOX2 variants associate with preclinical disturbances in microbiota-immune homeostasis and increased inflammatory bowel disease risk. *J Clin Invest* 131:
- Gum, J.R., Jr., J.W. Hicks, N.W. Toribara, B. Siddiki, and Y.S. Kim. 1994. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry* 269:2440-2446.
- Gustafsson, J.K., N. Navabi, A.M. Rodriguez-Pineiro, A.H. Alomran, P. Premaratne, H.R. Fernandez, D. Banerjee, H. Sjoval, G.C. Hansson, and S.K. Linden. 2013. Dynamic changes in mucus thickness and ion secretion during *Citrobacter rodentium* infection and clearance. *Plos One* 8:e84430.
- Guzik, T.J., R. Korbut, and T. Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 54:469-487.
- Hall, J.A., N. Bouladoux, C.M. Sun, E.A. Wohlfert, R.B. Blank, Q. Zhu, M.E. Grigg, J.A. Berzofsky, and Y. Belkaid. 2008. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 29:637-649.
- Harel, J., J. Fairbrother, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore. 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet Microbiol* 38:139-155.
- Hayes, P., S. Dhillon, K. O'Neill, C. Thoeni, K.Y. Hui, A. Elkadri, C.H. Guo, L. Kovacic, G. Aviello, L.A. Alvarez, A.M. Griffiths, S.B. Snapper, S.R. Brant, J.H. Doroshov, M.S. Silverberg, I. Peter, D.P. McGovern, J. Cho, J.H. Brumell, H.H. Uhlig, B. Bourke, A.A. Muise, and U.G. Knaus. 2015. Defects in NADPH Oxidase Genes NOX1 and DUOX2 in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1:489-502.
- He, B., W. Xu, P.A. Santini, A.D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D.M. Knowles, M. Rescigno, and A. Cerutti. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26:812-826.
- Heeney, D.D., M.G. Gareau, and M.L. Marco. 2018. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr Opin Biotechnol* 49:140-147.
- Helander, H.F., and L. Fandriks. 2014. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol* 49:681-689.

- Ivanov, Il, L. Frutos Rde, N. Manel, K. Yoshinaga, D.B. Rifkin, R.B. Sartor, B.B. Finlay, and D.R. Littman. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4:337-349.
- Jakobsson, H.E., A.M. Rodriguez-Pineiro, A. Schutte, A. Ermund, P. Boysen, M. Bemark, F. Sommer, F. Backhed, G.C. Hansson, and M.E. Johansson. 2015. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* 16:164-177.
- Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1:4659-4665.
- Johansson, M.E., M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G.C. Hansson. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:15064-15069.
- Kahai, P., P. Mandiga, C.J. Wehrle, and S. Lobo. 2020. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Large Intestine. In StatPearls. Treasure Island (FL).
- Kamada, N., S.U. Seo, G.Y. Chen, and G. Nunez. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 13:321-335.
- Karlsson, N.G., M.E. Johansson, N. Asker, H. Karlsson, S.J. Gendler, I. Carlstedt, and G.C. Hansson. 1996. Molecular characterization of the large heavily glycosylated domain glycopeptide from the rat small intestinal Muc2 mucin. *Glycoconj J* 13:823-831.
- Kim, H., M. Kim, S.K. Im, and S. Fang. 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 34:147-159.
- Krause, K.H. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57:S28-29.
- Lambeth, J.D., and A.S. Neish. 2014. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol* 9:119-145.
- Lewit-Bentley, A., and S. Rety. 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10:637-643.
- Li, R., Z. Jia, and M.A. Trush. 2016. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)* 1:9-21.
- Lindquist, R.L., J. Bayat-Sarmadi, R. Leben, R. Niesner, and A.E. Hauser. 2018. NAD(P)H Oxidase Activity in the Small Intestine Is Predominantly Found in Enterocytes, Not Professional Phagocytes. *International journal of molecular sciences* 19:
- Liu, C.L., and G.P. Shi. 2019. Calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1): More than a regulator of chloride transport and mucus production. *The World Allergy Organization journal* 12:100077.
- Liu, S., W. Han, Y. Zang, H. Zang, F. Wang, P. Jiang, H. Wei, X. Liu, Y. Wang, X. Ma, and Y. Ge. 2019. Identification of Two Missense Mutations in DUOX1 (p.R1307Q) and DUOXA1 (p.R56W) That Can Cause Congenital Hypothyroidism Through Impairing H₂O₂ Generation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:526.
- Lukacs-Kornek, V., D. Malhotra, A.L. Fletcher, S.E. Acton, K.G. Elpek, P. Tayalia, A.R. Collier, and S.J. Turley. 2011. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol* 12:1096-1104.
