

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

Mechanistische Untersuchung der LPS- induzierten TLR4 Signaltransduktion in neutrophilen  
Granulozyten keimfreier Mäuse

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

Vorgelegt von

Maria Lilo Müller (geb. Abbe)

aus Erfurt

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 06.12.2022

- Für die, die immer da waren.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation .....	1
2 Literaturdiskussion .....	4
2.1 Immunsystem .....	4
2.1.1 Hämatopoese .....	5
2.1.1.1 Eosinophile Granulozyten .....	6
2.1.1.2 Basophile Granulozyten .....	6
2.1.1.3 Neutrophile Granulozyten .....	7
2.1.2 Das erworbene Immunsystem .....	9
2.1.3 Das angeborene Immunsystem .....	10
2.2 Angeborene Immunrezeptoren .....	11
2.2.1 Toll-like-Rezeptoren – Aufbau und Funktion .....	13
2.2.2 Lipopolysaccharide (LPS) .....	15
2.2.3 Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) .....	17
2.2.4 CD14 .....	18
2.2.5 TLR4-Signalweg .....	18
2.2.5.1 Myd88-abhängiger Signalweg .....	20
2.2.5.2 Der Myd88-unabhängige Weg .....	22
2.2.5.3 Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinase-4 .....	23
2.2.5.4 Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) .....	23
2.2.5.5 Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) .....	24
2.2.5.6 Endotoxin Toleranz .....	24
2.3 Darmmikrobiota .....	27
2.3.1 Definition und Entwicklung .....	27
2.3.2 Funktion .....	29
2.3.3 Rolle in der Pathogenese anderer Organsysteme .....	30
2.4 Keimfreie Mäuse .....	31
2.4.1 Historie .....	31
2.4.2 Aufzucht und Haltung .....	32
3 Material und Methoden .....	35
3.1 Geräte .....	35
3.2 Software .....	36
3.3 Verbrauchsmaterialien .....	36
3.4 Chemikalien und Reagenzien .....	37
3.5 Puffer und Medien .....	38
3.6 Isolation neutrophiler Granulozyten mit Histopaque (Dichtegradient-Zentrifugation) 42	
3.7 Isolation neutrophiler Granulozyten MACS Cell Separation .....	42

3.8	Proteinlysatherstellung .....	43
3.9	DC™ Protein Assay.....	43
3.10	Western Blot .....	43
3.11	Stripping für Western Blot .....	44
3.12	FACS .....	45
3.13	Statistische Analyse .....	45
4	Ergebnisse .....	45
4.1	Quantifizierung der Signalintensität von IRAK4 in neutrophilen Granulozyten.....	45
4.2	Quantifizierung der Signalintensität von p- IRAK4 in neutrophilen Granulozyten ...	47
4.3	Relative Intensität von IRAK4 in GF- und in CONVR- Mäusen.....	48
4.4	Quantifizierung der Signalintensität von IRF3 in neutrophilen Granulozyten .....	49
4.5	Quantifizierung der Signalintensität von p-IRF3 in neutrophilen Granulozyten .....	50
4.6	Relative Intensität von IRF3 in GF- und in CONVR- Mäusen .....	51
4.7	Quantifizierung der Signalintensität von IRF5 in neutrophilen Granulozyten .....	52
4.8	Quantifizierung der Signalintensität von p-IRF5 in neutrophilen Granulozyten .....	53
4.9	Relative Intensität von IRF5 in GF- und in CONVR- Mäusen .....	54
4.10	Durchflusszytometrie zur Bestimmung der TLR4- Rezeptoren in neutrophilen Granulozyten .....	55
5	Diskussion.....	57
5.1	Seperation neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark .....	57
5.2	Proteinübertragung mittels Western Blot.....	60
5.3	Unterschiede in der inflammatorischen Antwort zwischen GF- Mäusen und CONV-R 63	
5.4	Geschlechterspezifische Unterschiede in der Proteinexpression .....	64
5.5	Regulatorische Aktivität der neutrophilen Granulozyten auf die Immunantwort .....	65
6	Zusammenfassung.....	66
7	Literaturverzeichnis .....	68
8	Anhang .....	73
9	Danksagung.....	98
10	Tabellarischer Lebenslauf .....	99

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
AP-1	Aktivator-Protein-1
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein
ATP	Adenosintriphosphat
CD11b	Integrin α-M
CD14	Cluster of differentiation 14
CD66b	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8
CFS	Colony Stimulating Factor
CFU1	Colony Forming Units
CLR	C-Typ-Lecitin-Rezeptoren
CONV-R	Conventionally raised, konventionell aufgewachsen
CR3	Complement-Rezeptor 3
CREB	cAMP response element-binding protein
DAMP	Damage-associated molecular patterns
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
GF	Germ free, keimfrei
IFN-β	Interferon beta
IgE	Immunglobulin E
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-18	Interleukin-18
IRAK1	IL-1-Rezeptor-assozierte-Kinase-1
IRAK2	IL-1-Rezeptor-assozierte-Kinase-1

IRAK4	IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase-4
IRF1	Interferon Regulatory Factor 1
IRF2	Interferon Regulatory Factor 2
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
IRF5	Interferon Regulatory Factor 5
I $\kappa$ B- $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor, alpha
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
l	Liter
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Major Basic Protein
MD-2	Myeloid differentiation factor 2
MHC-I	Major histocompatibility complex
MIP-2	Makrophagen-Entzündungsprotein 2
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NEK7	(NIMA)-related kinase 7
NET	neutrophil extracellular traps
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	Nod-like-Rezeptoren
NOD	Nukleotidbindendes-Oligomerisierungsdomänenmolekül

NRLP3	Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing 3
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PECAM-1	Thrombozyten-Endothel-Adhäsionsmolekül
PRR	Pattern-Recognition-Receptors
RHIM	Rip homotypisches Interaktionsmotiv
RIG	Retinsäure-induzierbares Gen I
RIP1	Rezeptor interagierendes Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
SRAM	Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein
TBK1	TANK-bindende Kinase 1
TIRAP	TIR-domain-containing adaptor Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR1	Toll-like Rezeptor 1
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TLR3	Toll-like Rezeptor 3
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TLR5	Toll-like Rezeptor 5
TLR6	Toll-like Rezeptor 6
TLR7	Toll-like Rezeptor 7
TLR8	Toll-like Rezeptor 8
TLR9	Toll-like Rezeptor 9
TLR10	Toll-like Rezeptor 10
TLR11	Toll-like Rezeptor 11
TLR12	Toll-like Rezeptor 12
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR2	Tumornekrose-Rezeptor Typ 2

TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAK1	transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ -aktivierte Kinase 1
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor-inducing INF- $\beta$
TIR	Toll-like-Interleukin-1
UBC13	Ubiquitin-konjugierten Enzym 13
UEV1A	Ubiquitin-konjugierten Enzym E2- Variante 1 Isoform A
UNC93B1	Unc-93 homolog B1
VACM1	Vasopressin-activated calcium-mobilizing protein

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung der Hämatopoese .....	6
<b>Abbildung 2:</b> Antimikrobielle Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten .....	9
<b>Abbildung 3:</b> Aktivierung und Signalweg des NLRP3-Inflammasom mit IL-1 $\beta$ und IL-18-Aktivierung.....	15
<b>Abbildung 4:</b> Aufbau einer Bakterienwand eines gramnegativen Bakteriums.....	17
<b>Abbildung 5:</b> Struktur des Lipopolysaccharids .....	17
<b>Abbildung 6:</b> LPS Bindung und Aktivierung der Signalkaskade.....	19
<b>Abbildung 7:</b> Aufspaltung der TLR4-Signalkaskade nach TIRAP und TRAM.....	20
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung des Myd88-abhängigen TLR4-Signalwegs.....	22
<b>Abbildung 9:</b> Darstellung des Myd88- unabhängigen TLR4-Signalwegs.....	23
<b>Abbildung 10:</b> Endotoxin Toleranz durch rezidivierende Stimulation des TLR-4 und Aktivierung des negativen Feedbackmechanismus.....	25
<b>Abbildung 11:</b> Stoffwechselfunktionen der Darmmikrobiota .....	29
<b>Abbildung 12:</b> <b>A</b> Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen (n=5) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen <b>B</b> Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen (n=5) und männlichen GF Mäusen (n=4) <b>C</b> Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in CONV-R Mäusen (n=9) und GF Mäusen (n=9). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann- Whitney Test, $p\#\leq 0.0159$ , und dem Student's t-Test, $p^{****}\leq 0.0001$ . .....	46
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde IRAK4 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen $\alpha$ -Actinin aufgetragen.....	46
<b>Abbildung 14:</b> <b>A</b> Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen (n=4) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen <b>B</b> Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen (n=4) und männlichen GF Mäusen (n=4) <b>C</b> Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in CONV-R Mäusen (n=8) und GF Mäusen (n=8). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann- Whitney Test, $p\#\leq 0.0268$ .....	47
<b>Abbildung 15:</b> Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde p-IRAK4 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen $\alpha$ -Actinin aufgetragen.....	48
<b>Abbildung 16:</b> Vergleich der relativen Intensität (p-IRAK4/IRAK4) zwischen CONV-R Mäusen (n=8) und GF- Mäusen (n=8). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann- Whitney Test, $p###\leq 0.0002$ .....	48
<b>Abbildung 17:</b> <b>A</b> Vergleich der Signalintensität von IRF3 in weiblichen (n=4) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen <b>B</b> Vergleich der Signalintensität von IRF3 in weiblichen (n=4) und männlichen GF Mäusen (n=3) <b>C</b> Vergleich der Signalintensität von IRF3 in CONV-R Mäusen	

(n=8) und GF Mäusen (n=7). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test, $p \leq 0.0268$ .....	49
<b>Abbildung 18:</b> Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde IRF3 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen $\alpha$ -Actinin aufgetragen.....	50
<b>Abbildung 19: A</b> Vergleich der Signalintensität von p-IRF3 in weiblichen (n=4) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen <b>B</b> Vergleich der Signalintensität von p-IRF3 in weiblichen (n=4) und männlichen GF Mäusen (n=3) <b>C</b> Vergleich der Signalintensität von p-IRF3 in CONV-R Mäusen (n=8) und GF Mäusen (n=7). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test, $p \leq 0.0268$ .....	50
<b>Abbildung 20:</b> Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde p-IRF3 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen $\alpha$ -Actinin aufgetragen.....	51
<b>Abbildung 21:</b> Vergleich der relativen Intensität (p-IRF3/IRF3) zwischen CONV-R Mäusen (n=8) und GF- Mäusen (n=7). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test, $p \leq 0.0289$ .....	51
<b>Abbildung 22:</b> A Vergleich der Signalintensität von IRF5 in weiblichen (n=4) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen B Vergleich der Signalintensität von IRF5 in weiblichen (n=4) und männlichen GF Mäusen (n=4) C Vergleich der Signalintensität von IRF5 in CONV-R Mäusen (n=8) und GF Mäusen (n=8). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test, $p \leq 0.0268$ .....	52
<b>Abbildung 23:</b> Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde IRF5 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen $\alpha$ -Actinin aufgetragen.....	52
<b>Abbildung 24: A</b> Vergleich der Signalintensität von p-IRF5 in weiblichen (n=4) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen <b>B</b> Vergleich der Signalintensität von p-IRF5 in weiblichen (n=4) und männlichen GF Mäusen (n=4) <b>C</b> Vergleich der Signalintensität von p-IRF5 in CONV-R Mäusen (n=8) und GF Mäusen (n=8). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test, $p \leq 0.0268$ und $p \leq 0.0011$ .....	53
<b>Abbildung 25:</b> Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde p-IRF5 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen $\alpha$ -Actinin aufgetragen.....	54
<b>Abbildung 26:</b> Vergleich der relativen Intensität (p-IRF5/IRF5) zwischen CONV-R Mäusen (n=8) und GF- Mäusen (n=8). Die Ergebnisse wurden als $\pm$ SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test, $p \leq 0.0001$ .....	54

<b>Abbildung 27:</b> Durchflusszytometrie zur Bestimmung der TLR4 Expression in neutrophilen Granulozyten. Darstellung der entsprechenden Dot Plots. Bei der Erstellung des Gating Schemas unterstützte Dr. Frano Hernan Malinarich Gonzalez.....	56
<b>Abbildung 28:</b> Darstellung der Mean Fluorescent Intensity in CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten in GF-Mäusen (n= 6) gegen CONV-R-Mäuse (n=6).....	57
<b>Abbildung 29:</b> Entnommene Knochen aus den Versuchstieren zur Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark.....	59
<b>Abbildung 30:</b> Schematische Darstellung der Phasen der Dichtegradient- Zentrifugation...	59
<b>Abbildung 31:</b> Dichtegradient- Zentrifugation im Labor .....	60
<b>Abbildung 32:</b> Versuchsaufbau mit Elektrophorese Kammer mit PowerPac.....	61
<b>Abbildung 33:</b> Anfärbung mit Ponceau S der PVDF Membran.....	62
<b>Abbildung 34:</b> Detektion mit dem Fusion Gerät eines fehlerhaften Western Blot aufgrund von Blasenbildung.....	62
<b>Abbildung 35:</b> Fehlende Übertragung der Proteine vom Gel auf die PVDF Membran.....	63

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Geräte.....	35
Tabelle 2: Software.....	35
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	37
Tabelle 5: Trenngel 8%iges Agarosegel.....	40
Tabelle 6: Trenngel 10%iges Agarosegel.....	40
Tabelle 7: 5% Sammelgel.....	40

## 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Durch den kontinuierlichen Kontakt des Menschen mit seiner Umwelt ist er einer großen Anzahl an pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Um schädliche und zum Teil existenziell bedrohliche Situationen durch Besiedelung eben jener pathogenen Mikroorganismen zu verhindern, steht dem Menschen ein komplexes Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Zellen im Körper zur Verfügung. In seiner Gesamtheit sprechen wir dabei über das Immunsystem des Menschen.

Hierbei unterscheiden wir zwei Hauptanteile des Immunsystems. Zum einen handelt es sich dabei um das Angeborene, zum anderen um die erworbene Immunantwort. Dabei hält die angeborene Immunabwehr eine beginnende Infektion in den ersten drei bis vier Tagen in Schach, sodass die erworbene Immunantwort Zeit hat sich auszubilden.

Während es sich bei der erworbenen Immunantwort um eine spezifische Immunantwort handelt, da sie auf ein ganz bestimmtes Antigen reagiert, ist die angeborene Immunantwort unspezifisch. Sie richtet sich nicht im speziellen gegen ein Antigen, sondern gegen konservativ molekulare Muster von Mikroorganismen (1).

Der phylogenetisch ältere Teil des Immunsystems ist der Bestandteil der angeborenen Immunität. Es wird aktuell angenommen das 99% der auftretenden Infektionen durch das angeborene Immunsystem reguliert werden (4).

Sowohl die erworbene als auch angeborene Immunantwort haben einen humoralen und einen zellulären Anteil. Für den erworbenen Anteil des Immunsystems sind, im Bereich des zellulären Kontingents, vorrangig verschiedene Unterformen der T-Lymphozyten verantwortlich. Aber auch die B-Lymphozyten, mit der Ausbildung spezifischer Antikörper, sind ein wichtiger Teil der erworbenen Immunität. Den humoralen Anteil stellen vorrangig die entsprechenden Antikörper dar. Bei der angeborenen Immunantwort finden wir in der humoralen Linie vor allem Komplementfaktoren, Zytokine und Enzyme. Der zelluläre Anteil stellt vor allem Phagozyten, wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (1).

Während pränatal die Blutbildung noch in Leber, Milz und Dottersack stattfindet, verlagert sie sich postnatal in das rote Knochenmark. Dort entwickeln sich sogenannte Colony Forming Units (CFU), multipotente Zellen, in myeloische oder lymphozytäre Vorläuferzellen. Der Zellreihe der CFU-GM Zellen entspringen dabei neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Dabei wird die Bildung neutrophiler Granulozyten bevorzugt über Interleukine (IL), insbesondere IL-3 und IL-5, stimuliert und damit bedarfsorientiert gesteuert (2).

Die neutrophilen Granulozyten stellen den zahlenmäßig größten Teil der peripher zirkulierenden Leukozyten mit ungefähr 40-50% dar (4). Ein weiterer signifikanter Anteil dieser Zellen befindet sich in der Lunge, bereit bei Bedarf in die Peripherie abgegeben zu werden. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden Zytokine, wie z. B. IL-1 oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) produziert, die das lokale Endothel zur Produktion von Adhäsionsmolekülen anregen. Durch lokale Verlangsamung des Blutflusses und die Adhäsionsmoleküle werden die neutrophilen Granulozyten am Endothel gebunden. Infolge dieser Bindung ist eine Interaktion mit dem endothelialen Adhäsionsmolekül (PECAM-1, CD31) möglich. Das ermöglicht letztendlich die Diapedese, also den Durchtritt der neutrophilen Granulozyten durch die Gefäßwand. Im Gegensatz zu Makrophagen scheint es so, als könnten neutrophile Granulozyten phagozytierte Mikroorganismen besser abtöten, können aber dafür keine Antigenpräsentation, wie Makrophagen, betreiben (3).

Neutrophile Granulozyten können jedoch auch einen Zelltodprozess, namens neutrophil extracellular traps (NETose), durchlaufen. Bei diesem mehrschrittigen Prozess extrudieren sie Kernmaterial in den Extrazellularraum. Shuai Shao et al. gelang es, in ihrer Publikation von 2019, den Einfluss der Ausbildung von NET Strukturen und deren Aktivierung über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)-Pathway in direkten Zusammenhang mit Autoimmunprozessen zu stellen. Es handelt sich hierbei also um einen weiteren antimikrobiellen Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten (13). Auch andere wissenschaftliche Untersuchungen legten nahe, dass die TLR4-Aktivierung einen nicht zu vernachlässigbaren Anteil an Autoimmunerkrankungen ausmacht (14). Hierbei ist bereits seit einiger Zeit bekannt, dass Männer und Frauen nicht gleich anfällig für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sind. Untersuchungen zeigten, dass Männer tendenziell eher zu viralen Infekten, Frauen eher zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen neigen. Eine Theorie der aktuellen Forschung ist hierbei, dass vor allem das angeborene Immunsystem bei Frauen bis zu dem Eintritt der Wechseljahre deutlich aktiver und reaktiver ist (15).

Aber nicht nur die Autoimmunerkrankungen waren in den letzten Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Die Entwicklung des Immunsystems und sein Wechselspiel mit dem Mikrobiom ist seit einigen Jahren zunehmend in den Fokus der wissenschaftlichen Betrachtung gerückt. Durch verstärkte Hinweise aus verschiedenen Bereichen der Forschung zeigt sich eine Interaktion der Mikrobiota mit verschiedenen Organsystemen des Menschen. Unter anderem ist die Abhängigkeit der Ausbildung von Atherosklerose, durch Aktivitäten des angeborenen Immunsystems, Bestandteil der Forschung geworden. Aktuelle Forschungsinhalte zeigen die Abhängigkeit der angeborenen Immunantwort eines Wirtes von der mikrobiellen Besiedelung. Damit steht die Entwicklung

einer der häufigsten Erkrankungen und Todesursachen des Menschen in direkter Verbindung mit der Zusammensetzung des Mikrobioms (5).

Um den Einfluss der perinatal übertragenen Bakterienflora auf unser Immunsystem besser verstehen zu können, bedient sich die Forschung, unter anderem, keimfrei gezüchteter Mausmodelle. Keimfreie Mäuse sind auch Bestandteil der vorliegenden Dissertation. Insbesondere liegt der Fokus hierbei auf einen spezifischen Pathway der neutrophilen Granulozyten, dem sogenannten TLR4-Pathway.

Bei vorheriger Betrachtung der Datenlage ergaben sich folgende Zielsetzungen:

- (i) Die quantitative Betrachtung von Schlüsselproteinen des TLR4-Pathways.
- (ii) Die Untersuchung der Dynamik der Schlüsselproteine im des TLR4-Pathway unter keimfreien Haltungsbedingungen.
- (iii) Die Identifizierung geschlechtsspezifische Unterschiede in der quantitativen Proteinexpression des TLR4-Signalwegs.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Immunsystem

Im späten 18. Jahrhundert verbreitete sich die, meist tödlich verlaufende, Erkrankung der Pocken in großen Teilen der Welt. Unter anderem auch in England, wo der englische Landarzt Edward Jenner sich mit der Krankheit auseinandersetzte. Er impfte Patienten mit dem harmloseren Erreger der Kuhpocken und stellte, nach gezielter Reinfektion mit den tödlich verlaufenden Pocken, eine gewisse Immunität bei seinen Patienten fest. Damit gilt er heute als Begründer des wissenschaftlichen Zweiges der Immunologie. Bereits im alten Griechenland waren Grundprinzipien der Immunologie bekannt, dennoch dauert es noch ein weiteres Jahrhundert bis, durch Robert Koch im 19. Jahrhundert, nachgewiesen wurde, dass Mikroorganismen ursächlich für das Entstehen für Infektionen waren. 1890 fanden Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato heraus, dass einige Tierarten gegen Diphtherie und Tetanus immun waren. Ihr Blutserum enthielt eine gewisse „antitoxische Aktivität“, welche den Patienten einen vorübergehenden Schutz gegen diese Erkrankungen ermöglichte. Später wurde eben diese „antitoxische Aktivität“ unter dem Begriff Antikörper bekannt (7). Ein weiterer Begründer und Entdecker der angeborenen Immunität ist Elie Metchnikoff. 1845 wurde er in einem Dorf in der Ukraine, nahe Charkoff, geboren. Bereits als Kind interessierte er sich stark für die Naturwissenschaft. Sein Kontakt zu Louis Pasteur prägte ihn damals stark. Er widmete sein Leben der Forschung des Immunsystems. Durch eine Reihe an Experimenten an wirbellosen Tieren stellte er die Rolle spezialisierter phagozytischer Zellen, Makrophagen und Neutrophile dar, die damals noch Mikrophagen genannt wurden. Er war ein bedeutender Vertreter der zellulären Immunität, zu Zeiten, als diese noch stark umstritten war. 1908 erhielt er zusammen mit Paul Ehrlich den Nobelpreis für seine Forschungen. Ein wichtiger Schwerpunkt seiner Arbeit stellte ebenso der Alterungsprozess und seine These um die autointestinale Intoxikation dar. Dies stellte den Grundpfeiler für das Interesse der heutigen Forschung an der Darmmikrobiota zur Förderung der Gesundheit und Langlebigkeit dar (46). Im weiteren Verlauf der Historie entwickelte man durch gezielte Forschung ein breiteres und umfassenderes Verständnis für das Immunsystem des Menschen. Dabei wurden zwei grundlegende Begriffe geprägt: das angeborene Immunsystem und das erworbene Immunsystem.

Im Verlauf des letzten Jahrhunderts entwickelte sich eine zunehmend genauere Vorstellung der Interaktionen und Wirkungen von Immunzellen. Die Komplexität der verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und anderen Organsystemen bietet heutzutage ein breites Feld für Forschung und Therapieoptionen bei den verschiedensten Erkrankungen. Hierbei spielt die Blutbildung eine entscheidende Rolle.

Findet die Reifung der Blutzellen bis zum 5. Fetalmonat hauptsächlich noch in Leber und Milz statt, vollzieht sich ab dem 5. Fetalmonat eine zunehmende Verlagerung der Produktion in das Knochenmark. Postnatal übernimmt das rote Knochenmark, welches wir vorrangig in großen Röhrenknochen und Plattenknochen finden, komplett die Aufgabe der Blutbildung. Nur in seltenen, krankheitsbedingten Situationen kommt es zur kompensatorischen Rückverlagerung eines kleinen Anteils der Blutbildung auf Milz und Leber. In eben diesem roten Knochenmark findet die Thrombopoese, Erythropoese und Leukopoese statt (8).

Grundlage für das erworbene wie auch das angeborene Immunsystem bilden diese, im Knochenmark gebildeten, Blutzellen. Hierbei sind die Zellen, die entscheidend an der Funktion des Immunsystems beteiligt sind, jene, die sich aus der Leukopoese entwickeln.

### **2.1.1 Hämatopoese**

Ein erwachsener Mensch besitzt ungefähr  $1,7l$  blutbildendes Knochenmark. Dieses enthält ungefähr  $10^{12}$  hämatopoetische Vorläuferzellen. Die CFU sind multipotente Zellen. Der Begriff multipotent bezeichnet hierbei die Fähigkeit sich in eine große Anzahl unterschiedlicher Zellen zu entwickeln, aber nicht in jeden Zelltypus (8).

Viele Schritte der Hämatopoese sind indes noch ungeklärt. Bekannt ist jedoch, dass es sogenannte Colony Stimulating Factors (CFS) gibt. Hierbei handelt es sich um kleine Peptide, die mittels parakriner Wirkweise die Differenzierung als hämatopoetische Wachstumsfaktoren unterstützen. Dem menschlichen Organismus stehen jedoch auch noch andere Botenstoffe wie zum Beispiel Interleukine, Schilddrüsenhormone oder andere klassische Hormone zur Verfügung, um die Ausbildung der entsprechend benötigten Blutzellen zu dirigieren (8).

Die Entwicklung jeder einzelnen multipotenten Zelle kann dann sowohl der myeloischen Zellreihe als auch der lymphoiden Zellreihe folgen. Die lymphoiden Progenitoren sorgen für die Ausbildung der B- und T-Lymphozyten. Damit sind sie ein essentieller Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Die myeloischen Progenitoren können sich jedoch sowohl in Thrombozyten, Erythrozyten als auch Granulozyten und Monozyten weiterentwickeln. Entscheidend hierfür sind die entsprechenden Stimuli, die über CFS oder andere Botenstoffe auf die CFU einwirken.

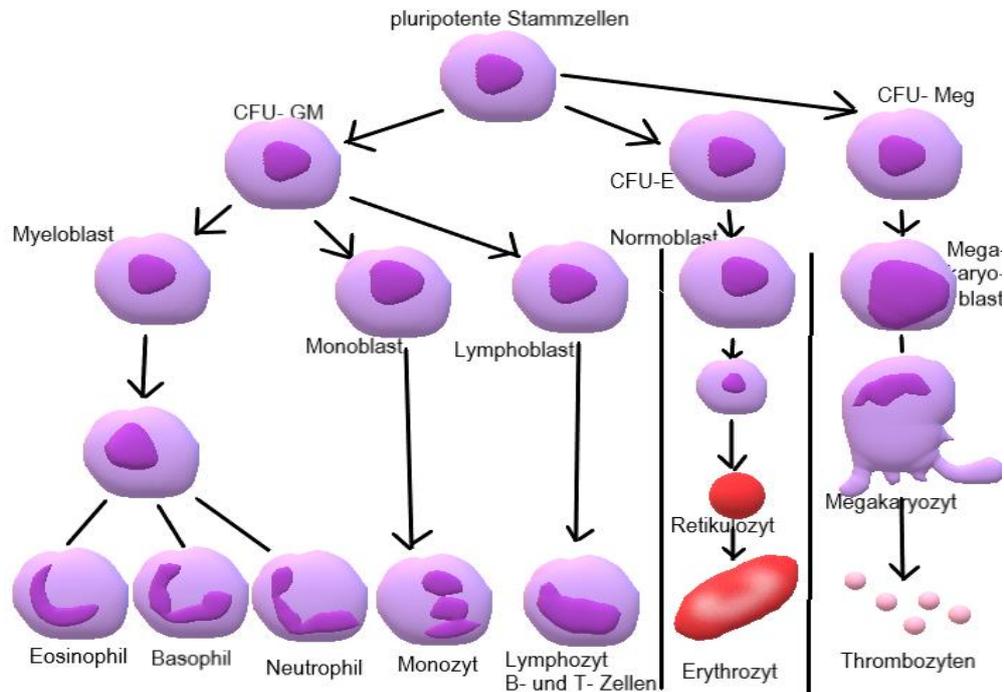


Abbildung 1: Darstellung der Hämatopoese

### 2.1.1.1 Eosinophile Granulozyten

Es gibt drei Unterformen der Granulozyten: eosinophil, basophil und neutrophil. Eosinophile und Basophile teilen sich einen gemeinsamen Progenitor, während Monozyten und neutrophile Granulozyten eine gemeinsame Vorläuferzelle haben.

Eosinophile Granulozyten sind um die 12-17µm große Zellen, die sowohl phagozytieren als auch Antigene präsentieren. Ihren Namen erhielten sie aufgrund der großen eosinophilen Granula, die, mit einem Durchmesser von 1µm, große Teile des Zellplasmas ausfüllen. Diese Granula weisen unter dem Elektronenmikroskop eine Struktur auf die als Major Basic Protein (MBP) bezeichnet wird und für die starke Eosinophilie der Granula ursächlich ist. Das MBP wirkt direkt zytotoxisch und hat die Fähigkeit andere proinflammatorische Zellen zu stimulieren (10).

Durch parasitären Befall des Wirtes oder respiratorische, dermatologische oder gastrointestinale Allergene werden eosinophile Granulozyten zum Entzündungsherd gelockt und aktiviert (4).

### 2.1.1.2 Basophile Granulozyten

Die 14-16µm großen Zellen besitzen einen hantelförmig segmentierten Kern und dichte basophile Granula im Zytoplasma (10). Ihre Halbwertszeit beträgt 5-6h und sie enthalten eine

hohe Konzentration an Histamin (4). Damit sind sie Haupteffektoren der allergischen Reaktionen, vornehmlich des Typ I (10).

Ihre Degranulierung ist jedoch abhängig von dem Vorhandensein von Immunglobulin E (IgE), wofür die basophilen Granulozyten spezifische Rezeptoren besitzen (4). Ihre Aktivierung kann bis zur Maximalvariante der allergischen Reaktionen, dem anaphylaktischen Schock, führen.

### **2.1.1.3 Neutrophile Granulozyten**

Von allen Granulozyten besitzen die Neutrophilen die stärkste phagozytotische Aktivität. Sie sind mit 40-50% die häufigsten zirkulierenden Leukozyten (4) und sind die ersten Zellen des angeborenen Immunsystems, die bei einer Infektion aktiviert werden (11).

Neutrophile Granulozyten werden durch chemotaktisch aktive Stoffe zum Ort der Infektion gelockt, dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet. Da sich die Infektionsherde meist im Extrazellularraum befinden, müssen die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten dafür die Blutstrombahn verlassen. Hierfür müssen sie durch das Endothel der Blutgefäße migrieren. Der dafür notwendige Prozess ist durch ein Konzentrationsgefälle der Chemokine begünstigt und ein mehrschrittiger Prozess, der als Diapedese bezeichnet wird (12).

Am Ort der Infektion kann ein Erreger bereits durch Antikörper oder Komplementfaktoren gebunden, opsoniert sein und so durch den neutrophilen Granulozyten erkannt werden. Die Cluster of differentiation 14 (CD14) Rezeptoren, an den Oberflächen der Neutrophilen, können jedoch auch unabhängig davon an Lipopolysaccharide der Bakterien binden und so diese erkennen. Erkennt ein neutrophiler Granulozyt einen Erreger, so bildet er Pseudopodien aus, die den Erreger unter Bildung eines Phagosoms in das Zellinnere aufnimmt (12).

Das Phagosom ist ein von Membran umschlossener Vesikel der den Erreger einschließt. Die Fusion mit verschiedenen Lysosomen verwandelt das Phagosom in ein Phagolysosom. Die lytischen Inhaltsstoffe der Lysosomen werden so freigesetzt (11). Zusätzlich wird durch die enzymatische Reduktion von Sauerstoff die Bildung von Sauerstoffradikalen gesteigert. Zusätzlich enthalten Neutrophile primäre und sekundäre Granula. Während die primären Granula, ähnlich wie Lysosomen, saure Hydrolasen und Myeloperoxidasen enthalten, finden sich in den sekundären Granula vorrangig eine Reihe antimikrobieller Peptide (12). Durch diese Vielzahl an Mechanismen ist der neutrophile Granulozyt hochspezialisiert zum intrazellulären Abtöten von Mikroorganismen.

Neutrophile Granulozyten enthalten verschiedene Unterarten von Granula, die durch diverse Stimuli mobilisiert werden können. Untersuchungen ergaben, dass es mindestens vier

verschiedene Unterarten von sekretorischen Kompartimenten in Neutrophilen gibt. Zum einen zählen dazu azurophile oder auch primäre Granula, welche den spezifischen Marker Myeloperoxidase enthalten. Die spezifischen oder auch sekundären Granula enthalten als Marker Lipocalin 2 und CD66b. Gelantinase oder auch tertiäre Granula genannt enthalten Gelantinase B und CD11b als Marker. Und zuletzt gibt es noch die sekretorischen Vesikel. Wie die genaue Mengenverteilung der Granulat Verteilung im neutrophilen Granulozyten genau funktioniert ist aktuell noch unbekannt. Man geht aber davon aus, dass zum Zeitpunkt der Granulatuntergruppenbildung bereits der Granulatproteingehalt feststeht. Verschiedene Mechanismen in der messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression werden aktuell in diesem Kasus diskutiert. Die primären Granula sind die Granula die am frühesten produziert werden. Sie werden in den sogenannten Promyelozyten gebildet und durch ihre Anfärbbarkeit mit Azurblau A erhielten sie ihren Beinamen, azurophile Granula. Es konnten ungefähr 850 Proteine identifiziert werden, die mit primären Granula assoziiert sind, unter anderem antimikrobielle Proteine wie Myeloperoxidase, Serinproteasen,  $\alpha$ -Defensine und Lysozyme. Sie werden vor dem Einbau in die Granulate durch proteolytische Prozesse aktiviert und sind damit sofort einsatzbereit. Je nach Zielort der primären Granula, Zelloberfläche oder Phagosom, kommt es zu weiteren strukturellen Unterschieden innerhalb der primären Granula. Diese sind jedoch noch nicht abschließend untersucht und aktuell Gegenstand der Forschung. Sekundäre und Gelantinase Granula werden über Myelozyten-, Metamyelozyten- und Bandstufen gebildet. Spezifische Granula enthalten Lactoferrin und Lipocalin. Tertiäre Granula hingegen enthalten Matrix- Metalloproteinase 9. Beide haben jedoch gemein, dass sie Peroxidase negativ sind. Sekretorische Vesikel enthalten eine große Anzahl von Proteinen, die auch in der Zellmembran zu finden sind. Darunter befinden sich Phagozyten-, Chemoattraktoren- und Zytokinrezeptoren. Zudem noch Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase, Membrankomponenten und Adhäsionsmoleküle. Wie auch bei den tertiären Granula ist ihre Freisetzung auf die Plasmamembran beschränkt. Es wird vermutet, dass sie die neutrophile Adhärenz an den aktivierten vaskulären Endothelzellen erleichtern und somit den ersten Schritt zum Transport von Neutrophilen an den Ort der Entzündung unterstützen (49).

Eine weitere Möglichkeit extrazelluläre Erreger oder anderes Material aufzunehmen ergibt sich aus der rezeptorvermittelten Endozytose. Hierbei wird extrazelluläres Material über endosomale Kompartimente aufgenommen. Im späteren Verlauf fusionieren Endosomen mit Lysosomen und werden dann als sekundäres Lysosom oder Endolysosom bezeichnet. In diesem werden die enthaltenen Bestandteile enzymatisch abgebaut (11).

Neutrophile Granulozyten zielen, durch verschiedene Mechanismen, auf eindringende Mikroorganismen ab. Zu diesen Mechanismen gehören ebenfalls die NETs. Sie fangen eine Vielzahl von Mikroorganismen ab und töten diese. Ebenso immobilisieren sie aktivierte Blutplättchen und bauen Zytokine und Chemokine ab (49).

Ein zusätzliches Hilfsmittel zur Erkennung der Mikroorganismen der neutrophilen Granulozyten sind die pattern-recognition-receptors (PRR). Hierzu gehört auch die Familie der Toll-like Rezeptoren. Sie sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und ihre Aktivierung führt zu wichtigen zellulären Prozessen. Hierbei handelt es sich um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, der Zytokinproduktion und einem verlängerten Überleben der Neutrophilen (16).

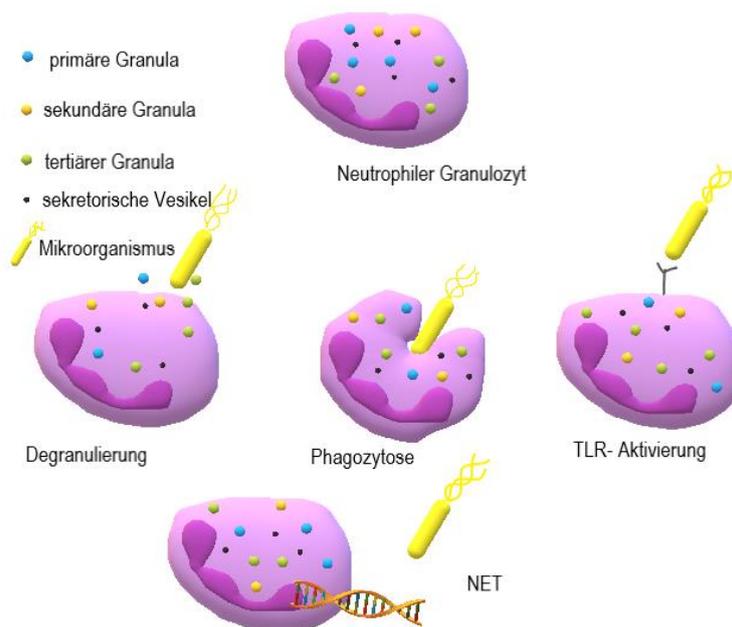


Abbildung 2: Antimikrobielle Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten

### 2.1.2 Das erworbene Immunsystem

Forschungen zeigen, dass nur Wirbeltiere das adaptive Immunsystem, das erworbene Immunsystem, besitzen. Durch Antigen-erkennende Rezeptoren, die Immunglobuline, sind sie in der Lage gezielt bestimmte Antigene zu erkennen, zu bekämpfen und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden (4). Das erworbene Immunsystem basiert auf B- und T-Lymphozyten. Durch die Sensorzellen der angeborenen Immunantwort aktiviert, kommt es zur Differenzierung von T-Effektorzellen und antikörpersezernierenden B-Zellen. Unter anderem präsentieren dendritische Zellen der angeborenen Immunantwort Antigene, die dazu führen, dass es zur klonalen Expression und Differenzierung antigenspezifischer T-Effektorzellen und antikörperbildender B-Zellen kommt. Einige Tage nach Beginn des Entzündungsprozesses

werden antigenspezifische T-Zellen und etwas später auch spezifische Antikörper im Blut freigesetzt (47).

Intrazelluläre Erreger sind für B-Zellen und deren Antikörper kaum zu bekämpfen. Hierfür greift das erworbene Immunsystem auf T-Zellen zurück. Die befallene Zelle präsentiert über major histocompatibility complex-I (MHC-I)-Rezeptoren die Antigene des Erregers. T-Killerzellen erkennen diese und können über eine Bildung von Komplexen die Apoptose der befallenen Zellen induzieren (4).

### **2.1.3 Das angeborene Immunsystem**

So zielgerichtet und spezifisch das adaptive Immunsystem auch arbeitet, es braucht Tage bis Wochen um seine Wirkung zu entfalten. Deutlich schneller hingegen arbeitet das angeborene Immunsystem („innate immun system“). Dieses entfaltet bereits nach wenigen Stunden bis Tagen seine volle Wirkung (4).

Gelingt es Erregern die natürlichen Barrieren des Körpers zu überwinden und einzudringen, gibt es verschiedene Sensorzellen die angeborene Erkennungsrezeptoren exprimieren. Diese Rezeptoren sind genetisch determiniert und lebenslang unveränderlich. Durch die Sensorzellen können Botenstoffe, sogenannte Pyrogene, erkannt werden. Diese beinhalten Bestandteile die nicht im menschlichen Körper vorkommen, wie zum Beispiel bakterielle Lipopolysaccharide oder Adenosintriphosphat (ATP) das unter normalen Umständen nicht extrazellulär auftritt. Die Aktivierung eben jener Rezeptoren kann ihrerseits die Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren um die eingedrungenen Erreger zu eliminieren (7).

Diese Sensorzellen stellen eine Reihe von unterschiedlichen Zelltypen dar. Hierbei geht sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort auf die Aktivität der weißen Blutkörperchen, der Leukozyten, zurück. Die meisten der immunrelevanten Zellen gehen aus dem Knochenmark hervor. Wenige jedoch, wie zum Beispiel die geweberesidente Population an Makrophagen (zum Beispiel Mikroglia), entstehen während der Embryonalphase. Dort werden sie im Dottersack oder in der fetalen Leber gebildet. Diese Zellen besiedeln die unterschiedlichen Organe vor der Geburt und bleiben als konstante, sich selbst erneuernde Population vor Ort. Zytokin gesteuert können jedoch auch Makrophagen im Blutkreislauf zirkulieren und von dort aus immer wieder in Gewebe einwandern und sich dort weiter ausdifferenzieren. Nehmen sie vor Ort Erreger auf und töten diese ab werden sie als Phagozyten bezeichnet. Neben den bereits genannten Zellen fungieren Makrophagen auch als einfache Fresszellen, sogenannte *scavenger cells*. Ihre Aufgabe besteht darin Zellreste und tote Zellen aufzunehmen und zu beseitigen (7).

Mittels Zytokine und Immunmodulatoren können also Makrophagen, Granulozyten und Monozyten eine entsprechende Immunantwort einleiten. Durch mannigfaltige pathogene Strukturen und die Fähigkeit der Erreger zur Mutation scheint es jedoch ein zentrales Problem des angeborenen Immunsystems zu sein zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu differenzieren. Um eine adäquate Unterscheidung treffen zu können wurde im Laufe der Evolution durch komplexe Selektionsmechanismen die sogenannten PRRs entwickelt. Diese sind spezifische Rezeptoren auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen wie auch eosinophilen Granulozyten, die spezielle konservierte Muster von Pathogenen erkennen können. Diese Muster werden von eukaryotisch höher entwickelten Zellen nicht generiert und können somit als Identifikationsmittel genutzt werden. Sie werden als „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet (4). Einige PRRs sind Transmembranproteine, unter anderem TLRs (7).

Doch nicht nur körperfremde Strukturen werden von der angeborenen Immunantwort und ihren Zellen wahrgenommen. Es hat sich gezeigt, dass es eine Reihe endogener Strukturen gibt, die als damage-associated molecular patterns (DAMPs) bezeichnet werden, die von diesen Zellen erkannt werden. Das Erkennen von DAMPs ist biologisch durchaus sinnvoll. Damit werden geschädigte und absterbende Zellen erkannt und eine sterile Entzündung gefördert. Diese spielt eine zentrale Rolle in Gewebereparatur- und Regenerationsmechanismen. Gleichzeitig führen sie aber auch zu zahlreichen Erkrankungen, unter anderem Autoimmunerkrankungen, Stoffwechsel- und neurodegenerativen Erkrankungen (48).

## 2.2 Angeborene Immunrezeptoren

Infektionen tragen wesentlich zur Mortalität von Menschen bei. Da Infektionen eine Limitation der Lebensdauer darstellen, sind Infektionen und die Fähigkeit des menschlichen Organismus diese zu bekämpfen Gegenstand intensiverer Forschungen.

Große Meilensteine in der Bekämpfung dieser Infektionen stellte die Entdeckung der Antibiotika, sicherlich aber auch das Implementieren von Hygienestandards, dar (17).

1995 erhielt Prof. rer. nat. Christiane Nüsslein-Volhard, damalige Direktorin des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie, zusammen mit ihren Kollegen Prof. Eric F. Wieschaus und Edward B. Lewis den Nobelpreis für grundlegende Erkenntnisse zur genetischen Kontrolle der Embryonalentwicklung. Gegenstand ihrer Forschung war die *Drosophila melanogaster* oder auch in der Umgangssprache Taufliege genannt. Nüsslein-Volhard und Wieschaus saßen sich 1985 gegenüber, als sie die ventralisierte Embryonenvariante entdeckten, anstatt der Dorsalen, die bereits allgemein bekannt war. Sie waren derart begeistert, dass sie 'toll' ausriefen, damit erhielt das entdeckte Gen seinen Namen (18).

Wie man sehr schnell entdeckte, stand das entsprechende Gen nicht nur im Dienst der Embryonalentwicklung, sondern war auch Bestandteil der Immunabwehr. 1997 berichtete Medzhitov et al. über ein Homolog des Drosophila-toll-Proteins und entdeckte damit zum ersten Mal die Toll ähnlichen (like) Rezeptoren im Menschen. Er stellte seine Arbeit unter die Annahme, dass es sich bei den Toll-like-Rezeptoren um einen alten Anteil der angeborenen Immunabwehr handle, der evolutionstechnisch in den Vertebraten überlebt habe (19).

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von verschiedenen TL-Rezeptoren identifiziert, insgesamt elf im menschlichen Organismus. Diese elf funktionell unterschiedlichen TLRs werden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 gehören zu den intrazellulären TLRs, während TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 und TLR11 zu den transmembranen TLRs gehören. Zwischen den Vertebraten variiert jedoch die Anzahl der TLRs, sodass eine Maus beispielsweise zwölf TL-Rezeptoren aufweist (22). TLR2 und TLR4 bilden zusätzlich eine Ausnahme, indem sich nicht nur in der Transmembran auftreten, sondern auch interzellulär, in Dendritischen, Endothel- oder Epithelzellen, zu finden sind (24).

Doch nicht nur die Abwehr der Infektionen wurde in den letzten Jahren im Zusammenhang mit den TLRs untersucht. Forschungsergebnisse zeigen, dass in multiplen Autoimmunerkrankungen die TLR eine entscheidende Rolle spielen und damit ein Ansatzpunkt für eine ganz neue Therapiestrategie im Umgang mit diesen Erkrankungen bietet (21,14,13).

Die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort sind jedoch vielfältig. Sie erkennen konservative Muster von infektiösen Erregern und isolierte chemische Strukturen, sogenannte PAMPs und DAMPs (23). Die schadens- und pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (DAMP und PAMP) werden vorrangig durch sterbende oder tote krankheitserregende Zellen freigesetzt. Diese werden anschließend durch die Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) erkannt und eine entsprechende Immunantwort eingeleitet (26). Die unterschiedlichen Zelltypen der angeborenen Immunabwehr produzieren unterschiedliche PRRs. Zu ihnen gehören die TLRs, Nukleotidbindende-Oligomerisierungsdomänenmolekül (NOD)-like-Rezeptoren (NLRs), C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLRs), Komplement-Rezeptor 3 (CR3) und viele andere. Die PRRs erkennen die PAMPs oder andere Strukturen, die von Pathogenen freigesetzt werden und aktivieren eine intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung der Immunantwort (24). Hierunter zählen exemplarisch Lipoteichonsäure (LTA), die TLR2/TLR6-Heterodimere aktivieren, oder virale DNA, die reich an unmethylierten Cytidin-Guanosin-Dinucleotid (CpG)-Motiven ist und TLR9 aktiviert (29).

PRRs können in zwei große Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe stellt die signalisierenden, die andere die nicht-signalisierenden PRRs dar. Nicht-signalisierende Mustererkennungsrezeptoren können sowohl lösliche Faktoren, wie zum Beispiel das C-reaktive Protein oder Lektine, sein als auch Transmembranproteine. Diese nicht-signalisierenden PRRs sorgen für eine Erkennung der schadhafte Mikroorganismen und für deren Abbau über lysosomale Kompartimente. Signalisierende PRRs hingegen umfassen zwar ebenfalls Transmembranproteine, jedoch auch Zytosolproteine. Zu ihnen gehören unter anderem die leucinreichen TLRs, aber auch Nukleotidbindende-Oligomerisierungsdomänenmoleküle (NOD). Zytosol PRRs, wie das Retinsäure-induzierbares Gen I (RIG I), sind in der Lage doppelsträngige RNA zu erkennen (27). Die vorrangigsten aufgelisteten PRRs spiegeln nur einen kleinen Ausschnitt der Vielfältigkeit des angeborenen Immunsystems wieder. Von allen PRRs stellen die TLRs sicherlich die aktuell bestuntersuchten Rezeptoren dar.

### **2.2.1 Toll-like-Rezeptoren – Aufbau und Funktion**

Bis 1998 wurden fünf verschiedene TLR als direkte Homologe der *Drosophila melanogaster* Toll-Gene identifiziert. Beim Menschen befindet sich die genetische Codierung für TLR1, TLR2 und TLR3 auf Chromosom vier. Das entsprechende Gen für TLR4 konnte man auf Chromosom neun nachweisen (25).

Die Toll-like Rezeptoren gehören der Familie der Typ-I-Transmembranrezeptoren an. Wie alle Proteine müssen auch Toll-like Rezeptoren im Zellkern durch die Transkription des entsprechenden Genabschnittes, auf dem dazugehörigen Chromosom, in eine mRNA umgewandelt werden. Anschließend erfolgt die Translation der entstandenen mRNA. Hierbei erfolgt mit Hilfe von Ribosomen eine Umwandlung, der in der Transkription entstandenen mRNA, in eine Aminosäuresequenz. Diese bildet, nach Abschluss der Translation, das entsprechende Protein. Ort der Translation ist hierbei das endoplasmatische Retikulum (ER). Das entstandene Protein wird anschließend in den Golgi-Apparat transportiert, hier erfolgt die funktionelle Reifung der Toll-like Rezeptoren. Im Golgi-Apparat wird, mittels Cathepsin B, L, S, H, K und Asparaginyl-Endopeptidase, eine proteolytische Spaltung der TLRs durchgeführt, welche zur Erkennung der Liganden essentiell ist. Vom Golgi-Apparat aus wird der Transport der entsprechenden TLRs zu der Zellmembran oder den Endosomen koordiniert. Hierbei spielt das Multi-Pass-Transmembranprotein UNC93B1 eine entscheidende Rolle. Es kontrolliert den Transport der entsprechenden TLRs zu den Endosomen. Ein weiteres regulierendes Protein bildet das TLR4 assoziierte Protein PRAT4A, das den Transport zu der Plasmamembran, aber auch zu Endosomen koordiniert (25).

Die in Endosomen oder auf der Zellmembran vorkommenden TLRs kommen unter physiologischen Bedingungen nicht mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder RNA der Wirtszelle in Kontakt. Kommt es jedoch, aus verschiedenen Gründen, zu Kontakt mit der eigenen DNA und RNA, sind diese TLRs mitverantwortlich für die Bildung von Autoantikörpern und somit für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen (25).

Bei Nukleinsäure sensiblen Toll-like Rezeptoren erfolgt, in einem weiteren Schritt, eine proteolytische Spaltung. Diese führt zur Reifung der Toll-like Rezeptoren unter Einwirkung von Cathepsin B, S, L, H, K und Asparaginyl-Endopeptidase. Dieser Schritt ist entscheidend dafür, dass diese Toll-like Rezeptoren letztendlich ihre Liganden als solche erkennen und damit die angeborene Immunantwort auslösen können (25).

Wie bereits erwähnt werden einige Toll-like Rezeptoren, wie zum Beispiel TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12, auf der Zelloberfläche exprimiert. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 werden jedoch intrazellulär exprimiert, in vesikulären Kompartimenten, wie zum Beispiel in Endosomen. Hierbei bilden TLR2 und TLR4 die Ausnahme. Sind die anderen Toll-like-Rezeptoren, nach aktuellem Stand der Wissenschaft, nur streng intra- oder extrazellulär zu finden, kann man TLR2 und TLR4 in beiden Bereichen detektieren. Sie kommen in Dendritische, Endothel- und Epithelzellen vor (25).

TLR4 kommt hierbei, bei der Initiierung von inflammatorischen Antworten, eine große Bedeutung zu. Erst kürzlich wurde in Forschungen entdeckt, dass TLR4 auch an der kanonischen Aktivierung des NRLP3-Inflammasoms beteiligt ist. Inflammasomen nehmen eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunität ein. Sie kommen als große Multiproteinkomplexe vor, die maßgeblich an der Reifung von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt sind. Im Falle des NRLP3-Inflammasoms handelt es sich um IL-1 $\beta$  und IL-18, welche als Pro-IL-1 $\beta$  und Pro-IL-18 gebildet werden. Dabei handelt es sich um die inaktive Vorstufe der Zytokine. Der multimere Komplex des NRLP3-Inflammasoms besteht aus NRPL3, Apoptosis-associated speck-like protein (ASC), (NIMA)-related kinase 7 (NEK7) und Pro-Caspase 1. Nach der Aktivierung von Caspase 1 katalysiert diese die Proteolyse von Gasdermin D. Dieses führt letztendlich zur Umwandlung von Pro-IL-1 $\beta$  in IL-1 $\beta$  und von Pro-IL-18 in IL-18. Die entsprechenden Zytokine führen zu einer speziellen Form der Zelloptose, der Pyroptose. Durch Sekretion von pro-inflammatorischen Botenstoffen und Pyroptose kommt es zur Initiierung einer starken Entzündungsreaktion. Mutationen können zu entsprechender Überaktivierung des Inflammasoms führen, was wiederum zu chronischen Entzündungen oder Autoimmunentwicklungen führen kann. Wie die genauen zellulären Regulationsmechanismen fungieren, die zur Bildung eines aktiven Inflammasoms führen, ist

aktuell Gegenstand der Forschung. Bekannt ist aber, dass die NLRP3 Expression Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)-abhängig ist. Somit sind sowohl der Myd88-abhängige als auch der -unabhängige Weg in der Lage bei der Bildung eines Inflammasoms mitzuwirken. Beide Wege werden nun im Folgenden erklärt (32).

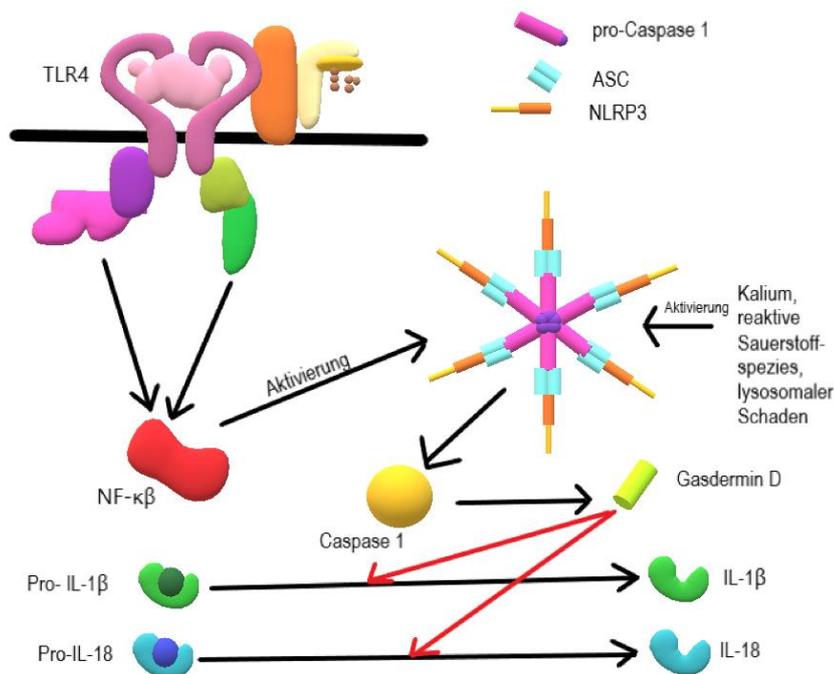


Abbildung 3: Aktivierung und Signalweg des NLRP3-Inflammasom mit IL-1 $\beta$  und IL-18-Aktivierung

Das geschilderte Beispiel zeigt jedoch deutlich die Bedeutung des TLR4 auf. Trotz des Wissens um den TLR4, seit ungefähr 27 Jahren, ist dieser Signalweg immer noch Ansatzpunkt vielfältiger und klinisch relevanter Forschungen.

### 2.2.2 Lipopolysaccharide (LPS)

TLR4 reagiert hauptsächlich auf LPS und Lipooligosaccharide (LOS), welche auf gramnegativen Bakterien zu finden sind. LPS ist ein Hauptbestandteil der Membran von gramnegativen Bakterien. Die chemische Zusammensetzung ist charakterisiert durch ein Polysaccharid, dem sogenannten O-Antigen und dem kürzeren Oligosaccharid. Bei letzterem handelt es sich um die Kernregion, die an eine Glykolipid-Einheit gebunden ist. Diese wird als Lipid A bezeichnet. Lipid A entspricht dem minimalen Anteil des LPS, der notwendig ist um über eine Bindung an CD14 und anschließend eine Bindung an die TLR4 / MD-2-Dimere, auf der Plasmamembran, auszulösen (16).

LPS gehört zu den am besten erforschten immunmodulierenden Bestandteilen der Bakterien. Bei übermäßigem Auftreten des LPS kann es zu einer stark ausgeprägten Entzündungsreaktion, bis hin zur Sepsis, kommen (28).

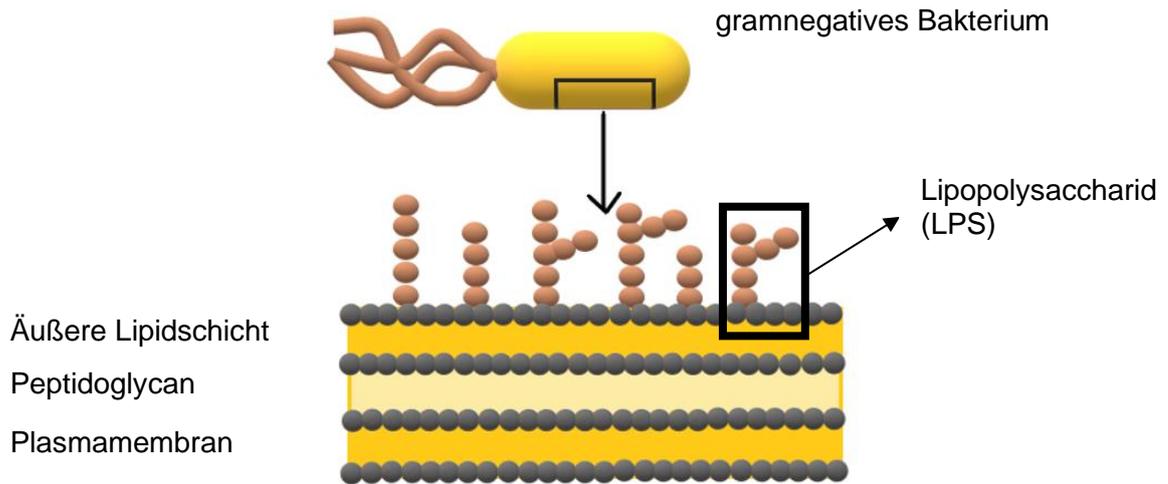


Abbildung 4: Aufbau einer Bakterienwand eines gramnegativen Bakteriums

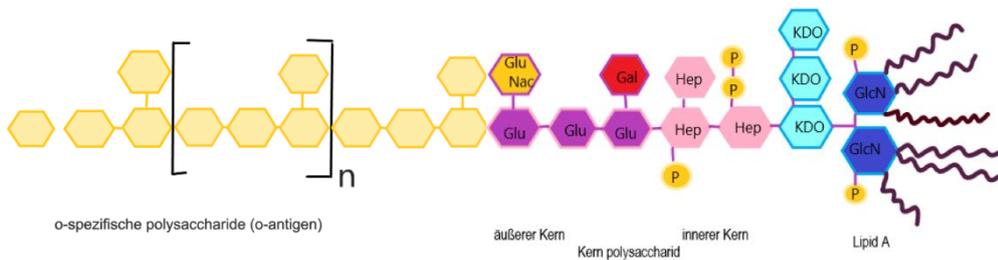


Abbildung 5: Struktur des Lipopolysaccharids, Adapted from reference (68)

### 2.2.3 Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP)

Hierbei handelt es sich um ein 60 k-Da großes Serumprotein. Dieses zählt zu den Akutphaseproteinen und wird konstitutiv in den Hepatozyten synthetisiert. Es erhöht die Sensibilität der CD14-Zellen gegenüber LPS erheblich. LBP ist ein stark ausgedehntes Protein, was in drei Domänen unterschieden werden kann. Hierzu gehören die N-terminale Domäne, die zentrale Domäne und die C-terminale Domäne. Der an der N-terminalen Ebene vorhandene Aminoterminus ist für die Bindung von LPS verantwortlich. Der an der C-terminalen Domäne vorhandene Carboxyterminus entsprechend für die Übertragung auf den CD14 Bereich. Somit fungiert es als Lipidtransportprotein, das katalytisch LPS-Monomere auf CD14, in Form von Aggregaten, überträgt. Zusätzlich zeigen Studien, dass High-Density-Lipoproteine (HDL) mit LBP interagieren und LPS auch in HDL-Komplexe übertragen. Damit kommt es zur Neutralisierung der inflammatorischen Wirkung von LPS. Eine hohe Konzentration an LBP kann die Aktivität von LPS verringern und stellt somit einen Schutz vor hyperinflammatorischen Reaktionen, wie zum Beispiel die eines septischen Schocks, dar.

Somit kommt dem LBP eine besondere Doppelbedeutung im Signalweg des Toll-like Rezeptor 4 zu, da er sowohl die Sensitivität gegenüber LPS erhöht, es aber auch gleichzeitig eliminiert und somit den Organismus vor Schäden schützt (50).

#### **2.2.4 CD14**

Bei CD14 handelt es sich um ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Protein, welches vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Auf Neutrophilen und Granulozyten wird ebenfalls CD14 exprimiert, nur in wesentlich geringerem Umfang. Das entsprechende menschliche Gen besteht aus zwei Exonen und befindet sich auf Chromosom fünf. Das entsprechend codierte Protein besteht aus 356 Aminosäuren, vor allem aus Leucin Wiederholungen. Eine Mutation der Aminosäure 39 bis inklusive 44 führt zu einem Verlust der Fähigkeit LPS zu binden. Ein Anteil von 3-4 µg/ml der CD14 Rezeptoren liegt als löslicher, freier Anteil im Serum vor und ist somit in der Lage LPS bereits frühzeitig zu binden und blockiert somit die zelluläre Aktivierung (30).

Der CD14 Rezeptor stellt ein Monozytendifferenzierungsantigen dar, das in die Kategorie der Mustererkennungsrezeptoren fällt. Als man initial den CD14 Rezeptor entdeckte, wurde bezweifelt, dass er, aufgrund seines fehlenden intrazellulären Anteiles, an einer intrazellulären Signalkaskade mitwirken kann. Im Verlauf der weiteren Forschungen und gerade mit der Fokussierung auf die Toll-like Rezeptoren erkannte man, dass CD14 einen Co-Rezeptor für den TLR4 Signalweg darstellt. Damit wurde der CD14 Rezeptor Bestandteil der angeborenen Immunantwort. In den letzten zehn Jahren wurde der Rezeptor jedoch auch für den Transport von entzündlichen Lipiden, zur Initiierung der Phagozytose, bekannt (29).