- Lüllmann-Rauch, R., and E. Asan. Taschenlehrbuch Histologie. 1 Online-Ressource (781 Seiten) pp.

- Luperchio, S.A., and D.B. Schauer. 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* 3:333-340.
- MacFie, T.S., R. Poulson, A. Parker, G. Warnes, T. Boitsova, A. Nijhuis, N. Suraweera, A. Poehlmann, J. Szary, R. Feakins, R. Jeffery, R.W. Harper, A.M. Jubb, J.O. Lindsay, and A. Silver. 2014. DUOX2 and DUOX2 form the predominant enzyme system capable of producing the reactive oxygen species H₂O₂ in active ulcerative colitis and are modulated by 5-aminosalicylic acid. *Inflammatory bowel diseases* 20:514-524.
- Madison, B.B., L. Dunbar, X.T. Qiao, K. Braunstein, E. Braunstein, and D.L. Gumucio. 2002. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *The Journal of biological chemistry* 277:33275-33283.
- Meyer-Hoffert, U., M.W. Hornef, B. Henriques-Normark, L.G. Axelsson, T. Midtvedt, K. Putsep, and M. Andersson. 2008. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57:764-771.
- Morand, S., T. Ueyama, S. Tsujibe, N. Saito, A. Korzeniowska, and T.L. Leto. 2009. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB J* 23:1205-1218.
- Moreno, J.C., H. Bikker, M.J. Kempers, A.S. van Trotsenburg, F. Baas, J.J. de Vijlder, T. Vulsma, and C. Ris-Stalpers. 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347:95-102.
- Mukai, R., O. Handa, Y. Naito, S. Takayama, Y. Suyama, C. Ushiroda, A. Majima, Y. Hirai, K. Mizushima, T. Okayama, K. Katada, K. Kamada, K. Uchiyama, T. Ishikawa, T. Takagi, and Y. Itoh. 2020. High-Fat Diet Causes Constipation in Mice via Decreasing Colonic Mucus. *Dig Dis Sci* 65:2246-2253.
- Nguyen, G.T., E.R. Green, and J. Mecsas. 2017. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7:373.
- Nystrom, E.E.L., G.M.H. Birchenough, S. van der Post, L. Arike, A.D. Gruber, G.C. Hansson, and M.E.V. Johansson. 2018. Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity. *EBioMedicine* 33:134-143.
- O'Hara, A.M., and F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7:688-693.
- Ordas, I., L. Eckmann, M. Talamini, D.C. Baumgart, and W.J. Sandborn. 2012. Ulcerative colitis. *Lancet* 380:1606-1619.
- Osbelt, L., S. Thiemann, N. Smit, T.R. Lesker, M. Schroter, E.J.C. Galvez, K. Schmidt-Hohagen, M.C. Pils, S. Muhlen, P. Dersch, K. Hiller, D. Schluter, M. Neumann-Schaal, and T. Strowig. 2020. Variations in microbiota composition of laboratory mice influence *Citrobacter rodentium* infection via variable short-chain fatty acid production. *PLoS Pathog* 16:e1008448.
- Panday, A., M.K. Sahoo, D. Osorio, and S. Batra. 2015. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol* 12:5-23.
- Park, J.S., J.W. Choi, J. Jhun, J.Y. Kwon, B.I. Lee, C.W. Yang, S.H. Park, and M.L. Cho. 2018. *Lactobacillus acidophilus* Improves Intestinal Inflammation in an Acute Colitis Mouse Model by Regulation of Th17 and Treg Cell Balance and Fibrosis Development. *J Med Food* 21:215-224.
- Pelaseyed, T., J.H. Bergstrom, J.K. Gustafsson, A. Ermund, G.M. Birchenough, A. Schutte, S. van der Post, F. Svensson, A.M. Rodriguez-Pineiro, E.E. Nystrom, C. Wising, M.E. Johansson, and G.C. Hansson. 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 260:8-20.

- Perez, S., R. Talens-Visconti, S. Rius-Perez, I. Finamor, and J. Sastre. 2017. Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radic Biol Med* 104:75-103.
- Pircalabioru, G., G. AvIELlo, M. Kubica, A. Zhdanov, M.H. Paclet, L. Brennan, R. Hertzberger, D. Papkovsky, B. Bourke, and U.G. Knaus. 2016. Defensive Mutualism Rescues NADPH Oxidase Inactivation in Gut Infection. *Cell Host Microbe* 19:651-663.