#### **2.2.5 TLR4-Signalweg**

Auch wenn der TLR4-Rezeptor der Initiator des inflammatorischen Signalweges ist, kann der Rezeptor alleine keine Aktivierung der entsprechenden intrazellulären Strukturen bewirken. Das durch eine erhöhte Bakterienlast anfallende freie LPS wird durch LBP gebunden. Dies ermöglicht die Übertragung auf CD14 und die initiale Erhöhung der Sensitivität für das *in vivo* anfallende LPS. CD14 wiederum überträgt LPS auf den TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex. MD2 ist ein nicht kovalent an TLR4 gebundenes lösliches Protein, das die LPS Erkennung moduliert. Nach aktueller Studienlage gibt es keinen Hinweis darauf, dass TLR4 eigenständig in der Lage ist LPS zu binden. Somit ist der Rezeptor abhängig von seinen Co-Rezeptoren, um die inflammatorische Reaktion auf anfallende Pathogene zu initiieren (28).

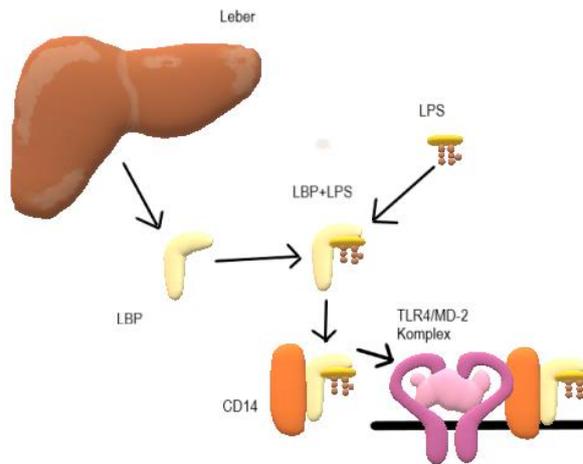


Abbildung 6: LPS Bindung und Aktivierung der Signalkaskade

Hexa-acyliertes und bisphosphoryliertes LPS lösen eine sehr starke Antwort des TLR4 aus. Sie kommen zum Beispiel in *Escherichia coli* vor. Im Gegensatz dazu weisen unteracyliertes oder dephosphoryliertes LPS nur eine sehr schwache entzündungsfördernde Aktivität auf. Diese Art des LPS kommt besonders bei Bakterien vor, die den Darm besiedeln. Hierzu zählen unter anderem die Actinobakterien, zu denen die *Bifidobakterien* gehören, oder die Proteobakterien, mit dem *Escherichia coli* als Vertreter. Diese Bakterien entziehen sich somit den PRR, was biologisch sinnvoll ist, da diese Bakterien nützliche Funktionen erfüllen. Unter anderem unterstützen diese die Verdauung, Schützen die Darmschleimhaut und sind sogar an der Produktion wichtiger Vitamine, wie zum Beispiel Vitamin K, beteiligt. Als zusätzlicher protektiver Faktor zeigt sich im Darm die Undurchlässigkeit des Darmepithels. Dieses verhindert den Übertritt von LPS in den Blutkreislauf und somit auch eine systemisch-inflammatorische Reaktion (32).

Nach der Erkennung des LPS durch TLR4 durchläuft der Rezeptor eine Oligomerisierung. Diese ist wichtig, um die nachgeschaltete Signalkaskade zu aktivieren und geschieht durch Interaktion mit den sogenannten Toll-Interleukin-1-Rezeptoren, auch TIR-Domänen genannt. Es sind insgesamt fünf intrazelluläre TIR-domänenhaltige Adapterproteine bekannt. Myeloid differentiation primary response protein (MyD88), TIR-domain-containing adaptor Protein (TIRAP), TRIF-related adaptor molecule (TRAM), Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein (SARM) und TIR domain-containing adaptor-inducing INF- $\beta$  (TRIF). TRIF-abhängige Signaltransduktionen induzieren die Bildung von Interferon- $\beta$  (INF- $\beta$ ). Alle Toll-like Rezeptoren besitzen den ein oder anderen dieser Adapterproteine. Einzig und allein TLR4 interagiert jedoch mit allen fünf genannten Adapterproteine. Die Adapterproteine binden an die TIR-Domäne des TLR4 und interagieren wiederum, durch ihre eigene TIR-Domäne, mit dem Rezeptor. Somit können entsprechende Signalkaskaden aktiviert werden (28).

In einigen Studien erwiesen sich Myd88-defiziente Mäuse als widerstandsfähiger gegen einen septischen Schock, weshalb das Adapterprotein immer wieder Gegenstand aktueller Forschungen ist. TIRAP-defiziente Mäuse verhielten sich in den Studien ähnlich zu den Myd88-defizienten Mäusen. Die Studien zu TRIF und TRAM zeigten, dass sie einen Myd88-unabhängigen Weg aktivierten. Die Rolle von SARM *in vivo* ist aktuell noch unklar (28).

Nach der Bindung des gesamten Komplexes, CD14 und LBP, an den TLR4 und dessen Übertragung von LPS Monomeren auf MD-2 spaltet sich die Signalkaskade in zwei optionale Wege über die Aktivierung von TIRAP und TRAM auf. Die Aktivierung von TIRAP führt zu dem Myd88-abhängigen Signalweg, während TRAM zum Myd88-unabhängigen Signalweg führt (28).

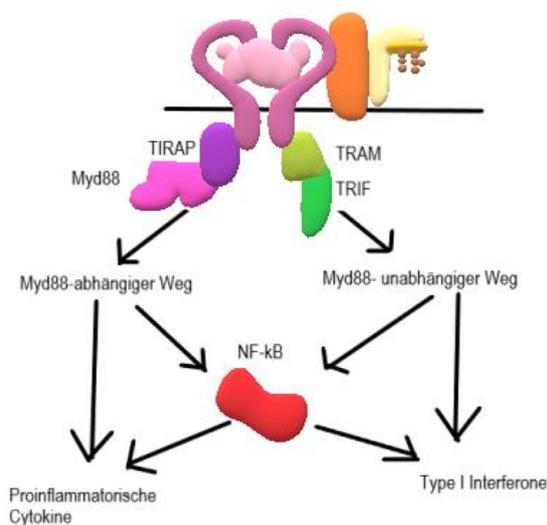


Abbildung 7: Aufspaltung der TLR4-Signalkaskade nach TIRAP und TRAM

### 2.2.5.1 Myd88-abhängiger Signalweg

Zusätzlich zur TIR-Domäne weist das Myd88 eine sogenannte Todesdomäne auf. Kommt es jetzt zur Aktivierung von Myd88, durch LPS, rekrutiert diese eine Todesdomänenhaltige Kinase, die sogenannte IL-1-Rezeptor- assoziierte- Kinase-4 (IRAK4). Diese ist für die Aktivierung und den Abbau von IRAK1 zuständig. Ein Versuch mit IRAK1 defizienten Mäusen zeigte jedoch, dass es nur zu einer teilweisen Einschränkung in der proinflammatorischen Zytokinproduktion kommt. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass es einen weiteren Akteur gibt, der durch IRAK4 aktiviert wird (28).

Neuere Daten haben gezeigt, dass es zusätzlich zu der IRAK1 Aktivierung ebenfalls eine IRAK2 Aktivierung gibt. Infolge des durch TIRAP aktivierten MyD88, kommt es zur Bindung von IRAK1 und 2 durch Myd88. Dieses bildet mit den beiden Proteinen ein submembranöses

Signalkomplex, der Myddosom genannt wird. Das Myddosom rekrutiert anschließend TRAF6. TRAF6 oder auch TNF-assoziiertes Faktor 6 genannt, geht einen Komplex mit dem Ubiquitin-konjugierten Enzym 13 (UBC13) und Ubiquitin-konjugierten Enzym E2-Variante 1 Isoform A (UEV1A) ein. Diese Verbindung führt zur Aktivierung einer Signalkaskade mit der sogenannten transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$ -aktivierten Kinase 1 (TAK1). Durch Aktivierung und Phosphorylierung der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase  $\alpha/\beta$  kommt es zur Kerntranslokation des NF- $\kappa\text{B}$  Transkriptionsfaktors. Zusätzlich kommt es zur Phosphorylierung von mitogen-activated protein (MAP)-Kinasen, welche zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie Aktivator-Protein-1 (AP-1) und cAMP response element-binding Protein (CREB), führen (32).

Studien mit Myd88-defizienten Mäusen zeigten, dass die Produktion von MAP-Kinasen und NF- $\kappa\text{B}$  sich zwar verzögert, aber nicht aufgehoben ist. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass sowohl MAP-Kinasen als auch NF- $\kappa\text{B}$  ebenfalls über den Myd88-unabhängigen Weg aktiviert werden können (28).

Letztendlich induziert der Myd88-abhängige Weg die Produktion von entzündungsfördernden Mediatoren, wie zum Beispiel TNF $\alpha$ , Interleukin-6 (IL-6), Cyclooxygenase 2 und Typ-III-Interferone (32).

Zusätzlich zu dieser Signalkaskade gibt es noch den Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5). In Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass IRF5 mit Myd88 assoziiert ist und auf noch unbekanntem Wege aktiviert wird. In den IRF5-defizienten Mäusen zeigte sich die IL-6- und TNF- $\alpha$ -Antwort teilweise defekt (28).

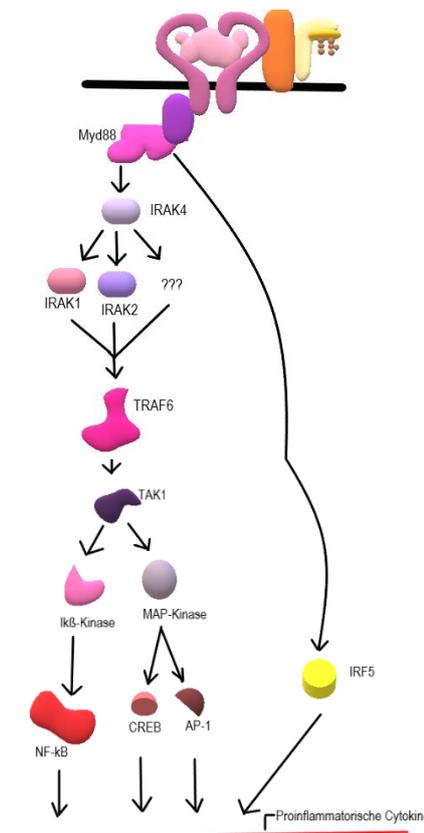


Abbildung 8: Darstellung des Myd88-abhängigen TLR4-Signalwegs

### 2.2.5.2 Der Myd88-unabhängige Weg

Wie bereits erläutert handelt es sich bei TRIF um ein TIR-haltiges Adapterprotein, welches ausschlaggebend für den Teil der TLR4 Signalkaskade ist, der nicht von Myd88 gesteuert wird (28).

Nach der Aktivierung durch TLR4 erfolgt die Aktivierung der Ubiquitin-Ligase TNF receptor associated factor 3 (TRAF3). TRAF3 sorgt für eine Aktivierung von TANK-bindender Kinase 1 (TBK1) und IκB Kinase ε (IKKε). Diese phosphorylieren das entsprechende Konsensmotiv pLxIS, welches eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung des Interferons regulierenden Faktor 3 (IRF3) spielt. TBK1 phosphoryliert nicht nur TRAF3, sondern auch IFR3. Zunächst ist IRF3 noch durch TRAF3 gebunden, dissoziiert dann jedoch und transloziert in den Zellkern. Im Zellkern induziert IRF3 dann die Expression von Typ I Interferon, Chemokin CCL/RANTES und entzündungshemmenden IL-10 (32).

Das C-terminale Ende von TRIF enthält Rip homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM), welches eine Interaktion mit dem Rezeptor interagierenden Protein 1 (RIP1) ermöglicht. RIP1 ist mit seinen Serin- und Threoninkinasen dafür verantwortlich, dass NF-κB aktiviert wird. Studien mit

Myd88- und RIP1-defizienten Mäusen zeigten eine fehlende NF- $\kappa$ B Aktivierung. Zusätzlich aktiviert RIP1 MAP-Kinasen, die zu einer entsprechenden AP-1 Aktivierung führen (28).

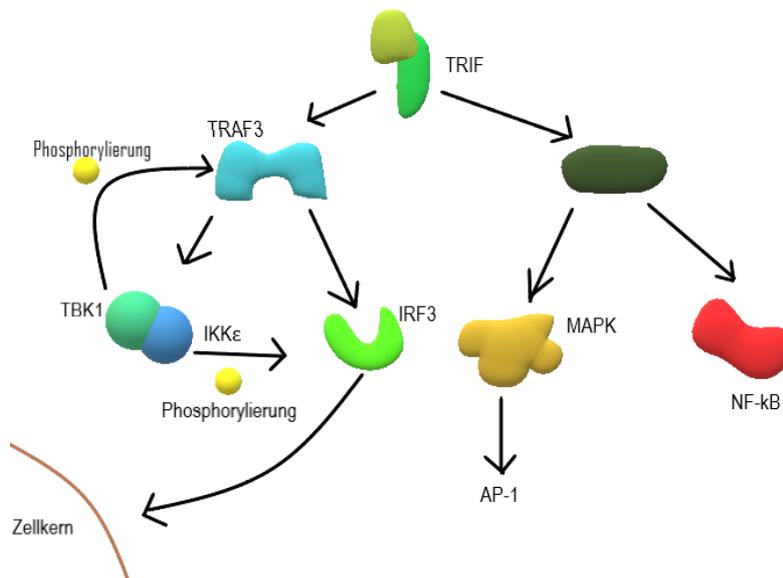


Abbildung 9: Darstellung des Myd88- unabhängigen TLR4-Signalwegs

### 2.2.5.3 Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase-4

Das zur IRAK-Familie gehörende Protein weist sowohl eine Todesdomäne als auch eine Kinase-Domäne auf. Es zählt zu dem wichtigsten Protein der IRAK-Familie, da es Hinweise darauf gibt, dass eine Aktivierung und Signalgebung über IL-1R/TLR ohne dieses Protein nicht möglich wäre. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass IRAK4 für die Aktivierung und den Abbau von IRAK1 zuständig ist. Studien zeigen bei gezielter Deletion von IRAK4, in entsprechenden Mäusen, schwere Störungen in der Zytokinreaktion und in der nachgeschalteten Signalkaskade von TLR4. Es wurden ebenfalls Menschen mit einem IRAK4 Mangel identifiziert. Diese zeigten sich in der Kindheit über die Maße infektanfällig, vor allem durch *Staphylococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*. Mit zunehmendem Annähern an die Adoleszenzphase verringerte sich jedoch die Infektanfälligkeit wieder. Durch Röntgenkristallographie konnte die Struktur des IRAK4 aufgeklärt werden. Hierbei wurde festgestellt, dass IRAK4 eine kanonische Faltung klassischer Proteinkinasen annimmt. Hierbei untergliedert sich das Protein entsprechend in einen N-Loop, C-Loop und eine N-terminale Erweiterung im N-Loop. Gegenstand aktueller Forschungen sind selektive niedermolekulare Inhibitoren. Diese sollen die IRAK4-Kinaseaktivität vermindern und somit als potenzielle Therapiemöglichkeiten für Autoimmun- und entzündliche Erkrankungen fungieren (33).

### 2.2.5.4 Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3)

Bei den Proteinen, die den IRFs angehören, handelt es sich um eine Reihe von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren für Gene der Immunantwort fungieren. Die initial entdeckten IRF-Proteine waren IRF1 und IRF2. Erst spätere Forschungen zeigten das IRF3 und das eng

verwandte IRF7 eine zentrale Bedeutung in der IRF-Familie einnehmen. IRF3 wird konstitutiv in Zellen exprimiert und ist daher ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Es ist unter anderem ein entscheidender Faktor für die Etablierung eines antiviralen Zustandes der Zelle bei Virusinfektionen und Resistenzbildungen gegen Viren. Der Kontakt mit PRRs führt zu einer Hyperphosphorylierung von IRF3, was wiederum zu einer Förderung der Homodimerisierung, Transkriptionsaktivität, Assoziation mit anderen Proteinen und sogar seinen zellulären Export führt. Studien haben gezeigt, dass Virusinfektionen durch IRF3 so grundlegend gestört wird, dass die meisten Viren entsprechende Virulenzfaktoren gebildet haben, welche die Hyperphosphorylierung, Dimerisierung und Transkriptionsaktivität von IRF3 verzögern oder verlangsamen. Die Expression des IRF3 Gens ist im menschlichen Genlocus auf Chromosom 19 zu finden. IRF3 ist an multiplen Signalkaskaden, unter anderem an TLR3, TLR4 und retinsäureinduzierbaren Gen I, beteiligt. In allen Signalwegen erfolgt eine rasche Phosphorylierung von IRF3, die aber immer abhängig von unterschiedlichen Kinasen ist. Im TLR4 Weg ist dies unter anderem TBK1. IRF3 trägt unter anderem zur Bildung von Interferon beta (IFN- $\beta$ ), verschiedenen Zytokinen und Chemokinen bei (34).

#### **2.2.5.5 Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5)**

Während IRF3 in allen Immunzellen exprimiert wird, wird IRF5 lediglich in Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Untersuchungen zeigen, dass IRF5 über die Polarisierung von Makrophagen entscheiden. Zellen die einen hohen Anteil von IRF5 aufweisen neigen zu einer M1-Polarisation, während ein niedriger Anteil an IRF5 zu einer M2-Polarisation führt. Kurz nach einer Verletzung strömen M2-polarisierte Makrophagen in das verletzte Gebiet ein. Diese kurze Phase wird anschließend durch das Einströmen von M1-polarisierten Makrophagen abgelöst. Diese M1-polarisierten Makrophagen sorgen für eine prolongierte Heilung und Organdysfunktionen. Dies ist der Grund warum IRF5 und vor allem die Hemmung seiner Aktivität immer wieder Ziel wissenschaftlicher Arbeiten ist (35).

#### **2.2.5.6 Endotoxin Toleranz**

Injektionen von LPS (auch Endotoxin genannt) in hohen Dosen sind vergleichbar mit einem septischen Schock. Es induziert Gewebeschäden, Dysregulationen der Körperkerntemperatur und kann tödlich sein. Studien haben aber gezeigt, dass Injektionen mit niedrigerer, nicht-tödlicher Dosis eine Art 'LPS-Toleranz' in den Versuchstieren bewirken können. Dabei zeigen sich zwei hauptsächliche Effekte. Den ersten Effekt entdeckte Paul Beeson bereits 1946. Zu dieser Zeit unterzogen sich Patienten einer sogenannten Fiebertherapie. Sie ließen sich geringe Dosen an Thyphusimpfstoff spritzen, gerade genug um Fieber zu entwickeln. Paul Beeson entdeckte dabei, dass die Patienten in der Folge immer höhere Dosen benötigten um Fieber zu entwickeln. Er übernahm diese Beobachtung und führte verschiedene

Tierexperimente durch. Letztendlich zeigte sich, dass es durch die niedrig dosierte LPS Injektion zu einer Art Immunsuppression kommt, die vor einigen Arten Zytokin-induzierter entzündlicher Schäden schützen kann. Tägliche Injektionen führten zu einem höheren Schutz, zumindest, bis der maximale Spiegel erreicht wurde, der sich sehr variabel bei jedem Individuum zeigte. Da TLR4 ein Hauptakteur in der Vermittlung der entzündlichen Genese durch LPS darstellt, wurde in Studien die Reaktion der Signalkaskade auf rezidivierende Stimulationen geprüft. Hierbei wurden die entsprechenden Zellen längere Zeit mit LPS stimuliert. Dabei zeigte sich, dass die LPS induzierte MyD88-TLR4-Assoziation, die IRAK-Aktivität, den nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor, alpha ( $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ ) und die Aktivierung von p38, c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und NF $\kappa\text{B}$  verminderten. Zudem konnte festgestellt werden, dass die länger andauernde LPS-Stimulierung zu einer Erhöhung der negativen Feedback-Mechanismen im TLR4 Signalweg führten. In Studien mit Ausschaltung dieser negativen Feedback-Mechanismen zeigte sich dennoch eine erhöhte Toleranz. Deshalb vermuten Forscher weitere Regulierungsmechanismen, die zur LPS-Toleranz beitragen (45).

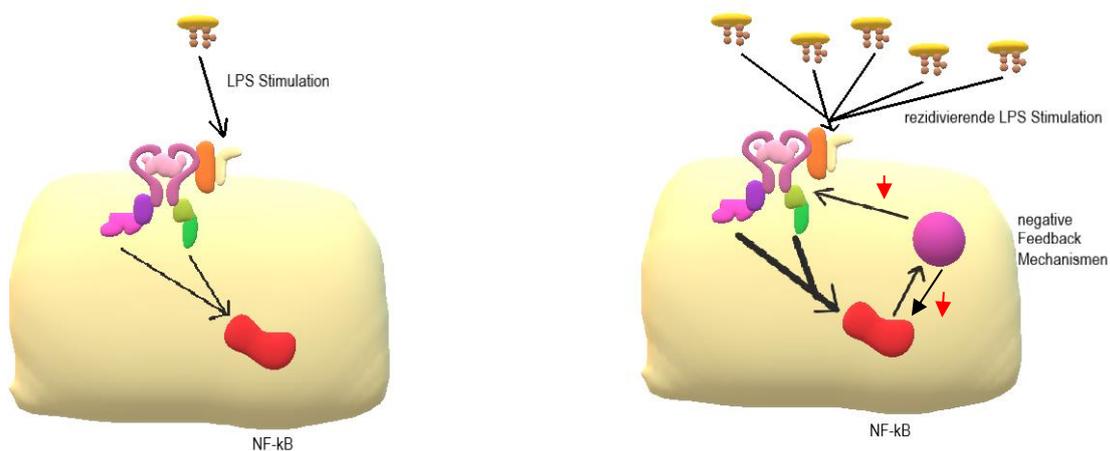


Abbildung 10: Endotoxin Toleranz durch rezidivierende Stimulation des TLR4 und Aktivierung des negativen Feedbackmechanismus

Der zweite Effekt ist bei weitem noch nicht so ausführlich untersucht und beschrieben wie der erste Effekt. Hierbei handelt es sich um Veränderungen der Genexpression. Hierbei scheint die Expression sogenannter „nicht tolerierbarer Gene“ erhöht und ein gewisser Schutz vor systemischen Infektionen hergestellt zu werden. Nicht tolerierbare Gene sind LPS-induzierbare Gene, die in der Lage sind der unterdrückenden Wirkung der LPS-Toleranz, bezüglich ihrer Genexpression, zu entkommen. Es wurde beobachtet, dass diese Gene eine längere Zeit an Stimulation benötigen um unterdrückt zu werden. Ist dieses Maß erreicht, wird ihre Expression durch die Toleranzwirkung jedoch gesteigert, anstatt minimiert zu werden. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Gene wie *Il1rn*, *Tnfr-2* und *Il10* und *Vacm1*. Man vermutet, dass diese Gene eine antimikrobielle Funktion haben. Dies konnte jedoch aktuell

nicht anhand von Studien belegt werden. Zudem zeigt sich, dass es auch Gene gibt die dynamisch reguliert werden, um ihren nicht tolerierten Status zu erhalten. Zum Beispiel kann es zu einer Histon-H3K4- Trimethylierung am Promotor kommen. Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der Il-6 Unterdrückung während der Toleranz. Zudem konnten einige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die ebenfalls die Wirkung der Toleranz minimierten. Viele weitere Prozesse, wie Enhancer, Nukleosomenpositionierung, DNA-Methylierung und lange nichtcodierende RNAs, wurden zudem untersucht und scheinen in dem komplexen Mechanismus der LPS-Toleranz mitzuwirken. Da LPS einen starken Entzündungsmechanismus in Gang setzt, ist es wichtig und sinnvoll, dass die LPS Toleranz über viele Zweigstellen reguliert wird. Damit ist es jedoch wesentlich schwieriger einen genauen Mechanismus als Ansatzpunkt zu definieren, um geeignete Therapieansätze zu finden. Zudem scheint die LPS-Toleranz *in vivo* nur für einige Wochen anzuhalten und ist somit für die Entwicklung immunmodulatorischer Therapieansätze für chronisch-krankte Patienten eher nicht geeignet (45).

Aktuelle Studien zeigen, dass diese Endotoxin-Toleranz jedoch noch nicht pränatal besteht. Lotz et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass pränatal die intestinalen Epithelzellen noch nicht auf LPS reagieren. Es konnte beobachtet werden, dass in Mäusen, die man nach der Geburt der mikrobiell besiedelten Umgebung aussetzte, einen raschen Anstieg von entzündungsfördernde Chemokinen erfolgte. Dazu zählte unter anderem die Aktivierung von dem Makrophagen-Entzündungsprotein 2 (MIP-2), der Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  und die Kerntranslokation von NF- $\kappa$ B p65. Hierbei konnte ein Peak der entsprechenden Werte nach ungefähr zwei Stunden beobachtet werden. Nach sechs Stunden erfolgte eine rasche Normalisierung der Werte. Unter den ansteigenden Chemokinen zeigte sich jedoch keine vermehrte Gewebeeinfiltration proinflammatorischer Zellen. Unter anderem zeigen sich hierfür negative Feedback-Mechanismen, wie die Herunterregulierung von IRAK1, als verantwortlich. Es zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen Tieren die vaginal geboren wurden und jenen, die via Kaiserschnitt entbunden wurden. Bei Tieren, die über Kaiserschnitt geboren wurden, zeigte sich keine spontane Aktivierung der intestinalen Epithelzellen. Der Erwerb der intestinalen LPS-Resistenz geschieht also unmittelbar nach der Geburt, in Abhängigkeit des Geburtsmodus. Dieser Prozess ist wichtig, um eine mikrobielle Besiedelung und die Entwicklung einer Homöostase zwischen Darmepithel des Wirtes und der Mikroben zu ermöglichen (51).

## **2.3 Darmmikrobiota**

Historisch gesehen sind Bakterien bereits vor menschlichen Leben auf der Erde gewesen. Es wird vermutet, dass bis zu 37% des menschlichen Genoms auf bakterielle Vorfahren zurückgehen könnte (37).

Die Entwicklung der Besiedelung des menschlichen Darms war in den letzten Jahren besonders im Fokus der Wissenschaft. Es wurden viele Anstrengungen unternommen, um die Entwicklung der mikrobiellen Flora des Darms nachzuvollziehen. Hierbei wurde herausgefunden, dass die Besiedelung des Darms besonders im Säuglingsalter noch ein dynamischer Prozess ist. Dieser stabilisiert sich im Verlauf der Entwicklung des Kindes, zeigte jedoch weiterhin signifikante Unterschiede zu der Mikrobiota von Erwachsenen. Die Art der Geburt, eventuelle antibiotische Therapien, aber auch die Ernährung nehmen dabei Einfluss auf deren Zusammensetzung (53).

Wenn wir im Alltag mit Bakterien in Kontakt kommen, schreiben wir ihnen gemeinhin einen gewissen Krankheitswert zu. Dabei sind wir allein auf dem größten Organ des Menschen, der Haut, mit rund 10000000000 Bakterien besiedelt. Die transiente und residente Hautflora schützt uns vor Krankheit und schädlichen Einflüssen der Umwelt.

In den letzten Jahren ist der Einfluss von Bakterien und deren Co-Existenz auf unserer Körperoberfläche mehr in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten gerückt. Hierzu zählt auch die Besiedelung des Darmes mit Bakterien und deren Folgen bei Schädigung oder Veränderung eben dieser.

### **2.3.1 Definition und Entwicklung**

Die Darmmikrobiota gehört zu einem der am dichtesten besiedelten mikrobiellen Ökosystemen. Unter der intestinalen Mikrobiota versteht man die Gesamtheit aller Mikroorganismen die den Darm besiedeln. Hierbei zeigt sich, dass die größte Anzahl von Mikroorganismen sich im Gastrointestinaltrakt befindet. Danach folgt die Mundhöhle und an dritter Stelle die Haut. Frauen zeigen zusätzlich eine vaginale Besiedelung von verschiedenen Mikroorganismen. Im Darmbereich handelt es sich primär um die Besiedelung durch Bakterien, aber auch Viren und Pilze konnten identifiziert werden. Durch neuere Forschungsmethoden in Form von Next-Generation-Sequencing und Metabolomics hat man mittlerweile eine recht genaue Vorstellung über die Zusammensetzung, aber auch die Stoffwechselaktivitäten der Darmmikrobiota (38).

Bereits 1999 konnte Björkstén in seinen Untersuchungen unterschiedliche Zusammensetzung in der kindlichen Darmflora nachweisen. Hierbei lag der hauptsächliche Fokus auf Kindern die Allergien aufwiesen und jenen die keine Allergien hatten. Damit wurde bereits 1999 der Transfer zwischen Darm und anderen Organsystemen hergestellt. 2007 wurde mit der 16S-rRNA-Gensequenzierung ein ganz neues Verständnis für die Darmmikrobiota und deren Zusammensetzungen geschaffen. Denn diese Variante ermöglichte es auch Bakterien zu sequenzieren, die man nicht kultivieren konnte (39).

Verschiedene Forschungen haben gezeigt, dass die Mikrobiota des Darms, ähnlich wie der Wirtsorganismus selbst, einem gewissen Reifungsprozess unterliegt. Ursprünglich hatte man vermutet, dass Embryonen keimfrei im Uterus der Mutter aufwachsen. Diese These wurde revidiert, als man *Proteobakterien*, *Actinobakterien* und *Firmicutes Phyla* in Mekonium, Fruchtwasser und in der Plazenta nachgewiesen hat. Dennoch zeigt sich die Thematik weiterhin als höchst umstritten (36).

Mit zunehmendem Alter verändert und entwickelt sich auch die Darmmikrobiota des Wirtes. Dabei steht sie in starkem Zusammenhang mit externen Faktoren, welche diese Entwicklung beeinflussen. Hierbei handelt es sich um Stress, Antibiotikaeinnahme, Ernährung, Medikamente, Darminfekte aber auch der Geburtsmodus (38).

Studien zeigten, dass sowohl der Geburtsmodus, sprich vaginale oder Sectio Entbindung, als auch die Säuglingsernährung (Muttermilch gegen Fertignahrung) einen Einfluss auf die Bildung und Entwicklung der Darmmikrobiota haben. Kinder, die per Kaiserschnitt entbunden wurden, zeigten vor allem eine Anreicherung von Hautbakterien und Bakterien aus der Umgebung. Dabei zeigten sich unter anderem *Enterobacter hormaechei*, *Hämophilus haemolyticus* und der *Staphylococcus saprophyticus*, um nur einige zu nennen. Bei Kindern, die hingegen vaginal entbunden wurden, zeigte sich die Darmmikrobiota abhängig von der vertikalen Übertragung zwischen Mutter und Kind (36).

Doch trotz vielfältiger Übereinstimmungen in der Zusammensetzung unterscheiden sich die Darmmikrobiota der einzelnen Personen. So sind ungefähr ein Drittel der Darmmikrobiota gleich bei jedem Menschen. Zwei Drittel jedoch sind ganz individuell auf den jeweiligen Menschen zugeschnitten (39). Das liegt sowohl an internen, genetischen, als auch externen Einflüssen, deren Intensivität und Vorhandensein sehr individuell sind. Letztendlich zeigt sich hier noch ein weites Feld an Forschungsbedarf, da vor allem die assoziierten Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Fettleibigkeit und Herz-Kreislaufkrankungen, eine wichtige gesellschaftsrelevante Komponente darstellen (36). 2017 gab das Bundesamt für Statistik eine

Pressemitteilung heraus, in der sie die teuersten Krankheitsposten auflistete. Dabei zeigte sich, aus Daten von 2015, dass Herz-Kreislaufkrankungen unserem Gesundheitssystem im Jahr ungefähr 46,4 Milliarden Euro kosten. Als zweites folgten psychische Erkrankungen mit 44,4 Milliarden Euro, gefolgt von dem Verdauungssystem mit 34,2 Milliarden Euro. Dies zeigt, dass die Ausgaben für diese Erkrankungen erheblich sind. Ein tieferes Verständnis der Kausalzusammenhänge und eventuelle Therapien könnten also die Ausgaben des Gesundheitssystems enorm reduzieren (54).

### 2.3.2 Funktion

Ursprünglich ging die Forschung davon aus, dass Reize aus der Umwelt direkt auf unseren Zelloberflächen ankommen. Die wissenschaftlichen Untersuchungen zeigen eine Vielzahl von Rezeptoren und anderen Werkzeugen auf, die in der Lage sind extern ankommende Reize aufzunehmen und über intrazelluläre Kaskaden eine entsprechende Zellantwort zu generieren. Lange Zeit ließ man dabei die dichte Besiedlung von Darm und Haut außer Acht. Externe Reize, wie zum Beispiel UV-Strahlung bei der Haut oder Nahrung beim Darm, werden durch eine Schicht von Mikroorganismen zuerst 'gefiltert'. Damit wird eine große Anzahl von schädlichen Substanzen bereits schon vor dem Kontakt mit unserem Epithel abgefangen (37).

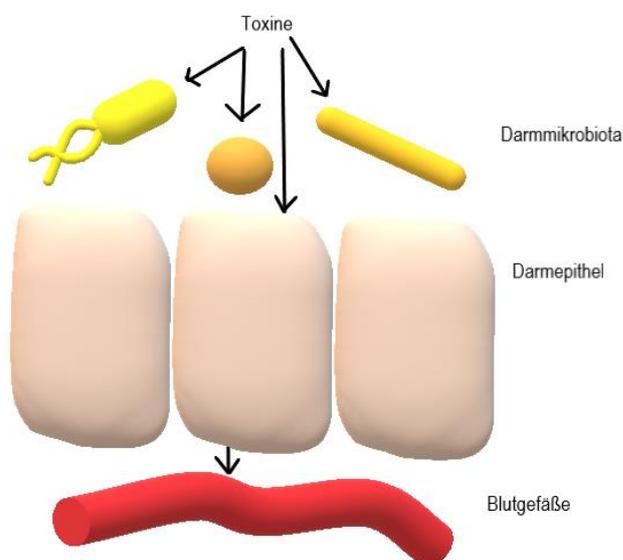


Abbildung 11: Stoffwechselfunktionen der Darmmikrobiota

Die Mikrobiota, egal ob im Darm oder auf der Haut, stellt somit einen zentralen Faktor in unserer Immunabwehr dar. Zerstören wir diese, durch zum Beispiel klinisch häufig angewendete Breitbandantibiotika, zerstören wir damit auch gleichsam eine Schutzbarriere. Häufig wird nach antibiotisch unterstützter Parodontitisbehandlung eine orale Pilzinfektion betrachtet. Längere Einnahmen von Breitbandantibiotika können zudem zu einer gefürchteten Infektion mit *Clostridium difficile* führen. Dieser Aspekt und die vermehrte Bildung von

Resistenzen bewegten zu einem Umdenken im Umgang mit Antibiotika und führten zu einem deutlich restriktiveren empfohlenen Einsatz in den entsprechenden Leitlinien (37).

### **2.3.3 Rolle in der Pathogenese anderer Organsysteme**

Die sogenannte Dysbiose stellt ein Ungleichgewicht zwischen Symbionten und Pathobionten dar. Diese führt zu einer kompositionellen Störung der Darmmikrobiota, die zu verschiedenen Erkrankungen führen kann. Ursachen für diese Dysbiose können, wie bereits oben beschrieben, vielfältig sein und sowohl endogenen als auch exogenen Einflüssen entspringen (38).

Neben vielen anderen Faktoren ist die Ernährung eine primäre Determinante für die Zusammensetzung der Mikrobiota. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass fettreiche Ernährung zu einer Reduktion der Darmbarriere, durch Verminderung von schützenden Bakterien, wie den Bifidobakterien, führt. Fructosereiche Ernährung hingegen erhöhte die Darmpermeabilität in den Untersuchungen. Das hatte eine erhöhte Endotoxin Zirkulation zur Folge (36).

Grundsätzlich schützt sich unser Körper durch eine Darm-Gefäß-Barriere, die streng den Übertritt von schädlichen Substanzen in unseren Blutkreislauf reguliert. Mit fettreicher Ernährung kommt es jedoch zu einer verstärkten systemischen Durchblutung im Darm. Unter fructosereicher Ernährung erhöht sich zusätzlich die Darmpermeabilität. Das führt im Gesamten zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Darm-Gefäß-Barriere. Die Leber stellt hierbei einen Schutzwall dar, der schädliche Substanzen aus dem intestinalen Trakt abfängt und herausfiltert. Hierbei konnten in Untersuchungen jedoch keine kultivierbaren Bakterien, in Abwesenheit von Darm- oder Leberentzündungen, gefunden werden. Nichtsdestotrotz konnten bakterielle Produkte und Bestandteile identifiziert werden, die, über die Darm-Gefäß-Barriere, den Übertritt in den Blutkreislauf fanden. Hierzu zählen unter anderem Bestandteile der Bakterienmembran, wie Peptidoglykane und Lipopolysaccharide (36).

Diese metabolische Endotoxämie kann zu einer niedrig dosierten, aber chronischen TLR4-Aktivierung beitragen. Dabei handelt es sich um eine Anreicherung von freiem Endotoxin im Blut durch ein erhöhtes bakterielles Vorkommen (54). Diese andauernde TLR4-Aktivierung führt zu einem chronisch entzündlichen Geschehen, welches unter anderem zur Entstehung von Stoffwechselerkrankungen, wie zum Beispiel reduzierte Glucosetoleranz, beiträgt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine längere TLR4-Aktivierung zu neurodegenerativen Prozessen, Autoimmunerkrankungen und sogar zur Entstehung maligner Prozesse führen kann (32).

Zudem zeigen Studien, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Dysbiose der Darmmikrobiota und der Entstehung des arteriellen Hypertonus gibt. Li et al. konnten sogar zeigen, dass bei Stuhltransplantationen, von einem Patienten mit Hypertonus auf eine keimfreie Maus, der erhöhte Blutdruck übertragbar war. Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer dysregulierten Darmmikrobiota und der Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen an verschiedenen Gefäßen. Damit scheint die Entstehung von Herzkreislauferkrankungen im näheren Zusammenhang mit einer Dysbalance der Darmmikrobiota zu stehen. Ein Verständnis der Wirkung der Darmmikrobiota auf das menschliche Gefäßsystem ist deshalb, für eine gezielte Prävention chronisch-entzündlicher Prozesse der Gefäßwand, wichtig (36).

## **2.4 Keimfreie Mäuse**

Der Begriff Gnotobiose setzt sich aus zwei griechischen Wörtern zusammen. Zum einen aus dem Wort gnostos, was so viel wie 'bekannt' bedeutet und biota, was für den Begriff 'Flora' steht. Die Gnotobiose berücksichtigt also alle bekannten Lebensformen in einem Organismus. Hierbei handelt es sich bei gnotobiotischen Tieren meist um sogenannte keimfreie Tiere. Doch was bedeutet eigentlich keimfrei? Wie kann dieser Zustand erreicht werden?

Im folgenden Abschnitt möchte ich mich der Thematik der Aufzucht, Haltung und der Forschung mit keimfreien Tieren beschäftigen.

### **2.4.1 Historie**

1885 postulierte Louis Pasteur, dass ein Leben ohne Mikrobiota nicht möglich sei. Eine derart polarisierende Aussage weckte das Interesse der Forscher gegenteiliges zu beweisen. Der erste Ansatz zur Verwendung keimfreier Tiere wurde durch Georg Nuttal und H. Thierfelder im späten 19. Jahrhundert, in Berlin, dokumentiert. Sie verwendeten für ihre Forschungen Hühner und Meerschweinchen, die sie in einfachsten Gerätschaften züchteten und hielten. Im Verlauf ihres Lebens veröffentlichten sie die Abhandlung 'Tierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal'. Doch die Instrumentarien waren zu unausgereift und die Aufzucht der Tiere zu aufwendig. Sodass es bis 1930 dauerte, bis die Gnotobiotik einen deutlichen Entwicklungsschub erhielt. In dieser Zeit beschäftigten sich gleich zwei große Universitäten mit der Herstellung und Aufzucht keimfreier Tiere. Zum einen die University of Notre Dame in Indiana und die Universität in Lund in Schweden (40).

In den Anfangsphasen war eine besondere Herausforderung, dass jedes keimfreie Tier per Kaiserschnitt auf die Welt geholt und per Hand aufgezogen werden musste. Es hat Jahre gedauert, bis man die mangelhaften Komponenten durch das Fehlen der Mikrobiota erkannte. Nach entsprechender Forschung konnte man speziell autoklavierbare Diäten entwickeln, die

zur selbsterhaltenden Fortpflanzung der Tiere, auch unter sterilen Bedingungen führte. Damit erlangte man unbegrenzte Aufrechterhaltung der keimfreien Tiere, sofern man sie steril hielt. Ein weiteres Problem stellte die Technik dar, die zur Aufzucht keimfreier Tiere notwendig war. Die von der University of Notre Dame und der Universität von Lund verwendeten Behälter wurden speziell aus Edelstahl hergestellt und enthielten häufig einen eigenen Autoklaven. Für viele Forschungseinrichtungen war dies, schon allein aufgrund der Kostenfrage, nicht zu realisieren. 1957 entwickelten Trexler und Reynolds einen flexiblen Folienisolator und eine Form der Sterilisation, die auch für andere Forschungseinrichtungen erschwinglich waren. In den 1960er Jahren waren sowohl Ratten- als auch Mausekolonien keimfreier Herkunft gut etabliert. Die verschiedenen Forschungseinrichtungen stellten Anderen diese Tiere für diverse Forschungen sogar zur Verfügung. Das gab der Gnotobiotik einen deutlichen Aufwärtsschub (41).

Verschiedene Forschungsgruppen fokussierten sich im Verlauf auf die zellulären und anatomischen Veränderungen, die die keimfreie Aufzucht und Haltung für die Tiere zur Folge hatte. Thompson und Trexler zeigten bereits 1971, dass die Schleimhäute der Tiere unterentwickelt waren und sie reduzierte Serum Leukozyten und Antikörper aufzeigten. Leshner et al. zeigten 1964, dass keimfreie Tiere einen deutlich vergrößerten Appendix aufwiesen ebenso wie andere metabolische und anatomische Veränderungen. Vor allem der vergrößerte Blinddarm konnte letale Folgen für die Tiere haben. Der vergrößerte Blinddarm konnte sich um die anderen Darmanteile wickeln und zu einem sogenannten „cecal volvulus“ führen. Zudem erwies sich der vergrößerte Blinddarm für Tierzüchter als ungünstig, da er mit Veränderungen der Geschlechtsorgane einherging und somit die Fortpflanzungsfähigkeit der Tiere einschränkte (42).

1960 begann Dr. Russel W. Schaedler an der Rockefeller University keimfreie Mäuse mit einer Reihe von Bakterien zu besiedeln, die keimfrei aufgewachsen waren. Die sogenannte Schaedler-Flora enthielt anaerobe *Streptokokken sp.*, zwei Typen *Laktobazillus spp.*, einen Stamm *Bacteroides*, ein *Enterococcus sp.* und einen coliformen Stamm. Im Verlauf seiner Forschungen vertrieb Schaedler seine entwickelte Flora auch an andere Tierzüchter. Im Laufe der folgenden Jahre wurde die Flora immer wieder verändert und weiterentwickelt. Die kolonisierten Tiere wurden für Forschungen im Bereich der Darmimmunologie und Colitis Forschung verwendet und brachten somit wichtige Erkenntnisse (42).

#### **2.4.2 Aufzucht und Haltung**

Trotz technischen Fortschrittes, seit dem späten 19. Jahrhundert, gestaltet sich auch heute noch die Haltung und die Aufzucht keimfreier Tiere kostenintensiv und aufwendig.

Heute gibt es unterschiedliche Möglichkeiten keimfreie Tiere zu generieren. Zum einen kann man einen aseptischen Kaiserschnitt, zum anderen einen Embryonentransfer durchführen. Dieses trägt zur Minimierung der Keimverschleppung bei. Eine weitere Variante stellt der Erwerb der Tiere von Züchtern dar. Hierbei kann es sich um C57 BL/6 GF Mäuse, Swiss Webster, BALB/c oder intern gezüchtete Stämme handeln. Eine weitere große Herausforderung ist die Sicherstellung der absoluten Keimfreiheit der Tiere und deren Umgebung. Zuerst werden Räumlichkeiten benötigt, die eine entsprechende Größe und eine entsprechende Technik, zur Durchführung der keimfreien Studie, aufweisen. GF-Mäuse können sowohl in halbstarren Isolatoren (SRI) als auch in flexiblen Isolatoren gehalten werden. Die Isolatoren weisen, je nach Hersteller, unterschiedliche Größen und somit auch unterschiedliche Fassungsvermögen auf. Die Räume, in denen die GF-Mäuse untergebracht sind, sollten zugangsbeschränkt sein und nur durch autorisiertes und geschultes Personal betreten werden. Die entsprechenden Räumlichkeiten müssen, mittels Wasserstoffperoxid, dekontaminiert werden. Der Erfolg der Dekontamination wird mittels biologischer Indikatoren überprüft, die vor der Dekontamination platziert wurden. Die Person, die diese Räume betreten muss, benötigt eine entsprechende Ausrüstung. Unter anderem gehört dazu ein Einwegoverall, eine Kappe, eine Maske, Handschuhe und Schuhüberzieher. Jede Forschungsgruppe besitzt für diesen Schritt spezifische und individuelle Protokolle, die es zu beachten gilt. Nahrung und Trinkwasser muss durch autoklavieren sterilisiert werden. Zudem ist es notwendig, dass sämtliche Materialien wie Pipetten, Skalpelle, Nadeln, Röhrchen und Papiertücher im Voraus sterilisiert und bereitgestellt werden. Dies erfordert eine detaillierte Planung der Studie. Da jeder Materialtransfer über Autoklaven eine potentielle Infektionsquelle darstellt, sollten diese so gering wie möglich gehalten werden (43).

Neuankömmlinge müssen aus ihren Transportzylinder in ihre sterile Umgebung überführt werden. Hierfür müssen immer zwei geschulte Personen anwesend sein, wovon einer die Befähigung haben sollte den Gesundheitszustand der Tiere einzuschätzen. Wichtig ist ebenfalls, dass gemeinschaftlich untergebrachte Tiere zusammenbleiben sollten, dies minimiert aggressive Verhaltensweisen. Kontrollgruppen sind in benachbarten Räumen, unter gleichen Bedingungen, unterzubringen. Alle Neuankömmlinge benötigen eine Woche Zeit, um sich zu akklimatisieren, bevor die Studien beginnen können. Täglich muss eine geschulte Person die Tiere begutachten und eventuelle Auffälligkeiten weiterleiten. Jede Woche erfolgen Abstriche und Tupferproben vom Stuhlgang, Käfig und weitere Orte, um auf Bakterien oder Pilze zu testen. Dieses Vorgehen ermöglicht die frühzeitige Identifizierung von potentieller Dekontamination. Im folgenden Verlauf können die Tiere, je nach Studiendesign, eingesetzt werden (43).

Wie diese Aufschlüsselung an Maßnahmen zeigt, ist die Haltung und Aufzucht der keimfreien Tiere weiterhin sehr aufwendig und kostenintensiv. Häufig wird versucht diese Hürde zu umgehen und Tiere mit Antibiotikabehandlung ebenfalls in einen Zustand der 'Keimfreiheit' zu bringen. Die Methoden der GF-Mäuse und antibiotikabehandelten Mäuse werden oftmals als äquivalent angesehen. Antibiotikabehandlungen können jedoch nicht dasselbe Ergebnis erzielen, wie keimfrei aufgezogene Tiere. Sie erreichen lediglich eine Dezimierung bestimmter Mikroorganismen, können jedoch nie das gesamte Mikrobiom entfernen. Daher kann man bei Antibiotikagaben nicht von Keimfreiheit sprechen. Zudem darf man nicht vergessen, dass Antibiotikabehandlungen häufig unberechenbare Wechselwirkungen mit den Organsystemen eingehen. Zusätzlich sollte man sich, in Zeiten wachsender Resistenzbildungen, bewusst mit dem Einsatz des Einsatzes von Antibiotika auseinandersetzen. Letztendlich fehlen häufig standardisierte Abläufe der Antibiotikabehandlung und die verbleibende Restdarmmikrobiota kann sehr unterschiedlich ausfallen. Weswegen Ascher et al. in ihrem Übersichtsartikel ebenfalls zu der Erkenntnis gekommen sind, dass, wenn keimfreie Tiere zur Verfügung stehen, diese als Studiendesign, im Sinne der Reproduzierbarkeit, vorzuziehen sind (44).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analytical Balance Sartorius Research R200D	Data Weighing System, Inc., Wood Dale, Vereinigte Staaten
Durchflusszytometer	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Dynex Opsys MR™ Microplate Reader	Aspect Scientific Ltd., Cheshire, Vereinigte Staaten
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fisherbrand™ FB70155 Pump	Fisher Scientific / Thermo Fisher Scientific, Hampton, Vereinigte Staaten
Fusion FX	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Baden Württemberg, Deutschland
IKA® KS 260 basic	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kühlschrank -20°	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank 4°	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mini- PROTEAN® Tetra System	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
PowerPac™ HC High- Current Power Supply	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Pipet- Life XLS	Mettler- Toledo Rainin, LLC , Oakland, Vereinigte Staaten
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Vortexer	Scientific Industries Inc., New York, Vereinigte Staaten
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 1: Geräte

### 3.2 Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™	Becton Dickinson, New Jersey, Vereinigte Staaten
Microsoft Office 16	Microsoft, Washington, Vereinigte Staaten
GraphPad Prism 9.0	GraphPad Software Inc, Kalifornien, Vereinigte Staaten

*Tabelle 2: Software*

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf tubes (2ml)	Sarstedt, Niedersachsen, Deutschland
Kanüle 20G	BD, New Jersey, Vereinigte Staaten
Mikrotiterplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pasteurpipetten aus Glas	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Petrischale	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
PDVF Membrane	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pipettenspitzen	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Zellsiebe	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Vereinigte Staaten

*Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien*

### 3.4 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Rotiophorese® Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) - Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS – HCL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (1x)	Gibco – Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) – Solution pH 8 (0,5M)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bovines Serum albumin (BSA) Fraction V	Eurobio, Courtaboeuf
Peroxide Reagent B (20x)	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Frankfurt am Main
LumGLO® Reagent A (20x)	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Frankfurt am Main
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
D(+)- Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hepes Buffer Solution (1M)	Gibco – Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
KCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerin 86%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RIPA Lysis Buffer, 10x	EMD Millipore Corp/ Merck KGaA , Burlington
Bromphenolblau Na - Salz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
Milchpulver Blotting grade, pulv.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DC™ Protein Assay Reagent B	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules
DC™ Protein Assay Reagent A	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules
DC™ Protein Assay Reagent S	Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol, 99,5%	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween- 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FCS	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad
HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ECL Western Blot Substrates	Fisher Scientific / Thermo Fisher Scientific

*Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien*

### 3.5 Puffer und Medien

#### 10x Laufpuffer

30,2g Tris base

144g Glycin

10g SDS

Auffüllen auf 1000ml, mit ddH<sub>2</sub>O

#### 1x Laufpuffer

100ml 10x Laufpuffer

Auffüllen auf 1000ml, mit ddH<sub>2</sub>O

#### 10x TBS- Puffer

157g Tris HCL

90g NaCl

Auf pH 7,5 mit NaOH einstellen

Anschließend auffüllen auf 1000ml, mit ddH<sub>2</sub>O

#### 1x TBS

100ml 10x TBS

Auffüllen auf 1000ml, mit ddH<sub>2</sub>O

#### 1x TBST- Puffer

100ml 10x TBS

Auffüllen auf 1000ml, mit ddH<sub>2</sub>O

Unter Rühren 1ml Tween-20 zufügen

10x Transferpuffer

90,3g Tris Base

144g Glycin

Auffüllen auf 1000ml, mit ddH<sub>2</sub>O

1x Transferpuffer

50ml 10x Transferpuffer

100ml Methanol (blotting grade)

350ml ddH<sub>2</sub>O

Kühl lagern

1,0 M Tris, pH 6,8 für Sammelgele

12,1g Tris Base

Auffüllen auf 80 ml mit ddH<sub>2</sub>O

Einstellen auf pH6,8

Auffüllen auf 100ml mit ddH<sub>2</sub>O

Bei Raumtemperatur lagern

1,5M Tris, pH 8,8 für Trenngele

45,5g Tris Base

Auffüllen auf 220ml mit ddH<sub>2</sub>O

Einstellen auf pH 8,8

Auffüllen auf 250ml mit ddH<sub>2</sub>O

Bei Raumtemperatur lagern

5x Lämmli

78,8g Tris- HCl 2,5M Stock auf 200ml

Davon 4ml pro Ansatz (0,2M)

4ml Tris- HCl

10ml Glycerol

5ml β - Mercaptoethanol

2g SDS

1ml 1% Bromphenolblau

BSA 5%

20ml 1x TBST

1,0g BSA

Milchpulver

2,5g Milchpulver

Auffüllen auf 50ml mit 1xTBST

RIPA

1ml RIPA Lysis Buffer

1 Tbl. Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets

Auf 20ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

Lysis Buffer

0,0308g DTT

121,136g Tris base

2,981g KCl

20% Glycerin

HBSS-Puffer

4g NaCl

0,2g KCl

0,03g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,5g Glucose

0,024g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,16g NaHCO<sub>3</sub>

Auffüllen auf 500ml mit ddH<sub>2</sub>O

Autoklavieren

FCS in Wasserbad

50ml FCS

12,5ml HEPES Buffer Solution

PBS

0,5g BSA

2mM EDTA

Auffüllen auf 100ml mit PBS

Stripping Buffer für Western Blot

15g Glycin

1g SDS

10ml Tween 20

Auffüllen auf 800ml mit ddH<sub>2</sub>O

pH auf 2,2 einstellen

Auffüllen auf 1000ml mit ddH<sub>2</sub>O

Trenngele für Tris- Glycine SDS- Polyacrylamide Gel

8% Gel	15ml
H <sub>2</sub> O	5,1ml
30% Acrylamid Mix	4,0ml
1,0M Tris (pH 8,8)	5,6ml
10% SDS	0,15ml
10% APS	0,15ml
TEMED	0,009ml

*Tabelle 5: Trenngel 8%iges Agarosegel*

10% Gel	15ml
H <sub>2</sub> O	4,1ml
30% Acrylamid Mix	5,0ml
1,0M Tris (pH 8,8)	5,6ml
10% SDS	0,15ml
10% APS	0,15ml
TEMED	0,006ml

*Tabelle 6: Trenngel 10%iges Agarosegel*

5% Sammelgele für Tris- Glycine SDS- Polyacrylamide Gel

Komponenten	4ml
H <sub>2</sub> O	2,75ml
30% Acrylamid Mix	0,67ml
1,0M Tris (pH 6,8)	0,50ml
10% SDS	0,04ml
10% APS	0,04ml
TEMED	0,004ml

*Tabelle 7: 5% Sammelgel*

### **3.6 Isolation neutrophiler Granulozyten mit Histopaque (Dichtegradient-Zentrifugation)**

Als Versuchstiere wurden, wie oben beschrieben, Mäuse verwendet. Um die neutrophilen Granulozyten isolieren zu können wurde dem Spendertier beide Beine post mortem entnommen. Zum vorübergehenden Transport wurden die von Muskel und Haut befreiten Knochen in einem gekühlten HBSS befüllten Proberöhrchen transportiert. Es wurden Femur und Tibia, jedes Beines, entnommen.

Die Isolierung wurde an einer Sterilbank durchgeführt. Nach einer vorangegangenen Reinigung des Arbeitsplatzes wurden die Knochen an ihren jeweiligen Epiphysen abgeschnitten. Das entsprechende Knochenmark wurde, durch einen entsprechenden Filter, in das Proberöhrchen ausgewaschen.

Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation von 1560 n/min für zehn Minuten. Danach wurde der Überstand in den Proberöhrchen abgesaugt und das verbleibende Pellet in 1ml einer Lösung, aus HBSS und Hepes, gelöst.

In neuen Proberöhrchen wurde ein Gradient mittels Histopaque 1077 und 1119 aufgebaut, bei Verwendung von jeweils 4ml von Histopaque 1077 und 1119. 1ml der entstandenen Knochenmarkslösung wurde anschließend auf diesen Gradienten gegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 2360 n/min für 30 Minuten.

Nach erfolgter Zentrifugation konnte man, die bei der unteren Dichte angesiedelten neutrophilen Granulozyten, bei der 4ml Marke, mit einer Pipette entnehmen. Nach Zugabe von weiteren 20ml Waschpuffer wurde erneut zentrifugiert, bei 1560 n/min für zehn Minuten. Schließlich entfernte man wieder den Überstand, löste das Pellet und zentrifugierte, nach Zugabe von 12,5ml Waschpuffer, erneut. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt.

### **3.7 Isolation neutrophiler Granulozyten MACS Cell Separation**

Den Maus-Versuchstieren wurden post mortem beide Femur- und Tibiaknochen entnommen. Sie wurden von Muskelgewebe, Sehnen und Haut befreit. Die Epiphysen wurden abgeschnitten, um das Knochenmark entnehmen zu können. Mit insgesamt 10ml PBS Puffer wurden die jeweils zwei Tibia- und zwei Femurknochen durchgespült. Das Knochenmark/PBS Gemisch wurde auf einen 70µm Filter gegeben. Aus dem Filtrat wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde das Filtrat bei 300xg für zehn Minuten bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Pellet mit 200µl PBS resuspendiert. Danach wurde 50µl Neutrophil Biotin-Antibody zugefügt und die Lösung durchmischt. Die Lösung anschließend bei 2-8 Grad Celsius für zehn Minuten inkubieren. Je nach Zellzahl in 5-10ml PBS waschen. Anschließend bei 300xg bei 4 Grad Celsius für zehn Minuten zentrifugieren. Überstand abnehmen und das entstandene Pellet in 400µl resuspendieren. Als nächstes 100µl Anti-Biotin MicroBeads zufügen und mischen. 15 Minuten in einem 2-8 Grad

Celsius Kühlschrank inkubieren. Mit 5-10ml, je nach Zellzahl, waschen und anschließend bei 300xg, bei 4 Grad Celsius, zehn Minuten inkubieren. Das Pellet mit 500µl resuspendieren. Anschließend wurden die Säulen positioniert und mit 3ml PBS vorbehandelt. Danach wurde die Lösung auf die Säule aufgetragen. Nachdem sie vollständig durchgelaufen war, wurde dreimal mit 3ml PBS aufgetragen. Abschließend wurde die entstandene Lösung bei 300xg für sieben Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde je nach Verwendung weiter behandelt.

### **3.8 Proteinlysatherstellung**

Die Probe der neutrophilen Granulozyten wird auf Eppendorf Gefäße, gleichmäßig nach Bedarf, verteilt. Im Anschluss wird ein frisch angesetzter RIPA Lysepuffer, entsprechend der Probengröße, dazugegeben, maximal 300µl. Proteinlösung und Lysepuffer werden 4-5-mal, mit einer Pipette, gut durchmischt. Die fertig befüllten Eppendorf Gefäße werden dann 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000rpm, bei 4 Grad Celsius, für drei Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wird abgenommen und auf die Eppendorf Gefäße verteilt. Nutzt man die Proben nicht am gleichen Tag, können sie für einen Monat bei -20 Grad Celsius weggefroren werden. Bei längerer Lagerung wird bei -80 Grad Celsius eingefroren.

### **3.9 DC™ Protein Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein DC™ Protein Assay verwendet. Es ist zwingend erforderlich, um die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben im Western Blot anzugleichen.

Auf eine 96 Well Platte werden die entsprechenden Proben pipettiert, je 5µl pro Well. Der entsprechende Standard wird je nach erwarteter Proteinkonzentration gewählt. Anschließend wird das Reagenz A und Reagenz S entsprechend der benötigten Menge zusammengeführt. Die entstandene Lösung wird mit je 25µl pro Well auf die 96 Well Platte aufgetragen. Anschließend wird das Reagenz B mit 200µl pro Well zugefügt. Die Platte wird 15 Minuten, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgende Detektion erfolgt bei 690nm.

### **3.10 Western Blot**

Die Proben wurden, wie oben beschrieben, mit der Proteinlyse für den Western Blot vorbehandelt. Die Gele wurden einen Tag vor dem Western Blot hergestellt. Hierbei handelt es sich um 8%ige Gele. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem DC™ Protein Assay bestimmt und die Konzentrationen angeglichen.

Die Proben wurden, entsprechend der errechneten Konzentration, pipettiert und mit einem 5x Lämmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden sie bei 95 Grad Celsius für zehn Minuten

aufbereitet. Danach kühlen sie bei Raumtemperatur ab. Die Gele wurden bei 80 Volt für 15 Minuten in Laufpuffer vorbehandelt. Danach wurden die Proben und der PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen. Von dem Marker wurden 7µl aufgetragen, bei der Probe, je nach Konzentration, maximal 28µl.

Die befüllten Gele wurden wieder in die Box eingesetzt und die ersten 15 Minuten bei 80 Volt, anschließend bei 100 Volt laufen gelassen. Dieser Vorgang lief solange, bis die Lauffront den unteren Rand der Glasplatte erreicht hatte. Dann wurde der Vorgang gestoppt.

Die PVDF Membran wurde zugeschnitten und fünf Minuten in Methanol inkubiert. Filter und Schwämme wurden in 1x Transferpuffer eingelegt. Dann wurde in folgender Reihenfolge geschichtet: Platte, Schwamm, Filter, Membran, Gel, Filter, Schwamm, Platte.

Der entstandene Blot wurde für 1,5 Stunde in Transferpuffer mit 75 Volt behandelt. Anschließend wurde die Membran an den entsprechenden Teilen zurechtgeschnitten und, je nach verwendetem Antikörper, mit 5% BSA oder Milchpulver für 45 Minuten geblockt.

Danach wurde der entsprechende Antikörper, gemäß den Herstellervorgaben, in der entsprechenden Lösung gelöst und auf die Membran gegeben. Diese wurde über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert.

Am Folgetag wurde die Antikörperlösung entfernt und dreimal mit TBS-T für jeweils zehn Minuten gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Membranen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 90 Minuten inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit jeweils einmal TBS-T und zweimal 1xTBS.

Daraufhin erfolgte die Detektion am Fusion Gerät. Hierbei wurde das ECL Reagenz verwendet. Dafür wurde 50µl Reagenz A mit 50µl Reagenz B und 900µl Wasser gemischt. Diese Lösung wurde auf die Membran aufgetragen und die Detektion gestartet.

### **3.11 Stripping für Western Blot**

Auf die bereits mit Primär- und Sekundärantikörper inkubierte Membran bringt man den Stripping Buffer auf, sodass er die Membran vollständig bedeckt. Dann inkubiert man die Membran für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend entfernt man den Stripping Buffer und gibt frischen Stripping Buffer auf die Membran, sodass sie vollständig bedeckt wird. Dann inkubiert man für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach entfernt man den Stripping Buffer und bedeckt die Membran mit PBS für zehn Minuten. Schließlich entfernt man das PBS und gibt neues dazu und inkubiert für zehn Minuten. Anschließend entfernt man das PBS wieder und gibt TBST auf die Membran bis sie vollständig bedeckt ist, fünf Minuten Inkubation. Man entfernt das TBST und wiederholt den Schritt. Letztendlich blockt man die Membranen nun erneut. Danach sind sie bereit, erneut mit einem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert zu werden.