- Rampon, C., M. Volovitch, A. Joliot, and S. Vriz. 2018. Hydrogen Peroxide and Redox Regulation of Developments. *Antioxidants (Basel)* 7:
- Rosshart, S.P., B.G. Vassallo, D. Angeletti, D.S. Hutchinson, A.P. Morgan, K. Takeda, H.D. Hickman, J.A. McCulloch, J.H. Badger, N.J. Ajami, G. Trinchieri, F. Pardo-Manuel de Villena, J.W. Yewdell, and B. Rehmann. 2017. Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell* 171:1015-1028 e1013.
- Sarr, D., E. Toth, A. Gingerich, and B. Rada. 2018. Antimicrobial actions of dual oxidases and lactoperoxidase. *J Microbiol* 56:373-386.
- Sekirov, I., S.L. Russell, L.C. Antunes, and B.B. Finlay. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* 90:859-904.
- Sirokmany, G., A. Donko, and M. Geiszt. 2016. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Pharmacol Sci* 37:318-327.
- Szanto, I., M. Pusztaszeri, and M. Mavromati. 2019. H₂O₂ Metabolism in Normal Thyroid Cells and in Thyroid Tumorigenesis: Focus on NADPH Oxidases. *Antioxidants (Basel)* 8:
- Vaishnav, S., C.L. Behrendt, A.S. Ismail, L. Eckmann, and L.V. Hooper. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:20858-20863.
- Wales, A.D., M.J. Woodward, and G.R. Pearson. 2005. Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol* 132:1-26.
- Walters, W.A., Z. Xu, and R. Knight. 2014. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett* 588:4223-4233.
- Welak, S.R., R.M. Rentea, R.J. Teng, N. Heinzerling, B. Biesterveld, J.L. Liedel, K.A. Pritchard, Jr., K.M. Fredrich, and D.M. Gourlay. 2014. Intestinal NADPH oxidase 2 activity increases in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Plos One* 9:e115317.
- Yanai, H., S. Ben-Shachar, L. Baram, H. Elad, G. Gitstein, E. Brazowski, H. Tulchinsky, M. Pasmanik-Chor, and I. Dotan. 2015. Gene expression alterations in ulcerative colitis patients after restorative proctocolectomy extend to the small bowel proximal to the pouch. *Gut* 64:756-764.
- Yildiz, H.M., L. Speciner, C. Ozdemir, D.E. Cohen, and R.L. Carrier. 2015. Food-associated stimuli enhance barrier properties of gastrointestinal mucus. *Biomaterials* 54:1-8.
- Yoo, B.B., and S.K. Mazmanian. 2017. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 46:910-926.
- Zhang, J., X. Wang, L. Xu, Z. Zhang, F. Wang, and X. Tang. 2020. Investigation of Potential Genetic Biomarkers and Molecular Mechanism of Ulcerative Colitis Utilizing Bioinformatics Analysis. *Biomed Res Int* 2020:4921387.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Material: Vektorstrategie Duox2 ^{fl/fl} von Taconic-Artemis	25
Abbildung 2 Expression von Duox2 im Darmgewebe der <i>Fullbody-KO-Mäuse</i> und der <i>Duox2^{IEC-KO}-Mäuse</i>	34
Abbildung 3 Genexpression der Nox-Isoformen	36
Abbildung 4. Makroskopische Analyse von Duox2 ^{IEC-KO} -Mäusen auf strukturelle Veränderungen des Darms	38
Abbildung 5 Mikroskopische Analyse von Duox2 ^{IEC-KO} -Mäusen auf strukturelle Veränderungen des Darms	40
Abbildung 6 Entzündungsgeschehen im Darmgewebe der Duox2 ^{IEC-KO} -Mäuse	44
Abbildung 7 Mucosale Veränderungen im Darmepithel der Duox2 ^{IEC-KO} -Mäuse	46
Abbildung 8 Vorkommen von Mikrobiota im Darminhalt.....	49
Abbildung 9 Monitoring der Schwere des Infektionsverlaufs der Duox2 ^{IEC} -Mäuse	52
Abbildung 10 Analyse der Veränderungen im Gewebe der Duox2 ^{IEC-KO} -Mäuse nach Infektion mit <i>C. rodentium</i>	54
Abbildung 11 Analyse der Bakterieninvasion und nachfolgenden Entzündungsreaktion im Gewebe der Duox2 ^{IEC-KO} -Mäuse nach Infektion mit <i>C. rodentium</i>	58
Abbildung 12 Genexpression von Muc2 und CLCA1	59

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primer Nox-Isoformen	22
Tabelle 2 Primer Mikrobiota	22
Tabelle 3 weitere Primer	23
Tabelle 4 Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien	23
Tabelle 5 Geräte	24
Tabelle 6 Software	24
Tabelle 7 Reagenzien für die RT-qPCR	28
Tabelle 8 Reagenzien für die RT-PCR	29
Tabelle 9 <i>Scoring</i> zur täglichen Kontrolle der infizierten Mäuse	30