### **3.12 FACS**

Die zuvor isolierte Knochenmarkprobe wird mit 400µl kalten PBS gelöst. Anschließend wird TruStain fcX™ (anti – mouse CD16/32) zum Blocken (1:50 Lösung) zugegeben, für 20 Minuten auf Eis blocken. Anschließend werden die Ansätze pipettiert. Es werden, je Well, 100µl Probe zugegeben. Die Platte wird bei 2000 rpm, bei 4 Grad, für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand wird entfernt. Die jeweiligen Ansätze werden auf eine 96 Well Platte, zu je 50µl pro Well, pipettiert. In die Negativkontrolle werden 50µl kaltes PBS pipettiert. Die Platte wird nun lichtgeschützt, auf Eis, für 20 Minuten inkubiert. Nach einer Inkubationzeit von 18 Minuten wurde DAPI (1:10000 Lösung) dazu gegeben, 50µl pro Well. Jedoch nicht in die Negativkontrolle. Die Platte wird bei 2000 rpm, bei 4 Grad, für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand wird entfernt. Die Proben werden mit 100µl kaltem PBS gewaschen, anschließend erneut bei 2000 rpm, bei 4 Grad, für zwei Minuten zentrifugiert. Danach wird der Überstand entfernt. Das Pellet wird erneut in 100µl gelöst und anschließend in die FACS Röhrchen gegeben, die mit 100µl kaltem PBS befüllt sind. Die Proben werden, bis zur Messung, kalt und lichtgeschützt aufbewahrt.

### **3.13 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism 9.0 ausgewertet. Es erfolgte die Darstellung als Mittelwert mit  $\pm$ SEM (Standardfehler). Der D'Agostino-Pearson Omnibus K2-Test wurde für die Überprüfung der Normalverteilung, sowie der F-Test für die Überprüfung der Gleichheit der Varianzen. Beide Tests wurden auf den Student's-Test (\*) angewendet. Ergaben sich hierbei Abweichungen wurde der Mann-Withney-Test (#) angewendet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Quantifizierung der Signalintensität von IRAK4 in neutrophilen Granulozyten**

Zur Quantifizierung auf Proteinebene wurden aus dem Knochenmark der Versuchstiere Neutrophile Granulozyten isoliert. Im Anschluss erfolgte, über eine photometrische Messung mittels Bradford Assay, eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes. Diese Proteine wurden auf ein 8%iges Gel, im Zuge des Western Blots, nach entsprechender Behandlung aufgetragen. Je nach gesuchtem Protein wurde die Blotting-Membran mit einem passenden Antikörper in entsprechender Konzentration inkubiert. Mittels Chemielumineszenz konnte mit Hilfe des Fusion Gerätes eine densometrische Auswertung erfolgen.

Die Proteinbande von IRAK4, IRF3 und IRF5, inklusive derer phosphorylierten Anteile wurde densometrisch quantifiziert. Dabei wurden die Proteine in GF C57BL/6J Mäusen, wie auch in ihrer Kontrollgruppe den CONV-R C57BL/6J Mäusen nachgewiesen.

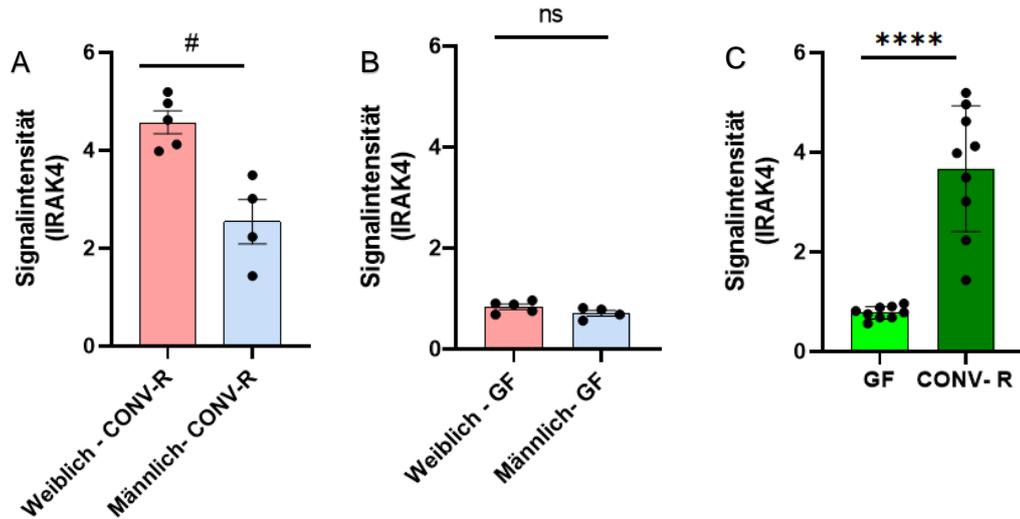


Abbildung 12: **A** Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen (n=5) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen **B** Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen (n=5) und männlichen GF Mäusen (n=4) **C** Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in CONV-R Mäusen (n=9) und GF Mäusen (n=9). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p\# \leq 0.0159$ , und dem Student's t-Test,  $p^{****} \leq 0.0001$ .

Es zeigte sich, dass in den CONV-R Tieren das unphosphorylierte IRAK4 signifikant mehr in den weiblichen Tieren exprimiert wird als in den männlichen Tieren. Bei den GF Mäusen zeigt sich jedoch tendenziell kein Unterschied zwischen den Proteinmengen bei den weiblichen und männlichen Tieren. Insgesamt wurde, geschlechtsunabhängig, in den keimfreien Mäusen eine signifikant geringere Expression von IRAK4 gegenüber den CONV-R Tieren detektiert. Das IRAK4 Protein stellt hierbei eine zentrale Schaltstelle des MyD88-abhängigen TLR4-Signalweges dar. Unphosphoryliertes IRAK4 ist hierbei die Vorstufe der aktiven Form des Proteins, das für die Weiterleitung des Signals unerlässlich ist.

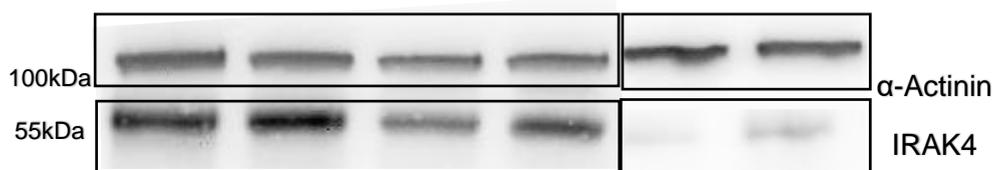


Abbildung 13: Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde IRAK4 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen  $\alpha$ -Actinin aufgetragen.

Als Ladungskontrolle wurde bei jedem Western Blot  $\alpha$ -Actinin detektiert. Das Protein wird in hohen Mengen in allen Zellen produziert, da es Bestandteil des Zytoskeletts ist. Der Antikörper wurde, 1:1000 verdünnt aufgetragen. Im Anschluss an die Detektion erfolgte die Normalisierung gegen die  $\alpha$ -Actinin-Bande.

## 4.2 Quantifizierung der Signalintensität von p- IRAK4 in neutrophilen Granulozyten

Die phosphorylierte Variante des IRAK4 Proteins ist auf einer Höhe von 45 k-Da zu detektieren. Damit liegt sie ungefähr 10 k-Da niedriger als ihre unphosphorylierte Variante. Die phosphorylierte Variante ist die aktivierte Form des Proteins. Sie vermittelt die entsprechende Signalkaskade und führt zur Phosphorylierung weiterer Proteine. Damit reguliert sie auch, je nach Menge der Proteine, die Stärke des Signals.

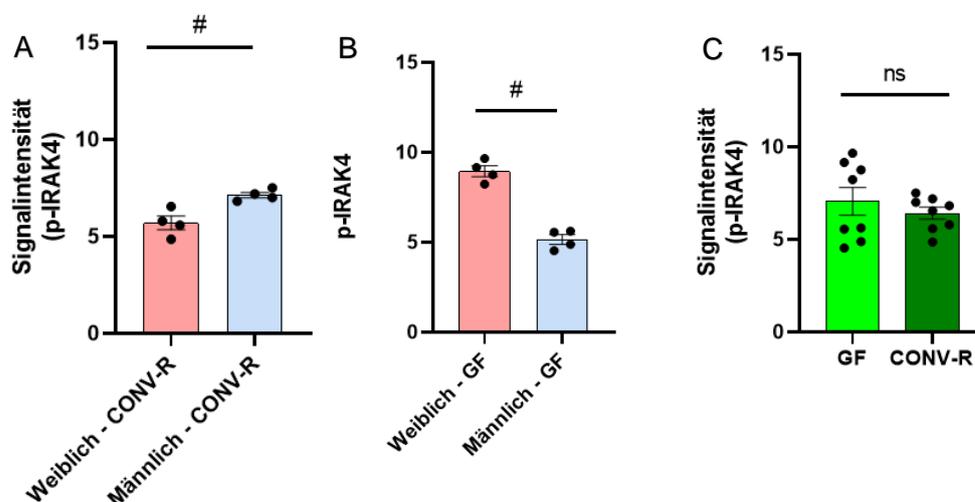


Abbildung 14: **A** Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen ( $n=4$ ) CONV-R Mäusen **B** Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen GF Mäusen ( $n=4$ ) **C** Vergleich der Signalintensität von IRAK4 in CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF Mäusen ( $n=8$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p\#\leq 0.0268$ .

Männliche CONV-R Tiere wiesen signifikant mehr p-IRAK4 auf als ihre weiblichen Vergleichstiere. Die keimfreie Versuchsgruppe zeigt jedoch eine deutlich stärkere Produktion des p-IRAK4 in den weiblichen Mäusen, als in den männlichen. Damit kommt es in den

keimfreien Tieren zu einem deutlich größeren Anstieg der Produktion der aktivierten Form des IRAK4 gegenüber der Kontrollgruppe. Tendenziell kann nun beobachtet werden das in den GF- Mäusen mehr p-IRAK4, als in den CONV-R Mäusen produziert wird. Damit ist zu erwarten das keimfreie Mäuse tendenziell stärker auf einen LPS- induzierten Reiz über die Aktivierung des TLR4- Signalweges reagieren.

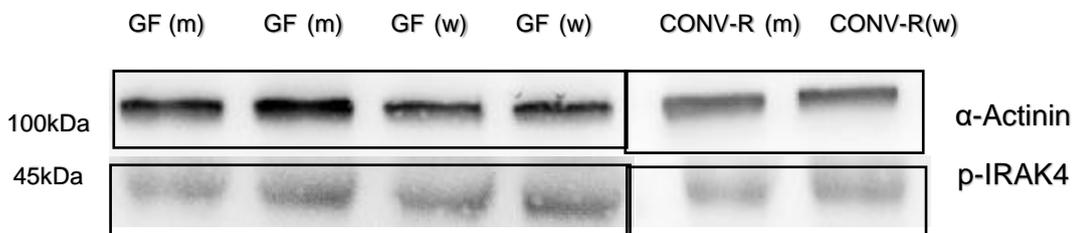


Abbildung 15: Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde p-IRAK4 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen  $\alpha$ -Actinin aufgetragen.

#### 4.3 Relative Intensität von IRAK4 in GF- und in CONVR- Mäusen

Die relative Intensität wurde durch die Bildung des Quotienten der Signalstärke des p-IRAK4 und der Signalstärke des IRAK4 Proteins berechnet. Dieser Schritt wurde sowohl für die CONV-R als auch die GF- Mäuse durchgeführt, Anschließend wurden beide Gruppen graphisch gegeneinander aufgetragen.

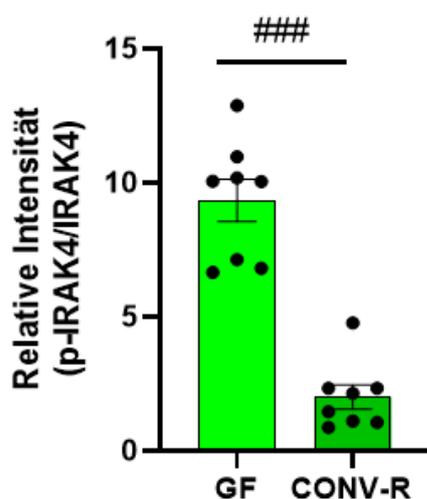


Abbildung 16: Vergleich der relativen Intensität ( $p$ -IRAK4/IRAK4) zwischen CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF- Mäusen ( $n=8$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p \leq 0.0002$ .

In der Auswertung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen Intensität in den keimfreien Tieren gegenüber den CONV-R Mäusen. Dieser Befund unterstreicht die vorausgegangene Vermutung das die keimfreien neutrophilen Granulozyten deutlich stärker auf einen ankommenden LPS-Reiz reagieren können.

#### 4.4 Quantifizierung der Signalintensität von IRF3 in neutrophilen Granulozyten

IRF3 stellt einen zentralen Punkt der MyD88-unabhängigen TLR4- Signalkaskade dar. Hacker et al. stellten 2011 die These auf das der MyD88-unabhängige TLR4-Signalweg, nach Aufnahme des LPS-gebundenen Rezeptors, ausschließlich im Endosom initiiert wird. Hierbei wird IRF3 als inaktive Vorstufe gebildet und bei entsprechendem Reiz phosphoryliert.

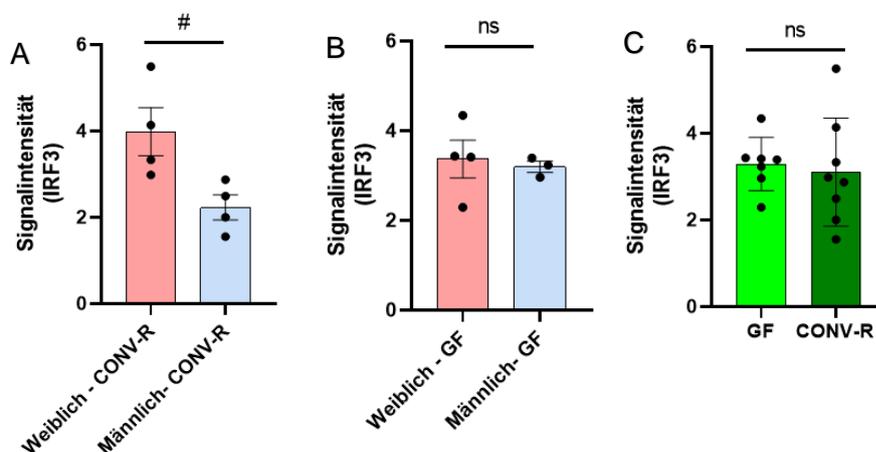


Abbildung 17: **A** Vergleich der Signalintensität von IRF3 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen ( $n=4$ ) CONV-R Mäusen **B** Vergleich der Signalintensität von IRF3 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen GF Mäusen ( $n=3$ ) **C** Vergleich der Signalintensität von IRF3 in CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF Mäusen ( $n=7$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p \leq 0.0268$ .

Die Graphen zeigen das in den weiblichen CONV-R Mäusen signifikant mehr IRF3 als in den männlichen Mäusen produziert wird. Wohingegen man bei den GF- Mäusen lediglich einen leichten Trend zu den weiblichen Mäusen sieht. Bei der Gegenüberstellung von GF- Mäusen

und CONV-R Mäusen ist zu erkennen, dass die GF- Mäuse tendenziell mehr IRF3 produzieren.

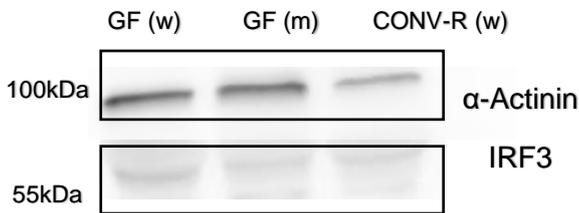


Abbildung 18: Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde IRF3 für CONV-R Tiere und GF-Tiere dargestellt und gegen  $\alpha$ -Actinin aufgetragen.

#### 4.5 Quantifizierung der Signalintensität von p-IRF3 in neutrophilen Granulozyten

Im phosphorylierten Zustand kann p-IRF3 in den Zellkern translozieren und direkt die Expression von Chemokinen stimulieren. Damit stellt IRF3 ein Endglied in der Signalkaskade dar. Die Menge des p-IRF3 korreliert also direkt mit der Stärke der inflammatorischen Antwort.

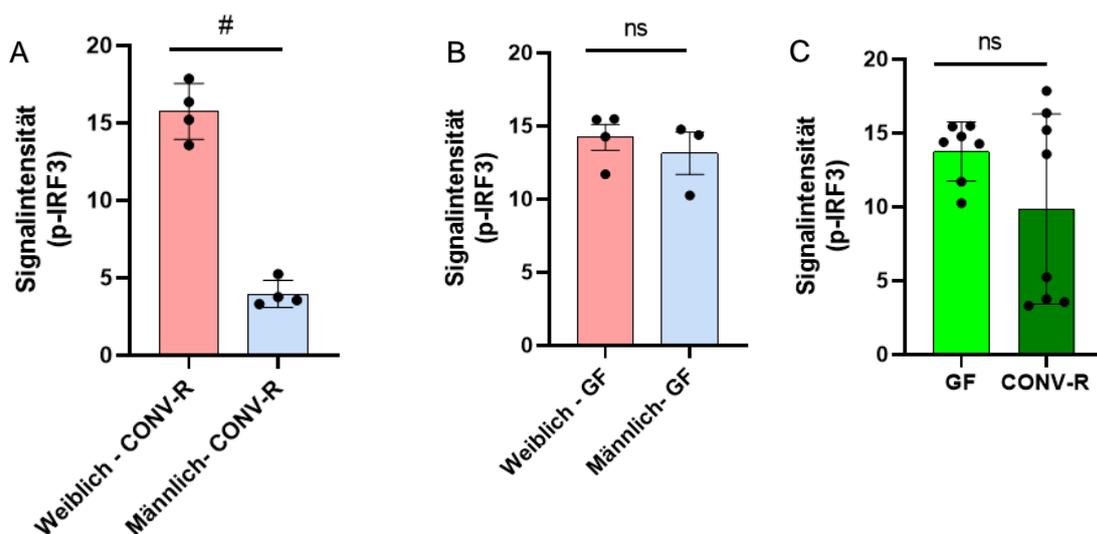


Abbildung 19: **A** Vergleich der Signalintensität von p-IRF3 in weiblichen (n=4) und männlichen (n=4) CONV-R Mäusen **B** Vergleich der Signalintensität von p-IRF3 in weiblichen (n=4) und männlichen GF Mäusen (n=3) **C** Vergleich der Signalintensität von p-IRF3 in CONV-R Mäusen

(n=8) und GF Mäusen (n=7). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p \leq 0.0268$ .

Die weiblichen CONV-R Tiere produzieren quantitativ wesentlich mehr p-IRF3 als die männlichen Tiere. Bei den GF Mäusen zeigt sich ebenfalls tendenziell eine erhöhte Produktion der aktiven Form des IRF3 Proteins. Vergleicht man die GF Mäuse mit den CONV-R Tieren zeigt sich tendenziell eine höhere Produktion von p-IRF3 in den Keimfreien Tieren.

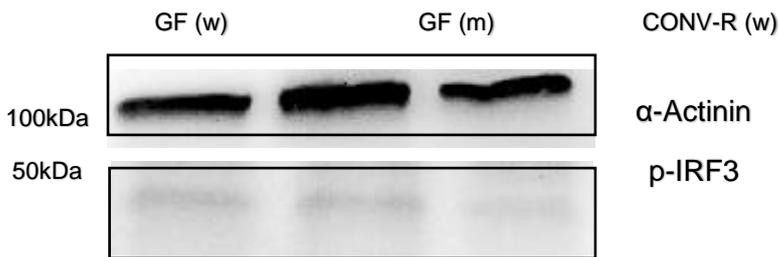


Abbildung 20: Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde p-IRF3 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen  $\alpha$ -Actinin aufgetragen.

#### 4.6 Relative Intensität von IRF3 in GF- und in CONVR- Mäusen

Wie für IRAK4 erfolgte die Berechnung des Quotienten der relativen Intensität für IRF3.

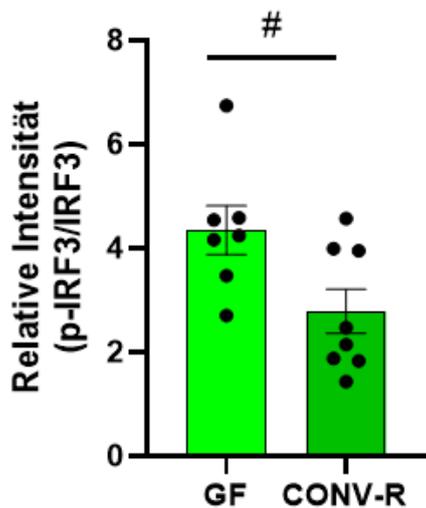


Abbildung 21: Vergleich der relativen Intensität ( $p$ -IRF3/IRF3) zwischen CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF- Mäusen ( $n=7$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann- Whitney Test,  $p \leq 0.0289$ .

Wie auch bei IRAK4 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen GF Mäusen und CONV-R Mäusen. In keimfreien Tieren ist die relative Intensität von  $p$ -IRF3 zu IRF3 deutlich höher als in CONV-R Tieren. Damit ist zu erwarten das auch im MyD88-unabhängigen Weg der TLR4 Signalkaskade die inflammatorische Antwort in keimfreien Mäusen deutlich intensiver ausfällt als in der Kontrollgruppe.

#### 4.7 Quantifizierung der Signalintensität von IRF5 in neutrophilen Granulozyten

IRF5 nimmt in der TLR4-Signalkaskade eine gewisse Sonderstellung ein. Während alle anderen Proteine eine Abfolge von Aktivierung verschiedener Proteine durchlaufen wird IRF5 direkt von MyD88 aktiviert. Es wirkt dann ohne Zwischenakteure direkt auf die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-6. Damit steht die Quantitative Menge von IRF5 in direktem Zusammenhang mit der inflammatorischen Antwort, welche durch den TLR4- Rezeptor ausgelöst wird.

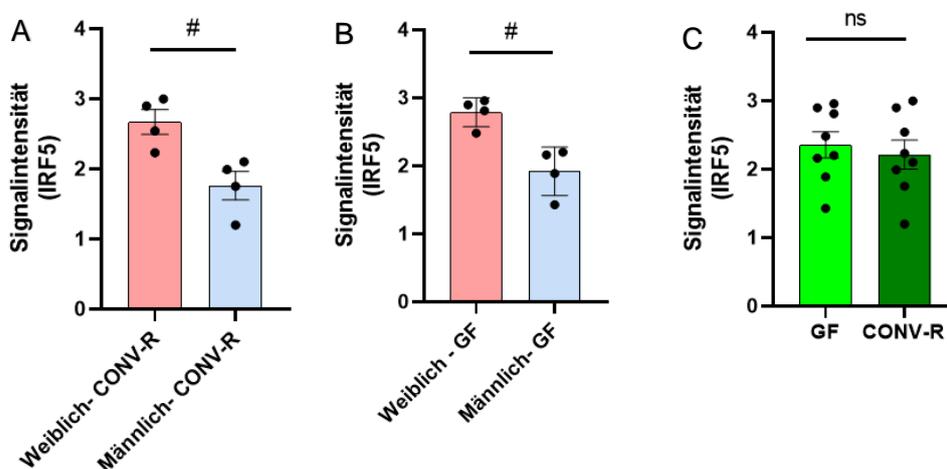


Abbildung 22: A Vergleich der Signalintensität von IRF5 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen ( $n=4$ ) CONV-R Mäusen B Vergleich der Signalintensität von IRF5 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen GF Mäusen ( $n=4$ ) C Vergleich der Signalintensität von IRF5 in CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF Mäusen ( $n=8$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann- Whitney Test,  $p \leq 0.0268$ .

Bei IRF5 können wir erkennen das sowohl die CONV-R, als auch die GF-Mäuse, einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren zeigen. Die weiblichen Tiere zeigen quantitativ mehr IRF5 als ihre männlichen Gegenstücke. Vergleicht man GF-

Mäuse und CONV-R-Mäuse zeigt sich nur eine sehr geringfügige Tendenz, dass in den keimfreien mehr IRF5 produziert wird.

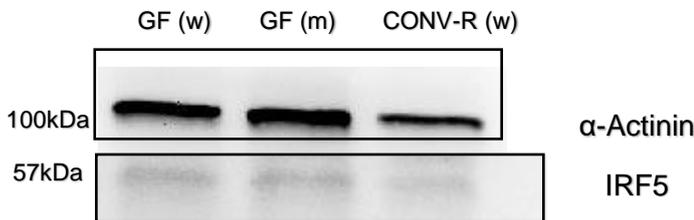


Abbildung 23: Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde IRF5 für CONV-R Tiere und GF-Tiere dargestellt und gegen  $\alpha$ -Actinin aufgetragen.

#### 4.8 Quantifizierung der Signalintensität von p-IRF5 in neutrophilen Granulozyten

Wie auch bei den vorherigen Proteinen stellt die phosphorylierte Variante die aktive Form dar.

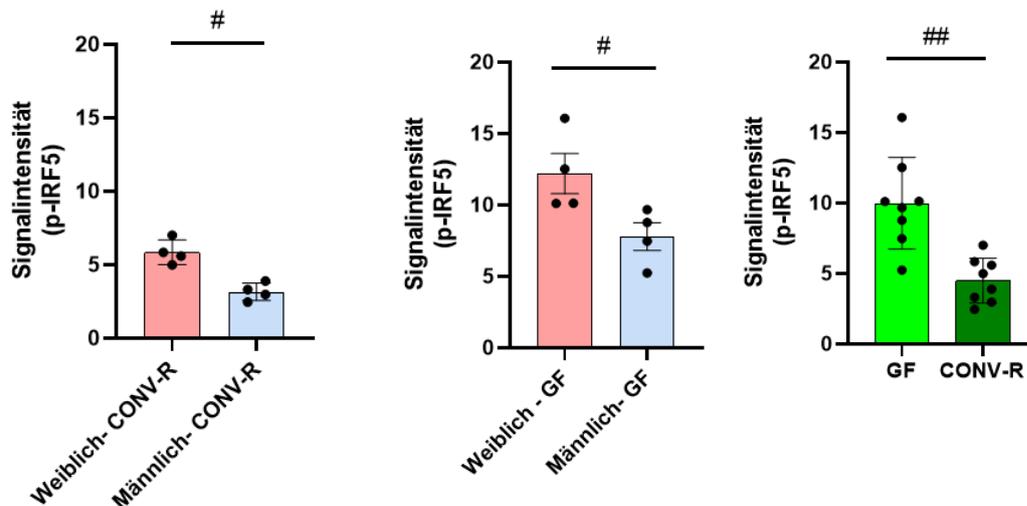


Abbildung 24: **A** Vergleich der Signalintensität von p-IRF5 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen ( $n=4$ ) CONV-R Mäusen **B** Vergleich der Signalintensität von p-IRF5 in weiblichen ( $n=4$ ) und männlichen GF Mäusen ( $n=4$ ) **C** Vergleich der Signalintensität von p-IRF5 in CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF Mäusen ( $n=8$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p\#\leq 0.0268$  und  $p\#\#\leq 0.0011$ .

Im Gegensatz zu p-IRF3 und p-IRAK4 zeigt p-IRF5 eine signifikant geringere Produktion in den CONV-R-Tieren als in den GF-Mäusen. Sowohl in den GF als auch in den CONV-R-

Mäusen sieht man jedoch wieder eine deutlich erhöhte Produktion von p-IRF in den weiblichen als in den männlichen Mäusen.

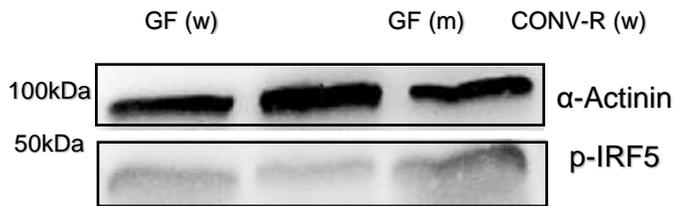


Abbildung 25: Darstellung eines Western Blots, hierbei wurde p-IRF5 für CONV-R Tiere und GF- Tiere dargestellt und gegen α-Actinin aufgetragen.

#### 4.9 Relative Intensität von IRF5 in GF- und in CONVR- Mäusen

Auch für IRF5 wurde die Relative Intensität rechnerisch bestimmt, wie oben beschrieben.

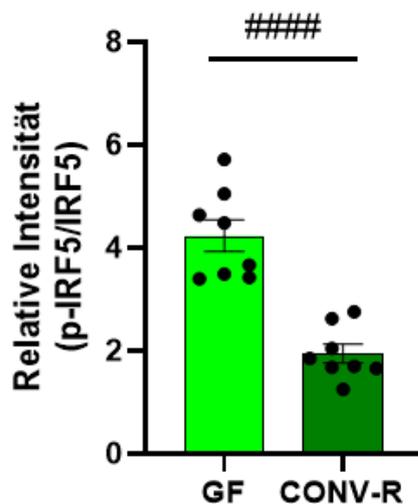


Abbildung 26: Vergleich der relativen Intensität (p-IRF5/IRF5) zwischen CONV-R Mäusen ( $n=8$ ) und GF- Mäusen ( $n=8$ ). Die Ergebnisse wurden als  $\pm$  SEM dargestellt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test,  $p \leq 0.0001$ .

Wie auch in den anderen Proteinen beobachtet ist in den keimfreien Mäusen die Relative Intensität signifikant höher als in den CONV-R Tieren. Damit zeigen sich die keimfreien Tiere mit einer deutlich erhöhten Signalstärke als in ihrer Kontrollgruppe.

## 4.10 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der TLR4- Rezeptoren in neutrophilen Granulozyten

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) ist ein Verfahren das für die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen eingesetzt wird. Sie basiert auf einer Antigen-Antikörper- Reaktion. Die verwendeten Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dies ermöglicht die Darstellung der entsprechenden Zielstrukturen. Im Falle der Vorliegenden Untersuchung wurde der CD284-PE und CD62L-FITC. CD284-PE markiert den TLR4 Rezeptor auf den neutrophilen Granulozyten. CD62L-FITC markiert das L-Selektin. L-Selektin stellt ein Adhäsionsmolekül auf neutrophilen Granulozyten dar. Zur Durchführung der Untersuchung wurden neutrophile aus dem Knochenmark isoliert und eine Lyse der noch verbliebenen Erythrozyten durchgeführt. Anschließend werden die Zellen mit dem entsprechenden FACS- Gerät gemessen. In der folgenden Abbildung kann man die entsprechenden Dot Plots sehen. Diese wurden durch entsprechende Gating-Strategien eingegrenzt.

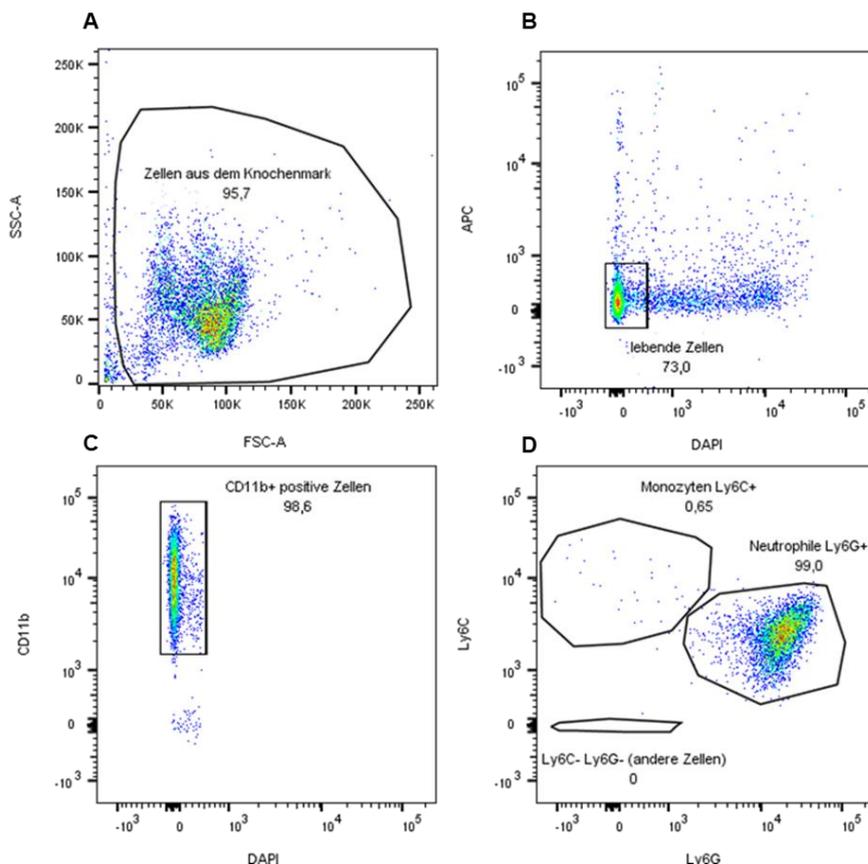


Abbildung 27: Durchflusszytometrie zur Bestimmung der TLR4 Expression in neutrophilen Granulozyten. Darstellung der entsprechenden Dot Plots. Bei der Erstellung des Gating Schemas unterstützte Dr. Frano Hernan Malinarich Gonzalez.

In der Durchflusszytometrie werden die Zellen im Kanal mit Licht beleuchtet. Ein Sensor erfasst die unterschiedlichen Lichtbrechungen und Reflektionen durch die Zellen. Diese Messungen können wir im Dot plot der Abbildung A sehen. Um die betreffenden Zellen wurde zuerst ein großes Gate gelegt. Dieses Gate schließt Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten ein, aber Zellreste aus. Anschließend wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegen eine APC- Mischung aufgetragen. Da DAPI tote Zellen markiert, konnte in der Abbildung B die lebenden Zellen identifiziert und ein entsprechend angepasstes Gate um die gelegt werden. Anschließend wurde CD11b gegen DAPI aufgetragen. CD11b ist ein Adhäsionsmolekül in Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. In der Abbildung D wurde Ly6C gegen Ly6G aufgetragen. Damit konnte der Anteil der neutrophilen Granulozyten bestimmt werden. Das entsprechende Gate wurde angelegt und die Anzahl der CD284- PE positiven Zellen bestimmt.

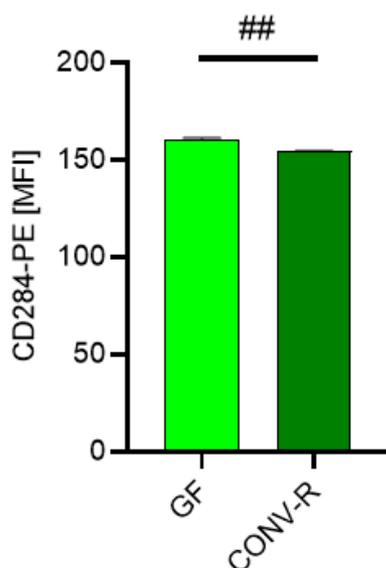


Abbildung 28: Darstellung der Mean Fluorescent Intensity in CD284-PE positiven neutrophilen Granulozyten in GF-Mäusen (n= 6) gegen CONV-R-Mäuse (n=6)

In dem dargestellten Diagramm wurden die CD284-PE positiv gemessenen Zellen des FACS in CONV-R- Mäusen gegen GF-Mäuse gemessen. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression des TLR4-Rezeptors in den zwei Testgruppen. In den GF-Mäusen konnte deutlich mehr TLR4-Rezeptoren mittels FACS detektiert werden, als in den CONV-R- Mäusen. Diese Ergebnisse unterstützen die in den vorangegangenen Western

Blots erhobene Daten, in denen sich eine quantitative Erhöhung der Proteine der Signalkaskade des TLR4-Rezeptors in den GF-Mäusen gegenüber den CONV-R-Tieren zeigt.

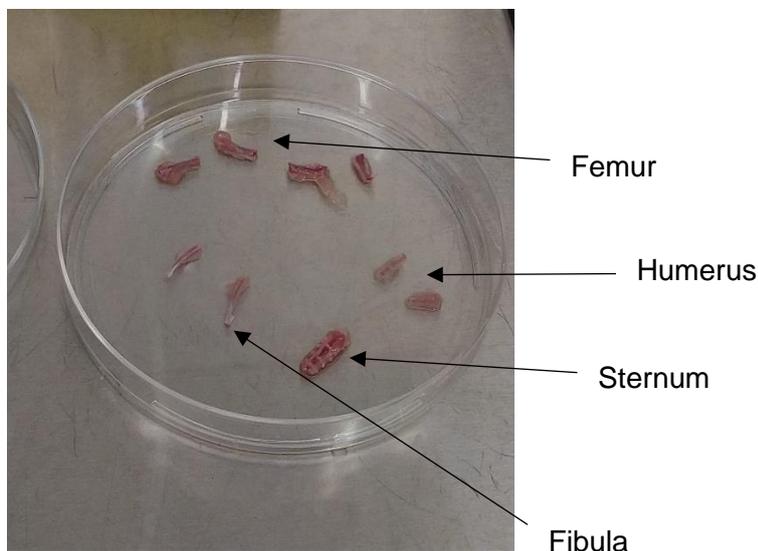
## 5 Diskussion

Der grundlegende Gedanke der vorliegenden Doktorarbeit war es, Unterschiede in der Expression auf Proteinebene des TLR4-Signalweges zwischen keimfreien und CONV-R Mäusen zu finden. Die Arbeiten der Forschungsgruppen im CTH der Universität Mainz um Prof. Dr. Christoph Reinhardt zeigten signifikante Unterschiede zwischen den inflammatorischen Reaktionen im Gefäßsystem von GF-Mäusen verglichen mit CONV-R Mäusen. Zu der Untermauerung dieser Forschungsergebnisse gehört eine Quantifizierung entscheidender Proteine. Jäckel S et al. zeigte im Blood 2017 das es signifikante Unterschiede im Thrombuswachstum verletzter Halsschlagadern von Mäusen gab. Hierbei zeigte sich eine enge Verknüpfung der angeborenen immunologischen Wege der Testtiere mit der Produktion von Wille-Brandt-Faktor- Bildung in der Leber und somit mit der Thrombenbildung (56). Kiouptsi K et al. hingegen zeigte 2019 dass es zwar keine signifikanten Unterschiede in der Plaque Bildung zwischen CONV-R und GF-Mäusen gibt, es jedoch in CONV-R Mäusen vermehrt zu niedrig gradigen inflammatorischen Reaktionen im Gefäßsystem kommt. Auch diese Arbeit bestätigte signifikante Unterschiede zwischen der Thrombusgröße in CONV-R und GF- Mäusen (57).

### 5.1 Separation neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark

Bei Menschen ist der übliche Weg, um neutrophile Granulozyten zu extrahieren, Vollblut zu entnehmen. Hierzu existieren diverse Isolationsprotokolle (58,59). Bei Mäusen zeigt sich dieses Vorgehen erschwert. Das niedrige Blutvolumen der Mäuse, von ungefähr 5ml, beinhaltet eine zu geringe neutrophilen Anzahl für weiterführende Untersuchungen. Deshalb wurden verschiedene Verfahren entwickelt um neutrophile in ausreichenden Mengen aus Mäusen zu gewinnen. Zu diesen gehören zum Beispiel die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus der Peritonealhöhle. Hierbei zeigt sich jedoch eine deutliche erhöhte Menge an aktivierten neutrophilen Granulozyten (60). Da für die Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit eine unkontrollierte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten nicht wünschenswert ist, wurde sich für die Isolation der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark entschieden.

Für diese Methode muss als erster Schritt den Mäusen die entsprechenden Knochen entnommen werden. Anfänglich wurde hierfür nur das Knochenmark aus Femur und Humerus Knochen der Mäuse verwendet. Die neutrophilen Granulozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Zellen getrennt. Die gewonnene Probe wurde mit dem Bradford Assay auf den entsprechenden Proteingehalt überprüft. Diese zeigten jedoch bei den anfänglich durchgeführten Bradford Assays eine geringe Proteinausbeute. Daraufhin wurde ein Alternativverfahren für die Isolation der neutrophilen aus dem Knochenmark getestet. Die Magnetic Activated Cell Separation (MACS) vermittelt über Inkubation mit sogenannten MicroBeads eine Zellseparation. Auch hierbei zeigte sich im durchgeführten Bradford Assay eine nicht ausreichender Proteingehalt. Um die Menge an neutrophilen Granulozyten und damit auch die Proteinmenge zu erhöhen wurde im Verlauf ebenfalls die Hüftknochen, das Sternum und die Tibia entnommen. Damit konnte der Proteingehalt deutlich erhöht werden. Das MACS Verfahren zeigte einen geringfügig niedrigeren Proteinanteil, sodass ich mich für die Isolation der neutrophilen Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation entschied. Die Knochenentnahme aus den Mäusen gestaltete sich teilweise schwierig, da die Röhrenknochen häufig an den Epiphysen zerbrachen. Das schmälerte zusätzlich den Proteingehalt der Probe. Zudem mussten die Knochen präzise von Muskulatur und Fett befreit werden um eventuelle Verunreinigungen in der Probe zu vermeiden.



*Abbildung 29: Entnommene Knochen aus den Versuchstieren zur Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark*

Die geschaffenen Phasen durch die Dichtegradientenzentrifugation zeigten sich anfällig für Erschütterung. Dies führte zu einer Vermischung der geschaffenen Phasen. Diese Erschütterungen traten häufig beim Transport von der Zentrifuge zur Steril Bank auf. Zudem

zeigten sich latente Verunreinigungen durch das durchstechen der oberen Phase, die Monozyten enthält, um die untere Phase zu pipettieren. Deshalb begrenzte ich die Häufigkeit des pipettierens der neutrophilen Granulozyten auf zwei mal.

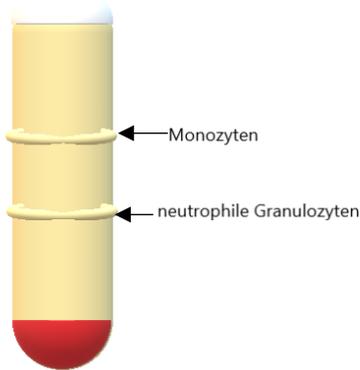


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Phasen der Dichtegradient- Zentrifugation

Die Phasen stellen sich als heller Ring dar. Sicherlich stellt es auch eine Herausforderung dar den Ring ordentlich mittels Pipette abzusaugen und das vollständig. Nimmt man zu wenig ab, verliert man einen wichtigen Anteil an Zellen. Dies wiederum reduziert dann den Proteingehalt des Zellysats, der zur Durchführung des Western Blots wichtig ist.

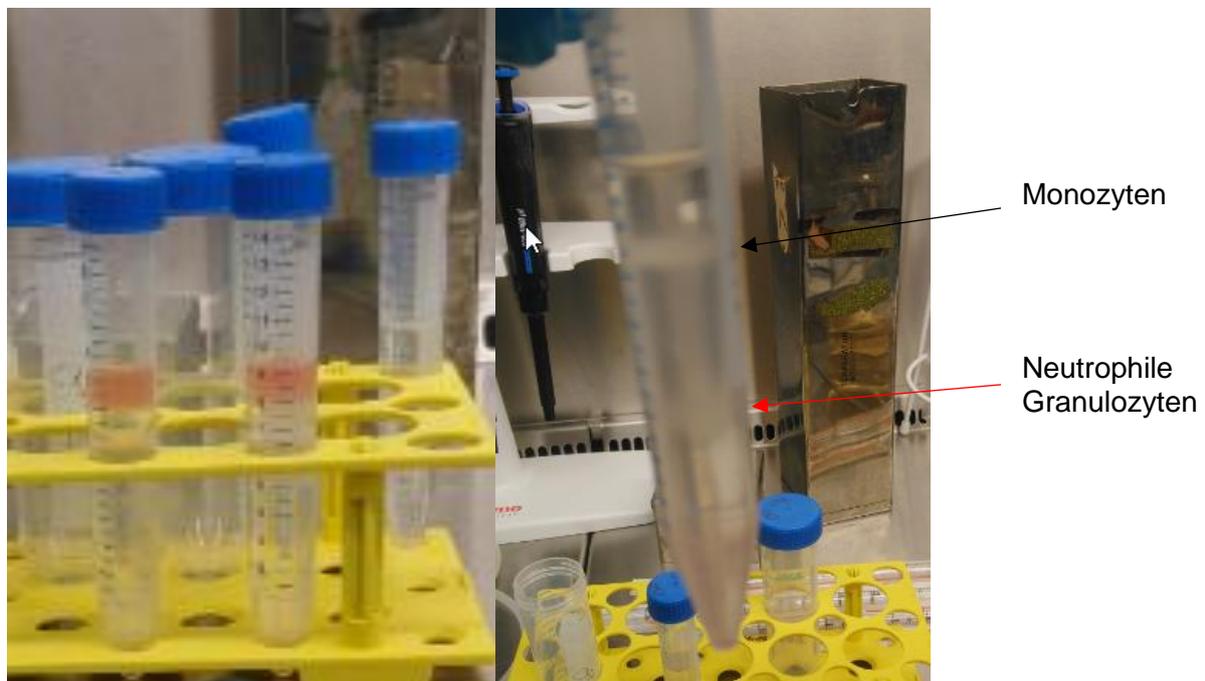


Abbildung 31: Dichtegradient- Zentrifugation im Labor

Die Proben wurden, nach Lysierung und anschließender Bestimmung des Proteingehaltes, eingefroren und zur weiteren Analyse aufgetaut.

## 5.2 Proteinübertragung mittels Western Blot

Der Western Blot bietet, aufgrund seiner vielen unterschiedlichen Schritte, eine Vielzahl an Fehlerquellen und ist daher durchaus kritisch zu betrachten. Lakshmi et al. zeigt in seiner Publikation von 2020 kritisch die Fehlerquellen und Schwächen der Methodik auf (61).

Die ersten Probleme zeigten sich in der Herstellung und Verwendung der Gele für den Western Blot. Die Gele für den Western Blot wurden für jedes Experiment frühestens einen Tag vorher vorbereitet und im Kühlschrank, feucht, gelagert. Anfänglich kam es zu dazu das die Gele austrockneten. Daher passte ich die Lagerbedingungen entsprechend an. Die Prozente des Agarose Gels entscheiden darüber wie stark quervernetzt das Gel und damit auch wie durchlässig das Gel ist. Anfänglich experimentierte ich sowohl mit 8%igen als auch mit 10% Gel. Nach vergleichen der Ergebnisse zeigte sich das die 8%igen Gele ein besseres Ergebnis in der Auftrennung der Proteine zeigten.

Die Gele selbst zeigten sich häufig Fehleranfällig. Bei bereits minimalen Konzentrationsabweichungen wurde das Gel instabil und polymerisierte nicht. Somit waren diese Gele nicht für Experimente zu gebrauchen. Zudem zeigten sich die Taschen der Gele als sehr empfindlich. Die in der Gelkammer gegossenen Gele wurden mit einem Kamm im Flüssigen Zustand versehen, sodass sich die Taschen ausbildeten. Diese Taschen sind zur Beladung des Gels mit Proteinen notwendig. Beim Entfernen des Kamms im polymerisierten Zustand kam es häufig zum Zerreißen des Gels und der Kammern, womit das Gel nicht mehr zu verwenden war.

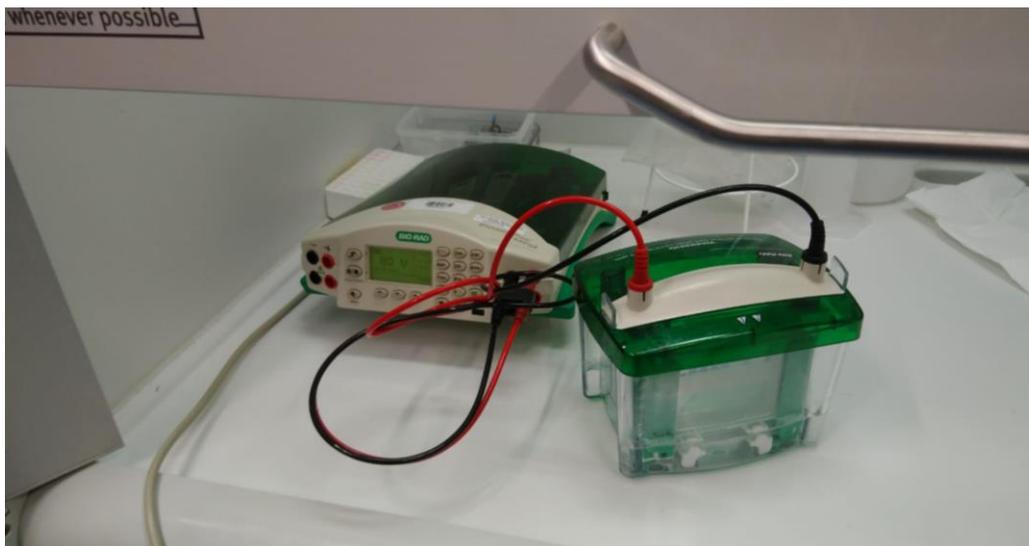
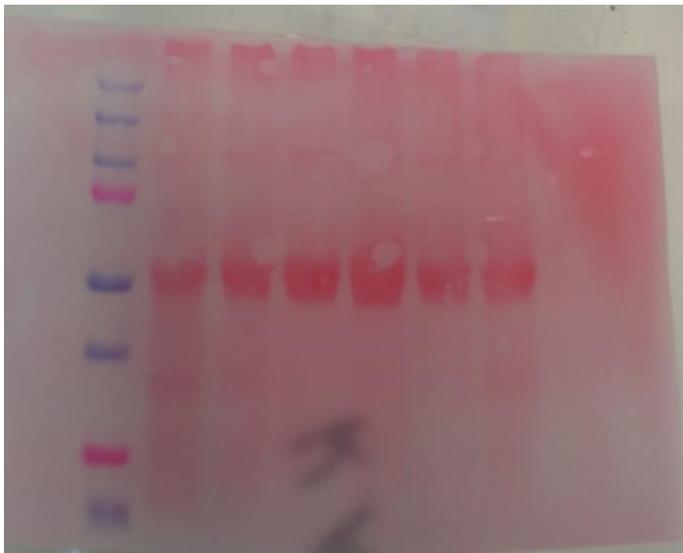


Abbildung 32: Versuchsaufbau mit Elektrophorese Kammer mit PowerPac

In der Elektrophorese Kammer wurde die Proteinlysate im elektrischen Feld, entsprechend ihrer Größe, aufgetrennt. Eine zu geringe Spannung sorgte für eine sehr lange Laufzeit, zu hohe Spannung konnte die Proteine zerstören.

Nach der Elektrophorese Kammer wurde das Gel entsprechend auf eine Membran gelegt. Der Transfer des Gels auf die Membran zeigte sich als sensibler Punkt des Experimentes. Das Gel musste sehr vorsichtig aus der Elektrophorese Kammer auf die Polyvinylidene Difluoride Membran (PVDF) transferiert werden. Hierbei blieb zu beachten, dass das Gel zu keinem Zeitpunkt austrocknen durfte und ständig befeuchtet sein musste. Trocknet das Gel aus war es für den Transfer nicht mehr zu verwenden. Zudem zeigte sich die Membran äußerst sensibel. Es musste darauf geachtet werden die Membran lediglich mit einer Pinzette am äußeren Rand zu berühren, sonst wäre die Membran beschädigt und somit unbrauchbar gewesen. Dies wiederum gestaltete das Blasenfrei auflegen der Membran auf das Gel sehr schwierig. Lag die Membran nicht Blasenfrei auf, konnte man den durchgeführten Western Blot später nicht verwerten da man keine Auswertung mit dem Fusion Gerät vornehmen kann. Problematisch zeigte sich anfänglich das man die Blasenbildung erst nach der Inkubation der Antikörper und mit der Detektion im Fusion Gerät sehen konnte. Das bedeutet erst im letzten Schritt konnte man den Fehler erkennen und musste mit dem gesamten Western Blot von vorne anfangen. Nach einigen Suchen für eine Zwischenkontrolle wurde für die vorliegende Arbeit Ponceau S verwendet. Dieser rote Bisazofarbstoff färbt die PVDF Membran rot und man kann die potentiellen Fehlerquellen so detektieren.

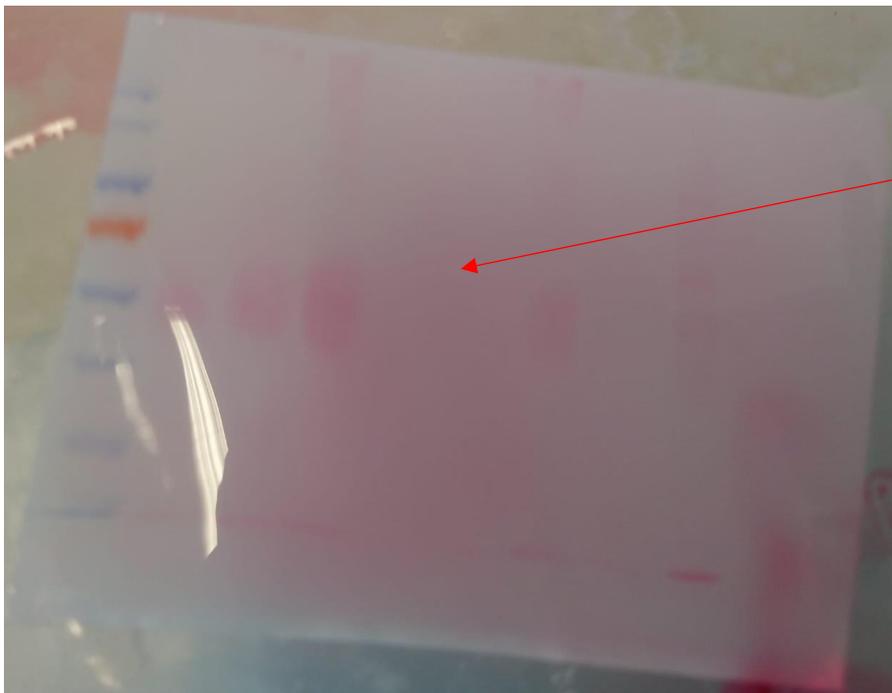


*Abbildung 33: Anfärbung mit Ponceau S der PVDF Membran*



*Abbildung 34: Detektion mit dem Fusion Gerät eines fehlerhaften Western Blot aufgrund von Blasenbildung*

Ein weiterer Vorteil der Ponceau S Färbung zeigte sich darin das man somit Überprüfen konnte ob die Proteine überhaupt transferiert wurden. Potenzielle Fehlerquellen beim Transfer zeigten sich in inkorrekt Schichtung des Blotting-Sandwichs, zu wenig Transferpuffer oder fehlerhaftem Anschluss an die Stromquelle.



*Abbildung 35: Fehlende Übertragung der Proteine vom Gel auf die PVDF Membran*

Im Folgenden mussten die Membranen zugeschnitten und mit den gewünschten Antikörpern inkubiert werden. Zuerst wurde versucht die Membran komplett zu inkubieren, um eventuelle Fehler durch das zuschneiden einer Membran zu verhindern. Dies zeigte sich schwierig da das entsprechende Stripping, ein Verfahren um eine bereits inkubierte Membran von den Antikörpern zu befreien um sie erneut zu inkubieren, sich als äußerst Fehleranfällig erwies. Durch das Stripping entstanden doppelte Banden machten eine korrekte Auswertung der Membranen schwierig.

Es zeigte sich im Verlauf der Doktorarbeit das der Western Blot als Methodik eine hohe Fehleranfälligkeit zeigte. Dies ist sicher nicht zuletzt der hohen Anzahl an Zwischenschritten geschuldet, die für die Durchführung des Western Blots notwendig sind.

### **5.3 Unterschiede in der inflammatorischen Antwort zwischen GF-Mäusen und CONV-R**

In der Literatur haben sich bereits zu Beginn meiner Doktorarbeit deutliche Unterschiede zwischen CONV-R Mäusen und GF-Mäusen angedeutet. Die Forschungsgruppe um Xiang et al. hat zum Beispiel herausgearbeitet, dass sich bei keimfreien Mäusen, die eine Stuhltransplantation von Mäusen mit hochkalorischer Kost erhielten, eine deutliche Hepatozyten Proliferation und inflammatorische Reaktion einstellten (62).

Hernández-Chirlaque et al. beschäftigte sich 2016 in ihrer Publikation mit der Entstehung der dextran sulphate sodium Colitis in CONV-R Mäusen gegenüber GF- Mäusen. Hierbei zeigten sie das es zu einer deutlich erhöhten Neutrophilen Rekrutierung in die Darmwand bei GF-Mäusen als in ihren Kontrollgruppen kam. Zudem zeigte sich die IL-6 Produktion in GF-Mäusen gegenüber CONV-R Mäusen deutlich erhöht. Die Autoren verweisen aber auch darauf, dass es viele widersprüchliche Forschungsergebnisse zu dem Thema gibt. Kitajima et al. jedoch hat gezeigt das die behandelten GF-Mäuse wesentlich stärkere Entzündungsreaktionen als ihre Kontrollgruppen zeigten und sogar eher verstarben. Die Autoren bedienten sich bei dieser Forschungsarbeit ebenfalls der Methodik des Western Blots. Hierbei konnte zum Beispiel beim IL-6 eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge gegenüber den Kontrolltieren gezeigt werden (63).

Thevaranjan et. al zeigte in ihrer Publikation von 2017 jedoch das GF- Mäuse mit zunehmendem Alter jedoch weniger chronisch entzündliche Reaktionen als die CONV-R Tiere zeigten. Die inflammatorischen Proteine, wie zum Beispiel IL-6, zeigten sich deutlich reduziert gegenüber der Kontrollgruppe. Dadurch zeigten die GF- Mäuse signifikant weniger atherosklerotische Veränderungen (64).

In meinen Untersuchungen der Proteinmenge zeigte sich das phospho-IRF5 in GF-Mäusen im Unterschied zu CONV-R Tieren signifikant erhöht. Die Proteinmengen in IRAK4, phospho-IRAK4, IRF3, phospho-IRF3 und IRF5 jedoch nur tendenziell erhöht. In den relativen Intensitäten von IRAK4, IRF3 und IRF5 zeigten sich die Proteinmenge der GF-Mäuse jedoch signifikant erhöht gegenüber den Kontrolltieren. Dies legt die Vermutung nahe das die inflammatorische Antwort der GF-Mäuse deutlich stärker ausfällt als die der CONV-R-Mäuse. Diese Vermutung deckt sich mit den Arbeiten von Kitajima et al. und Xiang et al. .

Die chronischen Entzündungen zu weniger inflammatorischen Reaktionen führen erscheint nachvollziehbar. Werden doch hierfür eine Endotoxämie durch die mikrobielle Darmmikrobiota benötigt. Diese sind jedoch an das Vorhandensein einer mikrobiellen Besiedelung geknüpft, die in GF-Mäusen nicht existiert. Einen Rückschluss über verminderte inflammatorische Reaktionen kann man hierdurch nicht erschließen.

#### **5.4 Geschlechterspezifische Unterschiede in der Proteinexpression**

Im Verlauf der Experimente dieser Doktorarbeit zeigten sich immer wieder deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Letztendlich kann man an den Diagrammen erkennen das, außer bei phospho-IRAK4, die weiblichen Tiere quantitativ mehr der gemessenen Proteine exprimieren als ihre männlichen Artgenossen.

AnaLleo et al. ist eine der vielen Publikationen die sich mit der Fragestellung nach Geschlechtsunterschieden bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beschäftigt. In der Publikation wird aufgezeigt das es bereits im Immunsystem zwischen Männern und Frauen deutliche quantitative Unterschiede gibt. Frauen zeigen hierbei eine erhöhte Antikörperproduktion, eine erhöhte Zahl an CD4<sup>+</sup>-Zellen und einen höheren IgM-Plasmaspiegel der seinerseits wieder die Zytokinproduktion erhöht. Eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen zeigen ein signifikant häufigeres Auftreten bei Frauen als bei Männern, unter anderem Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, Sjögren-Syndrom oder Sklerodermie. Bei anderen Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis sind die Frauen zwar nicht mehr in so hohen Prozentsätzen betroffen, mit 60-75% aber immer noch deutlich häufiger als die männlichen Vertreter. Eine der wenigen Autoimmunerkrankungen in denen Männer häufiger betroffen sind als Frauen ist zum Beispiel die primär sklerosierende Cholangitis. (52)

Diese medizinischen Beobachtungen spiegeln sich auch in meinen Forschungsergebnissen wieder. Sowohl in den CONV-R, als auch in den GF-Mäusen, zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Einzig und allein p-IRAK4 in den CONV-R Tieren zeigt hier eine Ausnahme. Bei dieser Versuchsgruppe zeigt sich das Protein

quantitativ vermindert exprimiert in der weiblichen Gruppe. Natürlich muss man bei der vorliegenden Doktorarbeit mit berücksichtigen das die Fallzahlen in den Versuchsgruppen relativ niedrig waren. Somit können einzelne statistische Ausreißer deutlich mehr ins Gewicht fallen. Trotz einer verwendeten Tier Anzahl von 189 Tieren, konnte nur eine deutlich kleinere Menge für die Experimente genutzt werden. Das lag zum einem am langen Findungsprozess die Methode für die neutrophilen Granulozyten nutzbar zu machen. Zum anderen an den anfänglich niedrigen Proteinkonzentrationen und den somit oben beschriebenen Problemen. Dennoch sieht man bei den CONV-R Tieren für IRAK4, phospho-IRAK4, IRF5, phospho-IRF5, IRF3 und phospho IRF3 einen signifikanten Unterschied in den Geschlechtern. Bei den GF-Mäusen zeigte sich in phospho-IRAK4, IRF5 und phospho-IRF5 signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse, geschlechterunabhängig, erschwerte diese Tatsache jedoch. Wie man an den entsprechenden Diagrammen (Abbildung 19 C) erkennen kann. Hier zeigt sich eine relativ große Streubreite, da die Werte der männlichen und weiblichen Tiere teilweise stark voneinander abweichen. Insgesamt zeigt sich dadurch, außer für phospho-IRF5, lediglich eine Tendenz für die höhere Proteinmenge, jedoch kein signifikanter Unterschied.

Unterstützt wird dieses Ergebnis von der durchgeführten FACS Untersuchung. Hierbei konnte gezeigt werden das die GF-Mäuse signifikant mehr TLR4-Rezeptoren als die CONV-R- Mäuse besitzen. Daher kann bei einem LPS- induzierten Reiz auf die TLR4-Rezeptoren in den GF-Mäusen eine deutlich stärkere Antwort generiert werden, da sie mehr Rezeptoren besitzen. Somit exprimieren sie, gegenüber der Kontrollgruppe, auch mehr Proteine der Signalkaskade.

## **5.5 Regulatorische Aktivität der neutrophilen Granulozyten auf die Immunantwort**

Aus meinen erhobenen Ergebnissen heraus stellt sich die Frage ob der gesteigerten Menge an Proteinen und an proinflammatorischen Elementen zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort durch die neutrophilen Granulozyten führt.

Ascher et al. zeigten in ihrer Publikation von 2020 das GF-Mäuse, denen eine Ischämie-Reperfusionverletzung der mesenterialen Venolen zugefügt wurden, signifikant mehr NET Strukturen ausbildeten als ihre CONV-R Kontrolltiere. Diese Erkenntnis wurde mittels der aus dieser Arbeit stammenden Daten für erhöhte inflammatorische Proteinmengen in GF-Mäusen untermauert. Damit wurde eine deutlich gesteigerte Reaktivität für neutrophile Granulozyten bei keimfreien Mäusen für die NETosis und eine Einschränkung eben dieser durch das Vorhandensein einer Darmmikrobiota gezeigt (65).

Die Endotoxintoleranz ist ein Mechanismus der neutrophilen Granulozyten. Er ist unter anderem durch eine Verringerung der TLR4- Expression gekennzeichnet. Meine FACS- Ergebnisse zeigten eine deutlich geringere Produktion in den CONV-R-Tieren, was auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist. Die GF-Mäuse zeigten eine deutlich erhöhte Konzentration, was die Beteiligung der Darmmikrobiota an der Ausbildung der Endotoxintoleranz unterstreicht (51).

Pillay et al. zeigten in ihren Untersuchungen mit menschlichen neutrophilen Granulozyten dass diese in der Lage sind nicht nur Teil der Immunantwort zu sein, sondern diese auch zu supprimieren. Dies geschieht durch eine Wasserstoffperoxidfreisetzung die zu einer Unterdrückung von T-Zellen führt. Ebenfalls gibt es Untersuchungen, dass das durch die neutrophilen Granulozyten produzierte IL-10 die murine Abwehr stört (66).

Lelifeld et al. zeigte die neutrophile Elastase die Induktion und Reifung von Th1-Zellen reduziert. Auch hier wurde die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur T-Zellunterdrückung gezeigt. Dieser Mechanismus steht in engen Zusammenhang mit Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen. Damit schützen neutrophile Granulozyten zum gewissen Teil das Gewebe vor unerwünschten starken inflammatorischen Reaktionen. Zum anderen stellt dieser Mechanismus jedoch eine Problematik dar. Wenn neutrophile Granulozyten zu den Lymphknoten wandern und dort die Immunantwort supprimieren, kann es zu unerwünschten schwächeren Immunantworten führen (67).

Somit bleibt zu vermuten dass neutrophile Granulozyten in GF-Tieren zwar deutlich stärker mittels NET Bildung reagieren und auch ihre inflammatorische Signalkaskade, aufgrund der erhöhten Proteinmenge, verstärkt ausfällt, aber es noch einige TLR4 unabhängige Wege zur Autoregulation der Immunantwort durch neutrophile Granulozyten gibt.

## **6 Zusammenfassung**

Die Darmmikrobiota ist ein multikomplexes System aus vielen verschiedenen Bausteinen. Sie umfasst alle Mikroorganismen die den Darmbereich besiedeln. Die Zusammensetzung dieser ist von vielen intrinsischen und extrinsischen Faktoren abhängig. So nehmen Ernährung und genetische Prädispositionen eine wichtige Schlüsselposition bei der Zusammensetzung dieser ein. Aber auch der Geburtsmodus und medikamentöse Einflüsse zeigen eine Beeinflussung der Konstellation der intestinalen Mikrobiota.

Als größtes inneres Organ ist der Darm bereits seit einigen Jahrzehnten Mittelpunkt vielfältiger Forschungsarbeiten. Trotz der Besiedlung durch diverse unterschiedliche Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren aber auch Pilze, macht uns diese Flora nicht krank, sondern stellt sogar

einen Schutz unserer Darmschleimhaut dar. In den Forschungsarbeiten konnte unter anderem herausgearbeitet werden, dass die intestinale Darmmikrobiota und das Immunsystem in einem engen Verhältnis zueinanderstehen.

Ein weiteres breites Forschungsfeld, ist in diesem Zusammenhang, die Arbeit mit keimfreien Tieren. Die Züchtung und Haltung dieser speziellen Tiere ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv, sodass nur wenige Forschungsgruppen die Möglichkeit haben mit diesen Tieren zu arbeiten. Durch die spezielle Züchtung sind die Tiere frei von mikrobieller Besiedelung. Damit zeigen sie in optimaler Weise welchen Einfluss das fehlen der Darmmikrobiota hat.

Die neutrophilen Granulozyten, als Bestandteil des angeborenen Immunsystem, stellen hierbei einen zentralen Punkt der inflammatorischen Antwort auf pathogene Mikroorganismen aber auch körpereigene Strukturen dar. Mittels zahlreicher Mechanismen können die neutrophilen Granulozyten auf fremde Strukturen reagieren und diese bekämpfen. Hierzu zählen unter anderem die NET Bildung, aber auch die Endotoxin Toleranz.

Diese inflammatorische Antwort wird, unter anderem, auf zellulärer Ebene in den neutrophilen Granulozyten mittels TLR4- Signalweg vermittelt. Hierbei kommt es über die Signalkaskade zur Bildung unterschiedlicher Proteine, die allesamt das Ziel haben bestimmte inflammatorische Transkriptionsfaktoren und Chemokine zu aktivieren.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene Schlüsselproteine des TLR4-Signalweges ausgewählt und quantitativ, mittels Western Blot, dargestellt. Es handelte sich hierbei um IRF3, IRAK4 und IRF5, sowie deren phosphorylierten Varianten. Hierbei wurden Wildtypen und keimfreie Mäuse miteinander verglichen. Die Gewinnung der neutrophilen Granulozyten erfolgte hierbei aus dem Knochenmark der Tiere. Zudem wurde mittels FACS Untersuchung die Dichte der TLR4 Rezeptoren nachgewiesen.

Letztendlich zeigen die Ergebnisse das in den relativen Intensitäten die keimfreien Mäuse einen höheren quantitativen Proteingehalt aufzeigten. Das legt die Vermutung nahe das die keimfreien Tiere auch zu einer stärkeren proinflammatorischen Antwort neigen. Zusätzlich konnte im FACS eine höhere Dichte an TLR4- Rezeptoren nachgewiesen werden.

Seit längerem sind die Zusammenhänge zwischen Autoimmunerkrankungen und körpereigenen proinflammatorischen Prozessen bekannt. In verschiedenen Forschungsarbeiten wurde gezeigt das es Unterschiede zwischen Männern und Frauen, bezüglich der Häufigkeit der Erkrankung an Autoimmunprozessen gibt. In meiner Doktorarbeit konnte ich einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren zeigen.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Ferenčík M, Rovenský J, Mat'ha V, Herol M. Kompendium der Immunologie: Grundlage der Klinik; 2006. p. 43.
- (2) Speckmann E, Heschler J, Köhlig R. Physiologie Auflage 5; 2008. p. 321-324.
- (3) Speckmann E, Heschler J, Köhlig R. Physiologie Auflage 5; 2008. p. 357.
- (4) Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth P, Martin E, Bardenheuer H et al. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis Anaesthesist; 2004. p.10–28.
- (5) Kiouptsi K, Jäckel S, Pontarollo G, Grill A, Kuijpers M, Wilms E. The Microbiota Promotes Arterial Thrombosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice 2019.
- (6) Pressemitteilung Nr. 505 vom 4. November 2021; 2021. Available from: URL: [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21\\_505\\_23211.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21_505_23211.html).
- (7) Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology; 2018. Available from: URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_1).
- (8) Speckmann E, Heschler J, Köhlig R. Physiologie Auflage 5; 2008. p. 321.
- (9) Speckmann E, Heschler J, Köhlig R. Physiologie Auflage 5; 2008. p. 364.
- (10) Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S. Duale Reihe: Anatomie Auflage 2; 2010. p. 141.
- (11) Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology: Chapter 3 The induced Responses of Innate Immunity; 2012. p. 95-173
- (12) Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S. Duale Reihe: Anatomie Auflage 2; 2010. p. 139-140.
- (13) Shao S, Fang H, Dang E, Xue K, Zhang J, Li B, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk; 2019. Front Immunol. 2019;10:746.
- (14) Hosoki K, Aguilera-Aguirre L, Brasier AR, Kurosky A, Boldogh I, Sur S. Facilitation of Allergic Sensitization and Allergic Airway Inflammation by Pollen-Induced Innate Neutrophil Recruitment. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016;54(1):81-90.
- (15) Schuster N. Männer und Frauen: Unterschiede in der Immunantwort. [cited 2021 Dez 30]. Available from: URL: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/unterschiede-in-der-immunantwort-119060/>
- (16) Romerio A, Peri F. Increasing the Chemical Variety of Small-Molecule-Based TLR4 Modulators: An Overview. Front Immunol. 2020;11:1210.

- (17) Mifsud E, Tan A, Jackson D. TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease; 2014. *Front. Immunol.*
- (18) Sigmund-Schulze N. Toll-like-Rezeptoren: Neue Zielstruktur für immunstimulierende Medikamente. [cited 2022 Jan 08]. Available from: URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/55316/Toll-like-Rezeptoren-Neue-Zielstruktur-fuer-immunstimulierende-Medikamente>
- (19) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-397
- (20) Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 1985;42(3):791-798. doi:10.1016/0092-8674(85)90275-2
- (21) Li J, Wang X, Zhang F, Yin H. Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases; 2013. *Pharmacology & Therapeutics* 138 (3) :441-451
- (22) Mukherjee S, Huda S, Sinha Babu SP. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J Immunol.* 2019;90(1):e12771.
- (23) Burger-Kentischer A, Kohl C. PRR-Antagonisten und -Agonisten als neue Immunmodulatoren. [cited 2022 Jan 25]. Available from: URL: [PRR-Antagonisten und -Agonisten – Screening nach neuen Immunmodulatoren - Fraunhofer IGB.](#)
- (24) Kumar V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *Int Immunopharmacol.* 2020;89(Pt B):107087.
- (25) Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future [published correction appears in *Int Immunopharmacol.* 2018 Sep;62:338]. *Int Immunopharmacol.* 2018;59:391-412.
- (26) Naqvi I, Giroux N, Olson L, et al. DAMPs/PAMPs induce monocytic TLR activation and tolerance in COVID-19 patients; nucleic acid binding scavengers can counteract such TLR agonists. *Biomaterials.* 2022;283:121393.
- (27) Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling - *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 2006. [online]. Available from: URL: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(06\)00439-8/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(06)00439-8/fulltext).
- (28) Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-151.

- (29) Wu Z, Zhang Z, Lei Z, Lei P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease: Cytokine & Growth Factor Reviews; 2019. p. 24-31.
- (30) Schütt C. CD14: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology Volume 3 Issue 5;1999.
- (31) Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(4):621-625.
- (32) Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(4):1233-1261.
- (33) Wang Z, Wesche H, Stevens T, Walker N, Yeh WC. IRAK-4 inhibitors for inflammation. *Curr Top Med Chem.* 2009;9(8):724-737.
- (34) Petro TM. IFN Regulatory Factor 3 in Health and Disease. *J Immunol.* 2020;205(8):1981-1989.
- (35) Thompson CD, Matta B, Barnes BJ. Therapeutic Targeting of IRFs: Pathway-Dependence or Structure-Based? *Frontiers in Immunology*;2018 Available from: URL: [Frontiers | Therapeutic Targeting of IRFs: Pathway-Dependence or Structure-Based? | Immunology \(frontiersin.org\)](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimm.2018.01611/full).
- (36) Ascher S, Reinhardt C. The gut microbiota: An emerging risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. *Eur J Immunol.* 2018;48(4):564-575.
- (37) Bosch TCG. Mikrobiom als natürlicher Schutzfaktor : Perspektiven aus der Grundlagenforschung [The skin microbiome as a natural protection factor : Insights from basic research]. *Hautarzt.* 2021;72(7):563-569.
- (38) Konturek PC. Wie wirkt sich COVID-19 auf die intestinale Mikrobiota aus? [How does COVID-19 affect intestinal microbiota?]. *MMW Fortschr Med.* 2021;163(Suppl 5):17-20.
- (39) Stockert K. Allergie, Mikrobiom und weitere epigenetische Faktoren. *Allergieprävention.* 2020;47-118.
- (40) Carter PB, Foster HL. The Laboratory Rat (Second Edition) Chapter 22 Gnotobiotics; 2006. p. 693-710.
- (41) Schoeb TR, Rahija RJ, In American College of Laboratory Animal Medicine: Laboratory Animal Medicine (Third Edition);2015. p. 1263-1296.
- (42) Wymore Brand M, Wannemuehler MJ, Phillips GJ, et al. The Altered Schaedler Flora: Continued Applications of a Defined Murine Microbial Community. *ILAR J.* 2015;56(2):169-178.
- (43) Gabay O, Vicenty J, Smith D, et al. Using a Model of Germ-Free Animals to Study the Impact of Gut Microbiome in Research: A Step by Step Sterility Setting and Management. *Methods Protoc.* 2020;3(1):18.

- (44) Bayer F, Ascher S, Pontarollo G, Reinhardt C. Antibiotic Treatment Protocols and Germ-Free Mouse Models in Vascular Research. *Front Immunol.* 2019;10:2174.
- (45) Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.* 2017;101(1):107-119.
- (46) Gordon S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *J Innate Immun.* 2016;8(3):223-227.
- (47) Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology: Die Dynamik der angeborenen und adaptiven Immunantwort; 2012. p. 581-639.
- (48) Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(2):95-112.
- (49) Othman A, Sekheri M, Filep JG. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity [published online ahead of print, 2021 Mar 8].
- (50) Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, et al. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity.* 2013;39(4):647-660.
- (51) Lotz M, Gütle D, Walther S, Ménard S, Bogdan C, Hornef MW. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J Exp Med.* 2006;203(4):973-984.
- (52) Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex?. *Autoimmun Rev.* 2008;7(8):626-630.
- (53) Roswall J, Olsson LM, Kovatcheva-Datchary P, et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell Host Microbe.* 2021;29(5):765-776.e3.
- (54) Sudowe S. Silent Inflammation - Endotoxinämie als Wegbereiter für chronische Entzündungsprozesse; 2017. *Naturheilkunde Journal.* 19. 104.
- (55) Pressemitteilung Nr. 347 vom 29. September 2017. Available from: URL: [URL: Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten - Statistisches Bundesamt \(destatis.de\)](https://www.destatis.de/DE/Pressemitteilungen/17_09/17_09_347.html)
- (56) Jäckel S, Kiouptsi K, Lillich M, et al. Gut microbiota regulate hepatic von Willebrand factor synthesis and arterial thrombus formation via Toll-like receptor-2. *Blood.* 2017;130(4):542-553.
- (57) Kiouptsi K, Jäckel S, Pontarollo G, et al. The Microbiota Promotes Arterial Thrombosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice; 2019 *mBio.* 2019;10(5):e02298-19.
- (58) Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol; 2018 *J Vis Exp.* 2008;(17):745.

- (59) Kuhns DB, Priel DAL, Chu J, Zarembek KA. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:7.23.1-7.23.16.
- (60) Swamydas M, Luo Y, Dorf ME, Lionakis MS. Isolation of Mouse Neutrophils; 2015. *Curr Protoc Immunol*. 2015;110:3.20.1-3.20.15.
- (61) Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2020;593:113608.
- (62) Zhang X, Coker OO, Chu ES, et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. *Gut*. 2021;70(4):761-774.
- (63) Hernández-Chirilaque C, Aranda CJ, Ocón B, et al. Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J Crohns Colitis*. 2016;10(11):1324-1335.
- (64) Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, et al. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction [published correction appears in *Cell Host Microbe*. 2018 Apr 11;23(4):570]. *Cell Host Microbe*. 2017;21(4):455-466.e4.
- (65) Ascher S, Wilms E, Pontarollo G, et al. Gut Microbiota Restricts NETosis in Acute Mesenteric Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(9):2279-2292.
- (66) Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012;122(1):327-336.
- (67) Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. 2013; *Crit Care*.
- (68) Adriana. Aufbau von Lipopolysaccharid Endotoxinen, 2020. Available from: URL: [Aufbau von Lipopolysaccharid Endotoxinen - Minerva Analytix \(minerva-analytix.com\)](http://www.minerva-analytix.com) (20.03.2022)

## 8 Anhang

The gut microbiota restricts NETosis in acute mesenteric ischemia-reperfusion injury

Running Title: Gut microbiota in mesenteric ischemia-reperfusion

Stefanie Ascher<sup>1,2,#</sup>, Eivor Wilms<sup>1,#</sup>, Giulia Pontarollo<sup>1</sup>, Henning Formes<sup>1</sup>, Franziska Bayer<sup>1</sup>, Maria Müller<sup>1</sup>, Frano Malinarich<sup>1</sup>, Alexandra Grill<sup>1,3</sup>, Markus Bosmann<sup>1,4</sup>, Mona Saffarzadeh<sup>1</sup>, Inês Brandão<sup>1,5</sup>, Kathrin Groß<sup>1</sup>, Klytaimnistra Kiouptsi<sup>1</sup>, Jens M. Kittner<sup>6</sup>, Karl J. Lackner<sup>7</sup>, Kerstin Jurk<sup>1</sup>, Christoph Reinhardt<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Thrombosis and Hemostasis (CTH), University Medical Center of the Johannes Gutenberg University of Mainz, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz, Germany. <sup>2</sup>Institute for Pharmacy & Biochemistry, Johannes Gutenberg University of Mainz, Johann-Joachim-Becher-Weg 30, 55128 Mainz, Germany. <sup>3</sup>German Center for Cardiovascular Research, Partner Site RheinMain, Mainz, Germany. <sup>4</sup>Pulmonary Center, Department of Medicine, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA. <sup>5</sup>Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar (CATAA), Zona Industrial de Castelo Branco, Rua A, 6000-459 Castelo Branco, Portugal. <sup>6</sup>I. Department of Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany. <sup>7</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany.

# These authors contributed equally.

\*Corresponding author and lead contact: Christoph Reinhardt,  
Christoph.Reinhardt@unimedizin-mainz.de, +49-6131-17-8280; FAX: +49-6131-17-6238

#### Abstract

**Objective:** Recruitment of neutrophils and formation of neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to lethality in acute mesenteric infarction. To study the impact of the gut microbiota in acute mesenteric infarction, we used gnotobiotic mouse models to study whether gut commensals prime the reactivity of neutrophils towards NETosis.

**Approach and Results:** We applied a mesenteric ischemia-reperfusion (I/R) injury model to germ-free (GF) and colonized C57BL/6J mice. By intravital imaging, we quantified leukocyte

adherence and NET formation in I/R-injured mesenteric venules. Colonization with gut microbiota or monocolonization with *Escherichia coli* augmented the adhesion of leukocytes, which was dependent on the Toll-like receptor-4 (TLR4) / TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) pathway. Although neutrophil accumulation was decreased in I/R-injured venules of GF mice, NETosis following I/R injury was significantly enhanced compared with conventionally raised (CONV-R) mice or mice colonized with the minimal microbial consortium altered Schaedler flora (ASF). Also ex-vivo, neutrophils from GF and antibiotic-treated mice showed increased lipopolysaccharide (LPS)-induced NETosis. Enhanced TLR4 signaling in GF neutrophils was due to elevated TLR4 expression and augmented IRF3 phosphorylation. Likewise, neutrophils from antibiotic-treated CONV-R mice had increased NET formation before and after ischemia. Increased NETosis in I/R injury was abolished in CONV-R mice deficient in the TLR adaptor TRIF. In support of the desensitizing influence of enteric LPS, GF mice treatment with LPS via drinking water diminished LPS-induced NETosis in vitro and in the mesenteric I/R injury model.

Conclusions: Collectively, our results identified that the gut microbiota suppresses NETing neutrophil hyperreactivity in mesenteric I/R injury, while ensuring immunovigilance by enhancing neutrophil recruitment.

## Introduction

Acute mesenteric ischemia (AMI) is a life-threatening clinical situation in which occlusion of the superior mesenteric artery reduces the blood flow to the intestine. This condition potentially leads to bowel wall necrosis with perforation, followed by peritonitis and multiple organ failure.<sup>1, 2</sup> Necrosis triggers the sequestration of polymorphonuclear neutrophils (PMN) within affected intestinal sections, producing reactive oxygen species (ROS).<sup>3</sup> During mesenteric infarction, the recruitment of leukocytes dictates the extent of the ischemia-reperfusion injury. Prolonged ischemia of the intestine causes tissue damage from reperfusion, mediated by the increased production of ROS due to neutrophil accumulation, leading to increased microvascular permeability.<sup>4</sup>

In AMI, the role of the commensal gut microbiota is largely unexplored. Intestinal ischemia disrupts the intestinal barrier and results in the translocation of gut bacteria and bacterial products, such as lipopolysaccharides (LPS), into the systemic circulation, thereby promoting the development of multiple organ failure.<sup>5</sup> In support of a role of the gut microbiota in intestinal ischemia-reperfusion (I/R) injury, decontamination of gut commensals was shown to protect

from organ failure.<sup>6</sup> Microbial-associated molecular patterns (MAMPs) stimulate pattern-recognition receptors in the host, evoking various (and even opposite) biological responses. Dependent on the host colonization status, muramyl dipeptide signaling engaging pattern recognition through nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is protective against I/R-induced intestinal injury.<sup>7</sup> This indicates that the presence of gut microbiota supports the resilience of intestinal tissues to resist I/R injury. Conversely, it was demonstrated that signaling via the adaptor molecule myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) by the gut microbiota promotes acute intestinal and lung injury, inflammation and endothelial damage.<sup>8</sup>

Even if the role of gut microbiota as a trigger of TLR4 signaling is well-established, its impact in the recruitment of leukocytes and platelets to I/R damaged mesenteric venules and its influence on the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) is unexplored. TLR signaling pathways are induced during small intestinal ischemia,<sup>9</sup> contributing to I/R injury.<sup>10</sup> TLR4 activation results in a complex signaling cascade, involving the recruitment of the Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain containing adaptor proteins (MYD88), TIR-associated protein (TIRAP), MYD88 adaptor like protein (MAL), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) and TRIF-related adaptor molecule (TRAM).<sup>11</sup> Since TRAM interacts with TRIF to phosphorylate tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3), yielding in interferon regulatory factor-3 (IRF3) phosphorylation, whereas TIRAP interacts with MYD88 to phosphorylate interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4), TLR signaling is subdivided into a MYD88-dependent and a MYD88-independent TRIF-mediated pathway.<sup>11</sup> The deficiency of the adaptor proteins MYD88 or TRIF is generally used to investigate the TLR4 receptor downstream signaling pathway.

In mesenteric I/R injury, the endothelial adhesion mechanisms of leukocytes and their extravasation into the tissue, together with platelets deposition, play an important role. During ischemia, the surface exposure of P-selectin by activated microvascular endothelial cells together with the release of von Willebrand factor from endothelial cell Weibel-Palade bodies supports platelet deposition, leukocyte rolling, adhesion, and aggregate formation in the small intestinal microcirculation.<sup>12, 13</sup> Blockade of P-selectin strongly reduced platelet rolling and adhesion in mesenteric I/R injury.<sup>14</sup> Since platelets from P-selectin-deficient mice adhere normally post-ischemia when transfused into WT recipient mice, but adhesion of WT platelets is nearly absent in P-selectin-deficient recipient mice, the platelet-endothelium interactions in the mesenteric I/R mouse model are primarily dependent on the P-selectin expression of the vascular endothelium.<sup>14</sup> Furthermore, the interaction of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with the leukocyte  $\beta$ 2 integrin Mac-1 is a critical determinant in microcirculatory ischemia-reperfusion injury.<sup>15, 16</sup> While the expression of ICAM-1 has been shown to be reduced in the mesenteries of germ-free (GF) mice,<sup>17</sup> it remains elusive if the

colonization status of the host influences leukocyte adhesion during AMI via the interaction of P-selectin on activated endothelial cells and platelets with its counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), expressed on leukocytes (including neutrophils).

Activated PMNs, together with eosinophils and basophils, are the first line of the innate immune defence, undergoing a specialized form of programmed cell death. Augmented by the interaction with P-selectin of platelets with PSGL-1, 18 neutrophils release granule proteins and chromatin that form extracellular DNA fibres, called neutrophil extracellular traps (NETs), which bind and prevent the dissemination of bacteria.<sup>19, 20</sup> The activation of PMNs with LPS results in chromatin decondensation, followed by energy-dependent NET production.<sup>21, 22</sup> In addition to their recognized role in promoting arterial and venous thrombus formation,<sup>23, 24</sup> the formation of NETs was also observed in the microvascular I/R-injured myocardium and the I/R-injured intestine<sup>25, 26</sup>. While the role of NETs in preventing the dissemination of pathogenic bacteria during sepsis has been well defined, the contribution of the commensal microbiota in NET formation in the mesenteric microvasculature during mesenteric ischemia-reperfusion is entirely unresolved. Under this condition, resident gut microbes leak into the portal circulation and need to be sequestered by activated neutrophils to prevent spreading to the systemic circulation.

As the impact of the gut microbiota on leukocyte adhesion and NETosis in mesenteric I/R injury is unexplored, we here set out to analyse these key leukocyte functions in I/R-injured mesenteric venules of GF mice compared to conventionally-raised (CONV-R) counterparts. To grasp the dynamic nature of vascular microbiota-host interactions, we studied leukocyte adherence and NETosis in gnotobiotic mouse models lacking a gut microbiota by using GF mice or CONV-R mice that were depleted from their commensal microbiota by treatment with broad-spectrum antibiotics (Abx). To pinpoint the involvement of TLR4, we studied mouse models deficient in critical elements of this signaling pathway. Furthermore, to figure out if the revealed changes in LPS-induced NETosis are an inherent trait of GF neutrophils, we explored the cell-intrinsic reactivity of neutrophils from GF mice in cell culture assays with isolated bone marrow neutrophils.

## Materials and Methods

Animals. TLR4<sup>-/-</sup> <sup>27</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> <sup>28</sup>, Trif<sup>-/-</sup> <sup>29</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> x Trif<sup>-/-</sup>, Altered Schaedler Flora colonized (ASF) mice housed in flexible-film isolators<sup>30</sup>, and TLR4<sup>fl/fl</sup> x VE-Cdh-Cre<sup>+</sup>, TLR4<sup>wt/wt</sup> x VE-Cdh-Cre<sup>+</sup> <sup>31</sup> mice on a C57BL6 background were used for the experiments.

Further C57BL/6N and Swiss Webster mice were used as control experiments. C57BL/6J, C57BL/6N and Swiss Webster mice were maintained as a GF mouse colony in sterile flexible film mouse isolator systems. The germ-free status of mice was verified every second week by PCR for detection of 16S rDNA and by bacterial culture testing. Conventionally raised (CONV-R) SPF C57BL/6J, C57BL/6N and Swiss Webster mice originate from the same colonies. Conventionally derived mice (CONV-D) were born GF and recolonized with a normal gut microbiota at an age of 5-12 weeks; offsprings of these mice at weaning were used as indicated. All the compared groups were fed the same chow diet and were co-housed, multiple litters were represented in each group. Cecal microbiota donor mice were randomized. Cecal content was solved in 3 mL PBS and 200  $\mu$ L were administered by oral gavage in each conventionalization experiment. C57BL/6J GF mice were monocolonized with *Escherichia coli* strain JP 313 (provided by Evelyne Turlin, Institute Pasteur, Paris, France)<sup>32</sup> and *Bacillus subtilis* PY79, a prototrophic variant engineered from wild type 168 strain<sup>33, 34</sup> (provided by Prof. Ezio Ricca, University of Naples, Naples, Italy) in germ-free flexible film isolators. At OD<sub>600nm</sub> = 0.6, a 200  $\mu$ L-aliquot of the *E. coli* suspension was administered to each mouse by oral gavage. For mono-colonization with *B. subtilis*, a suspension of 1.33x10<sup>8</sup> *B. subtilis* spores in 200  $\mu$ L sterile PBS was administered to each mouse by oral gavage. Mice were analyzed following 14 days of colonization. C57BL/6J mice were colonized with the minimal microbial consortium altered Schaedler flora (ASF), were kept for several generations in sterile isolators and analysed at an age of 6-8 weeks. All experimental animals were 5-12 weeks old male or female mice housed in the Translational Animal Research Center (TARC) of the University Medical Center Mainz under specific pathogen-free (SPF) or GF conditions in EU type II cages with 2-5 cage companions with standard autoclaved lab diet and water ad libitum, 22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C room temperature and a 12 h light/dark cycle. All groups of mice were sex, age-matched and were free of clinical symptoms. All procedures on mice were approved by the local committee on legislation of animals (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz, Germany; G11-1-025, G13-1-035, G13-1-072, and G16-1-013).

Administration of broad-spectrum antibiotics (Abx) and LPS. For depletion of gut microbes, C57BL/6J CONV-R mice were treated with broad-spectrum antibiotics (1 g/L ampicillin, Carl Roth, Germany; 1 g/L neomycin, Sigma-Aldrich, USA; 0,5 g/L vancomycin, Hikma, UK; and 1 g/L metronidazole, Sigma-Aldrich, USA) for 14 days via the drinking water according to an established protocol.<sup>35, 36</sup> To evaluate the role of metabolic endotoxemia<sup>37</sup> on neutrophil reactivity and NET formation, germ-free C57BL/6J mice were treated for one week with lipopolysaccharide (100  $\mu$ g/mL, LPS-EB Ultrapure, *E. coli* 0111:B4, InvivoGen, USA) via the drinking water. Treated mice were daily monitored.

Mouse LPS ELISA kit. EDTA-anticoagulated whole blood was collected by intracardial puncture and the assay was performed according to manufacturer's instructions (Mouse Lipopolysaccharides (LPS) ELISA kit, Cusabio, USA).

Isolation of mouse bone marrow neutrophils. Previously described protocols were applied and modified.<sup>38, 39</sup> Mice were sacrificed by cervical dislocation and the skin was removed from the legs. The remaining muscles and the end of the femur and tibia were cut. The bone marrow was flushed through a 70 µm cell strainer with HBSS wash buffer (HBSS supplemented with 25 mM Hepes and 10% FCS) and the collected bone marrow suspension was centrifuged at 300xg for 10 min. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in HBSS and Hepes. For isolating the neutrophils, the suspension was overlaid on a Histopaque gradient (4 mL Histopaque 1119 under 4 mL Histopaque 1077) and centrifuged for 30 min at 700xg without brake. The isolated neutrophils were carefully collected at the interface of the Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA) and Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, USA) layers. The neutrophils were washed with 20 mL washing buffer and centrifuged for 10 min at 300xg. 10 mL of the wash buffer was removed and 10 mL of fresh wash buffer was added to the cells and resuspended, following centrifugation at 300xg for 10 min. For the last washing step, the whole buffer was removed and the cells were washed with 20 mL wash buffer and centrifuged for 10 min at 300xg. Washed neutrophils were resuspended in RPMI 1640 medium (without phenol red, ThermoFisher scientific, USA) and counted.

Neutrophil activation by LPS. Isolated neutrophils were seeded to a black 96-well plate at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well and stimulated with 10 ng/mL LPS (LPS-EB Ultrapure, E.coli 0111:B4, InvivoGen, USA). The plate was placed in a humidified incubator at 37 °C with CO<sub>2</sub> (5%) for 5h.

Quantification of NETs by fluorescence microplate reader. Stimulated neutrophils were stained with 50 µL of 5 µM of the cell impermeable dye SYTOX orange (ThermoFisher Scientific, USA) and incubated in the dark for 10 min. Afterwards the cells were centrifuged at 200xg for 10 min and washed with 50 µL RPMI 1640 medium (without phenol red, ThermoFisher scientific, USA) and centrifuged at 200xg for 2 min. Quantification of NETs was performed with the SpectraMax i3x microplate-reader (Molecular Devices, UK). The NET-specificity of the detected signal was determined by incubation with DNase I (50 U/mL, Qiagen, Germany).

Immunofluorescence of in vitro LPS stimulated neutrophils. Isolated neutrophils were seeded to glass chamber slides at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well and stimulated with 10 ng/mL LPS (LPS-EB Ultrapure, E.coli 0111:B4, InvivoGen, USA). The chamber slides were placed in a humidified incubator at 37 °C with CO<sub>2</sub> (5%) for 5h. After the incubation, the slides were washed with PBS. For permeabilized cells, 0,1 % Triton-X100 (Carl Roth, Germany) was added to the sample and incubated for 10 min. Cells were washed with PBS and blocked for 2h with 10% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Primary Antibody was added to the cells and incubated overnight. Cells were washed with PBS and incubated with secondary antibody for 2h in the dark. Chamber slides were washed with PBS and incubated for 10 min. with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, USA). Cells were washed again with PBS. The stained NETs were analyzed with the fluorescence microscope Axio Observer (10x magnification, Zeiss, Germany). Antibodies used for immunofluorescence analysis are shown in the Major Resources Tables in the online-only Data Supplement.

MACS neutrophil isolation kit. Briefly, mice were sacrificed and the legs were removed. The remaining muscles and the end of the femur and tibia were cut. The bone marrow was flushed through a 70 µm cell strainer with 10 mL PBS. Mouse neutrophils were isolated according to the manufacturer's protocol (Neutrophil isolation kit (mouse), Miltenyi Biotec, Germany).

Red blood cell lysis. EDTA-anticoagulated whole blood was collected by intracardial puncture. Cell lysis was performed according to the manufacturer's protocol (1xRBC lysis buffer, Invitrogen, USA).

Flow cytometric analysis of neutrophil and monocyte surface proteins. Studies were conducted using a BD FACSCanto II flow cytometer with BD FACSDiva software (BD Bioscience, Germany) and FlowJo-Software (Tree Star Inc., USA). 50 µL of EDTA-anti-coagulated whole blood was incubated for 30 min (room temperature; RT) with 200 µL PBS pH 7.4 and 250 µL 0.4% (v/v) formaldehyde. Fixation was stopped by adding 1 mL PBS pH 7.4 and samples were centrifuged for 5 min at 800xg (RT). Supernatant was discarded up to 100 µL. FACS antibodies were added to the samples, briefly vortexed and incubated for 45-60 min at RT on a shaker. Red blood cells were lysed by adding 2 mL lysing-solution IO-test (Beckman Coulter, USA) and incubated for 10 min (RT) without shaking. Lysing step was stopped by adding 2 mL of PBS pH 7.4 and centrifuged for 10 min at 800xg (RT). The supernatant was discarded and

250  $\mu$ L PBS was added to the tubes and measured. Antibodies used for FACS analysis are shown in the Major Resources Tables in the online-only Data Supplement.

Isolated bone marrow neutrophils and lysed blood samples were incubated with TruStain FcX (1:50, anti-mouse CD16/32, BioLegend, USA) for 20 min on ice. 100  $\mu$ L of the blocked bone marrow or blood solution (collected by heart puncture) was added in each well of a 96-well plate and centrifuged for 2 min at 2000 rpm (4° C). The supernatant was discarded and FACS antibodies were added and incubated for 20 min in the dark (4° C). 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:10000, Sigma-Aldrich, USA) was added shortly before the incubation time ends. The plate was centrifuged at 2000 rpm (4° C) for 2 min and washed with 100  $\mu$ L PBS. 200  $\mu$ L of the final stained cell solution was added in tubes and measured. Antibodies used for FACS analysis are shown in the Major Resources Tables in the online-only Data Supplement.

Western Blot. Western blot was performed to determine levels of total IRF-3 protein and levels of IRF-3 phosphorylated at Ser386. Bone marrow-derived neutrophils were isolated and lysed in RIPA lysis buffer (Merck, Germany) in the presence of Pierce protease inhibitor mini tablets (ThermoFisher Scientific, USA). Soluble proteins were fractionated on 8 % SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF, Invitrogen, CA, USA) membranes. Antibodies used for Western blot analysis are shown in the Major Resources Tables in the online-only Data Supplement. Membranes were developed by adding ECL (1:1 mix of two solutions, BioRad, USA). Detection of the chemiluminescence signal was performed with Fusion FX7 western blot detection device (Vilber, France).

Preparation of platelets, leukocytes and NET visualization by intravital epifluorescence microscopy. Citrate-anticoagulated whole blood was collected by intracardial puncture on anaesthetized mice. Platelet count was determined by using an automatic cell counter (KX-21, Sysmex, Germany). Platelets were isolated and labeled with Rhodamin B (20  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich, USA).<sup>40</sup> The labeled platelet suspension was adjusted to a final concentration of  $150 \times 10^3$  platelets/ $\mu$ L and 250  $\mu$ L suspension was injected i.v. via a jugular vein catheter. To characterize platelet leukocyte interactions in vivo, acridine orange (50  $\mu$ g/ $\mu$ L, 50  $\mu$ L per mouse, Sigma-Aldrich, USA) stained leukocytes and ex vivo rhodamine B labeled platelets were imaged simultaneously. In vivo neutrophil extracellular traps (NETs) were stained with SYTOX orange (5  $\mu$ M, 50  $\mu$ L per mouse, Thermo Fisher Scientific, USA).<sup>41</sup> NETs and leukocytes were imaged at once.

Mesenteric ischemia-reperfusion injury model. Mice were anesthetized by i.p. injection of a solution of midazolame (5 mg/kg, Hameln pharma plus, Germany), medetomidine (0.5 mg/kg, Zoetis, USA) and fentanyl (0.5 mg/kg, Janssen-Cilag GmbH, Germany). Briefly, a polyethylene catheter (0.28mm ID, 0.61mm OD, Smiths Medical Deutschland GmbH, Germany) was implanted into the jugular vein. The abdomen was entered via a midline laparotomy incision. The superior mesenteric artery was identified and occluded with a small vascular clamp. After an ischemic interval of 60 minutes, reperfusion was allowed. Before and immediately after ischemia-reperfusion the entire small intestine was carefully taken out of the abdomen. Platelets, leukocytes and NETs were visualized in situ by in vivo epifluorescence high-speed video microscopy in the mesenterial venules. At the end of the experiments, all animals were sacrificed by cervical dislocation. All procedures performed on mice were approved by the local committee on legislation on protection of animals (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz, Germany; G13-1-072 and G16-1-013).

Intravital high-speed video epifluorescence microscopy. Measurements were performed with a high-speed wide-field Olympus BX51WI fluorescence microscope using a long-distance condenser and a 10x (NA 0.3) water immersion objective with a monochromator (MT 20E, Olympus Deutschland GmbH, Germany) and a charge-coupled device camera (ORCA-R2, Hamamatsu Photonics, Japan). For image acquisition and analysis, the Real-time Imaging System eXcellence RT (Olympus Deutschland GmbH, Germany) and cellSens (Olympus Deutschland GmbH, Germany) softwares were used. Cell recruitment was quantified in one field view of 0.06 mm<sup>2</sup>. Adherent leukocytes and adherent platelets were defined as cells that did not move or detach from the endothelial lining within an observation period of 20 seconds. Rolling leukocytes were defined as cells that at least should once shortly attach the endothelium within the 30 seconds of recording time. Leukocyte conjugates were defined as an association of at least two leukocytes, while platelet-leukocyte conjugates were defined as an association of at least one leukocyte and one platelet. Neutrophil extracellular traps were defined as an extracellular structure, which is labelled with Acridine orange and/or SYTOX orange (a cell impermeable nucleic acid stain).

Statistical analysis. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M and analyzed with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, US). The D'Agostino-Pearson omnibus K2 test was performed to determine the normality of the data, and the F test was used to determine the Equality of Variances. The independent samples Student's t-test was applied for comparison of two groups. If data were not normally distributed, the nonparametric Mann-Whitney test was used.

## Results

### Germ-free mice show reduced leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion-injured mesenteric venules

During acute mesenteric infarction, leukocytes and platelets adhere to the activated endothelium, causing ischemia-reperfusion injury. While the response of leukocytes to pathogenic determinants during microbial invasion is well-recognized, the possible role of the gut-resident microbiota in mesenteric ischemia-reperfusion injury is unresolved. To investigate if the adherence of leukocytes and platelets in acute mesenteric infarction is influenced by the host colonization status, we compared conventionally raised (CONV-R) specific pathogen-free (SPF) mice, that were colonized from birth from environmental microbes, to germ-free (GF) mice, which lack colonization with a gut microbiota (Figure 1A). After the induction of an I/R injury in the mesentery by ceasing the blood supply of the superior mesenteric artery for 60 minutes,<sup>14</sup> leukocyte adhesion, leukocyte rolling, and leukocyte conjugate formation were increased in the mesenteric venules of CONV-R mice compared to their GF counterparts (Figure 1B-E). Furthermore, increased platelet deposition to the I/R-injured mesenteric endothelium of CONV-R mice relative to GF mice was observed (Figure 1F). Interestingly, post-ischemia, the number of platelet-leukocyte conjugates was significantly increased in the CONV-R group (Figure 1G), demonstrating that the presence of a gut microbiota enhances heterotypic cell interactions in mesenteric I/R injury.

In line with previous work, demonstrating that elevated LPS plasma levels in colonized mice drive metabolic endotoxemia,<sup>37, 42</sup> our results confirmed increased plasma LPS levels in CONV-R mice compared with their GF counterparts prior to I/R injury (Figure 1H). Most likely, LPS in the plasma of GF mice is diet-derived. As the functional inhibition of pro-adhesive P-selectin function accounts for microvascular leukocyte accumulation and platelet-leukocyte interaction in this model,<sup>14</sup> the reduction in leukocyte adhesion to the mesenteric microcirculation and the impaired formation of platelet-leukocyte conjugates can be explained by reduced constitutive surface expression of PSGL-1 on neutrophils and monocytes in the blood of GF mice (Figure 1I). Thus, our results indicate that the presence of the gut microbiota is a decisive factor for the severity of mesenteric ischemia-reperfusion injury as evaluated by leukocyte tethering.

Leukocyte adhesion in I/R-injured mesenteric venules dynamically adapts dependent on host colonization status

To experimentally test if microbiota-dependent leukocyte adhesion dynamically adapts to the presence or absence of gut commensals, we again took advantage of the GF mouse model. First, we analyzed whether the identified I/R-induced increase in leukocyte accumulation in CONV-R mice is re-established by colonization of GF mice with a cecal gut microbiota of a CONV-R donor mouse. Ex-GF mice, colonized for 14 days with a cecal microbiota are termed conventional-derived mice (CONV-D)<sup>43</sup> (Figure 2A). In support of a pro-adhesive role of gut microbial colonization in mesenteric I/R injury (Figure 1A, B), the mean numbers of adhering leukocytes were also increased post-ischemia in CONV-D mice compared to GF controls (Figure 2A). In sharp contrast, antibiotic depletion of the gut microbiota by a 14 day administration protocol (Abx; cocktail of ampicillin, neomycin, vancomycin and metronidazole) on CONV-R mice efficiently prevented I/R-induced tethering of leukocytes (Figure 2B), demonstrating that this microbiota-dependent vascular phenotype is highly dynamic and fully reversible.

To pinpoint if monocolonization with an individual gut-resident bacterium is sufficient to evoke increased leukocyte adherence in mesenteric I/R-injury, we performed monocolonization experiments with the gram-negative gut microbe *Escherichia coli* JP313 (Figure 2C). At the end of the 14 day monocolonization experiment, the mice had a fecal colonization density of  $2.68 \times 10^6$  (colony forming units) CFU/mg. Interestingly, in this gnotobiotic approach, monocolonization with *E. coli* JP313 increased leukocyte adhesion to I/R-injured mesenteric venules pre- and post-ischemia (Figure 2C). In conclusion, both colonization with a gut microbiota, but also monocolonization with *E. coli* JP313 enhanced the extent of leukocyte adherence to I/R-injured mesenteric venules, whereas antibiotic depletion of the microbiota reversed this phenotype.

The presence of gut commensals restricts in vivo NETosis

In acute mesenteric infarction, a proportion of the adherent activated neutrophils forms NETs<sup>19,20</sup>, contributing to inflammatory conditions of the splanchnic circulation and aggravating the outcome.<sup>26</sup> To quantify the extent of NETosis in gnotobiotic mouse models by fluorescence intravital microscopy in vivo,<sup>41</sup> we counted the SYTOX orange positive adhering neutrophils in the mesenteric venules prior to and after I/R injury. As expected, pre-ischemia, the number of NETing leukocytes was modest (Figure 3A). Strikingly, post-ischemia NETosis was vastly enhanced and GF mice showed 2-fold increased NET-formation in I/R-injured mesenteric venules compared with CONV-R counterparts (Figure 3A). Thus, our

experiments demonstrate a strong increase in I/R-induced in vivo NETosis in GF mice compared to CONV-R mice.

To address whether the impact of gut commensals on mesenteric I/R injury-induced NETosis is a dynamic process, we colonized GF mice with a complex cecal gut microbiota from a CONV-R donor mouse over a 14 day period (conventionalization, CONV-D) and then applied the mesenteric I/R injury model. In line, the conventionalized ex-GF mice showed strongly reduced numbers of NETing neutrophils at 1 hour of I/R injury compared to the GF group, demonstrating that the microbiota dynamically regulates NETosis (Figure 3B). In contrast, depletion of commensals by antibiotic treatment significantly increased the number of NETing neutrophils in the mesenteric I/R injury model (Figure 3C). Collectively, our experiments pinpoint the gut microbiota as an environmental factor that dynamically suppresses NETosis in I/R injured mesenteric venules.

Next, we tested whether monocolonization with the Gram-negative enterobacterium *E. coli* JP313 is sufficient to reduce the extent of NETosis in the mesenteric I/R injury model. While the numbers of NETing leukocytes were comparable pre-ischemia, in the post-ischemic state, our gnotobiotic monocolonization experiments with *E. coli* JP313 showed a clear trend towards suppressed in vivo NETosis in the I/R injury model (Figure 3D). Furthermore, we monocolonized with the Gram-positive gut bacterium *Bacillus subtilis* PY7933, 34, reaching a final colonization density of  $4.36 \times 10^6$  CFU/mg feces, which likewise resulted in elevated leukocyte tethering and strongly reduced NETosis in I/R-injured mesenteric venules (Figure S1A, B). In addition, post-ischemic NETosis in mesenteric venules was significantly reduced in altered Schaedler flora (ASF) colonized mice<sup>30</sup> relative to GF controls (Figure S1C). Collectively, our results demonstrate that the colonization-induced suppression of I/R injury-induced NETosis is broadly inducible even by individual gut commensals or minimal microbial consortia.

Suppressed NETosis of colonized mice is due to attenuated neutrophil Toll-like receptor-4 signaling

Since mesenteric infarction typically is accompanied by the loss of intestinal barrier function and hence leukocytes in the intestinal microcirculation face elevated levels of pro-inflammatory patterns,<sup>5, 6</sup> we reasoned that hyperreactive TLR4 signaling in the neutrophils of GF mice could be causal for enhanced NET formation. To pinpoint whether GF neutrophils show hyperreactive LPS-induced NETosis ex vivo, we stimulated isolated bone marrow-derived neutrophils from GF and CONV-R mice (Figure S2A-D) and measured the SYTOX orange signal of plated neutrophils in a fluorimetric assay. Increased LPS-induced NETosis was

consistently observed *ex vivo* in isolated bone marrow neutrophils from GF mice, indicating that TLR4 signaling is hyperreactive at GF housing conditions (Figure 4A). Hyperreactive *ex vivo* NETosis was not strain-specific as we consistently observed this microbiota-regulated neutrophil phenotype in the GF C57BL/6N and the GF Swiss Webster mouse line (Figure S3). The role of chronic LPS exposure (e.g. in CONV-R mice) in attenuating NETosis of isolated bone marrow neutrophils was further corroborated by *in vivo* administration of LPS via the drinking water, which efficiently suppressed LPS-induced *in vitro* NETosis (Figure 4B). Similar to the GF mouse model, the reduction of colonizing gut bacteria by Abx resulted in exaggerated LPS-triggered *ex vivo* NET formation of isolated bone marrow neutrophils, controlled by DNase I digestion of expelled DNA fibers (Figure 4C, D). Indeed, fluorescence activated cell sorting (FACS) analyses on neutrophils in whole blood and on isolated bone marrow neutrophils revealed a subtle but significant increase in TLR4 surface expression on neutrophils from GF mice, suggesting that GF neutrophils may be more reactive in terms of LPS-induced TLR4 signaling (Figure 4E). Furthermore, the IRF3 signaling axis, which is primarily triggered downstream of TRIF adaptor mediated TLR signaling cues<sup>44</sup>, was increased in the bone marrow neutrophils of GF mice (Figure 4F), demonstrating that intestinal microbiota-derived signals profoundly shape reactivity of the neutrophil-intrinsic TLR4 signaling pathway.

To demonstrate *in vivo* that tonic TLR4 stimulation via the enteric route desensitizes neutrophils towards reduced I/R-induced NETosis, we administered *E. coli* LPS to GF mice via the drinking water for 7 days at sterile isolator conditions. As hypothesized, exposure of GF mice to LPS in their drinking water efficiently prevented excessive NETosis in mesenteric I/R injury (Figure 4G). Collectively, our results reveal that disabled neutrophil-intrinsic TLR4/TRIF signaling is linked to diminished LPS-triggered NETosis of the bone marrow neutrophils isolated from colonized mice or GF mice that were challenged with enteric LPS.

#### TLR4/TRIF signaling drives NETosis in mesenteric ischemia-reperfusion injury

As endotoxin challenge is known to augment leukocyte-vessel wall interactions through PSGL-1/P-selectin binding (Figure 11),<sup>45</sup> we next addressed the role of TLR4 signaling in neutrophil adhesion,<sup>10</sup> evoked by I/R injury analyzing various genetic knock-out mouse models. As expected, the adherence of neutrophils was significantly reduced in I/R-injured mesenteric venules of TLR4<sup>-/-</sup> mice. Interestingly, *in vivo* NETosis was dependent on intact TLR4 signaling, as mesenteric I/R injury in TLR4<sup>-/-</sup> mice did not yield in significantly increased numbers of NETs in the post-ischemic state (Figure 5A-C). In line, *in vitro* LPS-stimulated bone marrow neutrophils from TLR4<sup>-/-</sup> mice showed significantly reduced NETosis compared to WT controls (Figure 5D), confirming the direct involvement of TLR4 dependent signaling cues on neutrophils. Mechanistically, I/R-induced *in vivo* NET formation was strongly dependent on

TRIF-mediated signaling (Figure 5E-H), as *Trif*<sup>-/-</sup> mice did not show differences in the number of NETs (Figure 5G, H), whereas *MyD88*<sup>-/-</sup> mice consistently showed increased NETosis in the post-ischemic state (Figure 5E, F). To unambiguously demonstrate the role of TLR downstream signals in I/R-induced NETosis, we generated *MyD88*<sup>-/-</sup>*xTrif*<sup>-/-</sup> double-deficient mice, which also showed reduced leukocyte tethering and diminished NETosis in mesenteric venules in the post-ischemic state (Figure S4). To address if in addition to TLR4 signaling on neutrophils also signals via endothelial TLR4 contribute to neutrophil adhesion and NETosis in I/R-injured mesenteric venules, we generated conditional TLR4-flox *x* VE-Cadherin-Cre mice that are deficient in endothelial TLR4. Our experiments demonstrated that TLR4 signaling on the microvascular endothelium also contributes to the adherence of neutrophils in mesenteric I/R injury (Figure 5I, J), but did not significantly affect in vivo NETosis (Figure 5I, K). In conclusion, our results demonstrate that TLR4/TRIF signaling, both on neutrophils and the vascular endothelium, is critically involved in I/R injury-induced NETosis in the mesenteric microvasculature.

## Discussion

Our experiments on the microbiota's impact on acute mesenteric infarction revealed markedly decreased leukocyte rolling, firm adhesion, homotypic and platelet-heterotypic conjugate formation in I/R-injured mesenteric venules of GF mice compared with CONV-R mice in the post-ischemic state, demonstrating that the colonization status of the host dramatically affects the extent of I/R injury. Reduced conjugate formation was attributed to lower constitutive PSGL-1 surface expression in GF neutrophils and monocytes. By germ-free mouse isolator technology, we demonstrated that increased leukocyte deposition in the mesenteric I/R injury model dynamically adapts to the colonization status of the host. Increased leukocyte adhesion was triggered by 14 day colonization of ex-GF mice with a complex gut microbiota (CONV-D), but also by monocolonization with *Escherichia coli* JP313. Conversely, Abx-decimation of the gut microbiota reverted colonization-dependent leukocyte adherence.

In line with previous work on LPS-induced neutrophil recruitment in the GF mouse model,<sup>46</sup> we observed that the presence of a gut microbiota supports the interaction of leukocytes with the I/R-injured vessel wall, yielding in increased numbers of adherent leukocytes in the post-ischemic state. Coherent with diminished vascular ICAM-1 in the mesentery of GF mice,<sup>17</sup> we detected reduced constitutive PSGL-1 surface expression on blood neutrophils and monocytes of GF mice, which likely accounts for the reduced platelet-leukocyte conjugate formation. Since

it was demonstrated in cell culture that LPS stimulation reduces the surface expression of PSGL-1 on neutrophils and monocytes,<sup>47</sup> the observed reduction of leukocytes in the mesenteric I/R model is most likely due to diminished Mac-1/ICAM-1 interaction.<sup>15</sup> Furthermore, the involvement of diminished Mac-1/ICAM-1 interaction in this process is supported by the reduced expression of ICAM-1 in GF mice, specifically in the mesentery and the gastrointestinal tract, which has been reported by Komatsu and coworkers.<sup>17</sup> However, the microbiota-dependent mechanisms that contribute to I/R-induced endothelial cell activation and the exposure of adhesion receptors await further exploration.

Demonstrating the influence of the host colonization status on a major neutrophil effector function, we found a vast increase in TLR4/TRIF-dependent NET formation as a result of mesenteric I/R injury in GF mice, whereas the I/R-induced increase in NETosis in CONV-R mice was far less pronounced. Therefore, we hypothesized that tonic exposure of neutrophils to microbiota-derived LPS (e.g. as in CONV-R mice) dampens TLR4 expression in neutrophils and NET-formation. Accordingly, increased I/R-induced NETosis could also be triggered by the depletion of the gut microbiota through Abx-treatment, demonstrating that the reactivity of neutrophils to undergo I/R-induced NETosis is dynamically regulated. By ex vivo cell culture experiments, we showed that bone marrow-derived neutrophils of GF mice are more prone to LPS-induced NETosis than their CONV-R counterparts and this was also found in the Abx-microbiota depletion model, which is in line with increased TLR4 surface expression detected on GF neutrophils.

Endotoxin tolerance is a well-characterized feature of neutrophils, which develops upon prolonged LPS exposure and is characterized by the loss of TLR4 expression.<sup>48</sup> In line, we confirmed reduced TLR4 surface expression and identified diminished IRF3 phosphorylation in bone marrow neutrophils of CONV-R mice relative to their GF counterparts, which explains their reduced capacity of LPS-induced NET formation. Our LPS-induced neutrophil assays identified the TLR4/TRIF signaling axis as a major pathway influenced by the presence of a gut microbiota to protect against NET-mediated mesenteric I/R injury. The role of TLR4 in I/R-induced NETosis was also evident in mice that specifically lack TLR4 expression on the vascular endothelium, indicating that in addition to the direct signaling-dependent effects on neutrophils, TLR4 signaling in endothelial cells is also contributing to microvascular NETosis. However, our results do not rule out the participation of other pattern recognition receptors, such as nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein-2 (NOD2) signaling.<sup>7</sup> Clearly, these microbiota-dependent mechanisms need to be tightly balanced to prevent neutrophil hyperreactivity when encountering microbial challenges, but they have to educate sufficient immunovigilance to ensure host fitness.

Of note, our finding of an increased NETing of neutrophils in GF mice is consistent with a previous study on GF pigs, demonstrating that gut luminal endotoxin (exposure?) reduces I/R injury of the gut wall.<sup>49</sup> In the mesenteric I/R injury mouse model *in vivo* and in isolated *in vitro* bone marrow-derived neutrophils *ex vivo*, we clearly showed that the exposure of the host to a gut microbiota determines the extent of NETing neutrophils when stimulated with LPS.<sup>50</sup> This finding is in accordance with a previous study, reporting a reduction in superoxide production of blood neutrophils from LPS pre-treated rats that were subjected to an I/R injury model.<sup>51</sup> Indeed, NETosis has recently been shown as a cause of I/R injury in a neonatal rat model of midgut volvulus.<sup>26</sup> In conclusion, the observed decrease of leukocyte adhesion, but increase of NETing neutrophils in the GF mouse model and in Abx-treated mice clearly demonstrates the pivotal role of the gut microbiota as an environmental pre-conditioning factor, contributing to the resilience to NETosis mediated I/R injury in acute mesenteric infarction.

#### Acknowledgments

The authors state that no conflict of interests exists. We are grateful to Cornelia Karwot and Klaus-Peter Derreth for expert technical assistance. We thank Markus Radsak (III. Medical Clinics, University Medical Center Mainz) and Philip Wenzel (Center for Thrombosis and Hemostasis, University Medical Center Mainz) for their support with the TLR4<sup>-/-</sup>, Trif<sup>-/-</sup>, and MyD88<sup>-/-</sup> mouse lines. We are grateful to Evelyn Turlin (Institut Pasteur, Paris, France) for providing *E. coli* JP313 and to Ezio Ricca, (University of Naples, Naples, Italy) and Vincenzo de Filippis (University of Padua, Padua, Italy) for providing *Bacillus subtilis* PY79.

#### Sources of Funding

The project was funded by an intramural MAIFOR grant to K.J.L. and C.R., grant support from the Inneruniversitäre Forschungsförderung (Stufe 1) to J.M.K and C.R., the CTH Junior Group Translational Research in Thrombosis and Hemostasis (BMBF 01EO1003 and 01EO1503), DFG Individual Grants (RE 3450/3-1, RE 3450/5-1, RE 3450/5-2 BO 3482/3-3, BO 3482/4-1), the National Institutes of Health (1R01HL141513, 1R01HL139641 to M.B.), and a project grant from the Boehringer Ingelheim Foundation to C.R.. C.R. is a member of Young DZHK. The authors are responsible for the content of this publication.

#### Disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

#### Author contributions

S.A. and E.W. performed experiments, analyzed data and contributed to manuscript writing. G.P., A.G., H.F., F.M.-G., M.S., I.B., K.G., and K.K. performed experiments and analyzed data. J.M.K. commented on the manuscript. K.J.L. and K.J. designed experiments and commented on the manuscript. C.R. designed experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

#### References

1. Walker TG. Mesenteric ischemia. *Semin Intervent Radiol.* 2009; 26:175-183.
2. Harward TR., Brooks DL, Flynn TC, et al. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. *J Vasc Surg.* 1993; 18:459-467.
3. Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 2002; 9:99-109.
4. Schoenberg MH, Berger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993; 21:1376-1386.
5. Cicalese L, Billiar TR, Rao AS, et al. Interaction between ischemia/reperfusion-induced leukocyte emigration and translocating bacterial enterotoxins on enteric muscle function. *Transplant Proc.* 1997; 29:1815.
6. Sorkine P, Szold O, Halpern P, et al. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest.* 1997; 112:491-495.
7. Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Jobin C. The microbiota protects against ischemia/reperfusion-induced intestinal injury through nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) signaling. *Am J Pathol.* 2014; 184:2965-2975
8. Victoni T, Coelho FR, Soares AL, et al. Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway. *Med Microbiol Immunol.* 2010; 199:35-42.
9. Watson MJ, Ke B, Shen XD, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury triggers activation of innate toll-like receptor 4 and adaptive chemokine programs. *Transplant Protoc.* 2008; 40:3339-3341.

10. Wang J, He GZ, Wang YK, et al. TLR4-HMGB1-, MyD88- and TRIF-dependent signaling in mouse ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2015; 21:8314-8325.
11. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:353-364.
12. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest* 1996; 97:493-500.
13. Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, et al. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res.* 1997; 81:922-931.
14. Massberg S, Enders G, Leiderer R, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia-reperfusion: the role of P-selectin. *Blood.* 1998; 92:507-515.
15. Nolte D, Hecht R, Schmid P, et al. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am J Physiol.* 1994; 267:H1320-H1328.
16. Massberg S, Enders G, Matos FC, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood.* 1999; 94:3829-3838.
17. Komatsu S, Berg RD, Russell JM, et al. Enteric microflora contribute to constitutive ICAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol.* 2000; 279:G186-G191.
18. Etulain J, Martinod K, Wong SL, et al. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood.* 2015; 126:242-6.
19. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303:1532-1535.
20. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010; 16:887-896.
21. Bosmann M, Ward PA. Protein-based therapies for acute lung injury: targeting neutrophil extracellular traps. *Expert Opin Ther Targets.* 2014; 18:703-714.
22. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: The biology of chromatin externalization. *Dev Cell.* 2018; 44:542-553.

23. Franck G, Mawson TL, Folco EJ, et al. Roles of PAD4 and NETosis in experimental atherosclerosis and arterial injury: implications for superficial erosion. *Circ Res.* 2018; 123:33-42.
24. Stark K, Philippi V, Stockhausen S, et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood.* 2016; 128:2435-2449.
25. Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, et al. VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood.* 2014; 123:141-148.
26. Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, et al. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Sci Rep.* 2017; 7:15377.
27. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999; 162:3749-52.
28. Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-8-mediated function. *Immunity.* 1998; 9:143-50.
29. Hoebe K, Du X, Georgel P, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 2003; 424:743-8.
30. Dewhirst FE, Chien CC, Paster BJ, et al. Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl Environ Microbiol.* 1999, 65:3287-92.
31. Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, et al. Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat Commun.* 2016; 7:11703.
32. Hörmann N, Brandão I, Jäckel S, et al. Gut microbial colonization orchestrates TLR2 expression, signaling and epithelial proliferation in the small intestinal mucosa. *PLoS One.* 2014; 9:e113080.
33. Schroeder JW and Simmons LA. Complete Genome Sequence of *Bacillus subtilis* strain PY79. *Genome Announc.* 2013, 1:e01085-13.
34. Youngman P, Perkins JB and Losick R. A novel method for the rapid cloning in *Escherichia coli* of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn917 insertions. *Mol Gen Genet.* 1984; 195:424-433.

35. Chen LW, Chang WJ, Chen PH, et al. Commensal microflora induce host defense and decrease bacterial translocation in burn mice through toll-like receptor 4. *J Biomed Sci.* 2010, 17:48.
36. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004, 118, 229-241.
37. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008; 57:1470-1481.
38. Saffarzadeh M, Cabrera-Fuentes HA, Veit F. et al. Characterization of rapid neutrophil extracellular trap formation and its cooperation with phagocytosis in human neutrophils. *Discoveries.* 2014, 2:e19.
39. Luo Y and Dorf ME. Isolation of mouse neutrophils. *Curr Protoc Immunol.* 1997, 22, 3.20.1-3.20.6.
40. Kanaji T, Russell S and Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood.* 2002, 100, 2102-7.
41. Tanaka K, Koike Y, Shimura T. et al. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One.* 2014, 9:e111888.
42. Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lundén GÖ, Cani PD, Bäckhed F. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut.* 2012; 61:1701-7.
43. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Östergren-Lundén G, Petersen LC, Ruf W, Bäckhed F. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature* 2012; 483:627-631.
44. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7:12-9.
45. Slotta JE, Braun OO, Menger MD, Thorlacius H. Capture of platelets to the endothelium of the femoral vein is mediated by CD62P and CD162. *Platelets.* 2009; 20:505-12.
46. Fagundes CT, Souza DG, Nicoli JR, Teixeira MM. Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. *Microbes Infect.* 2011; 13:1121-32.

47. Marsik C, Mayr F, Cardona F, Schaller G, Wagner OF, Jilma B. Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans. *J Clin Immunol.* 2004; 24:62-65.f
48. Parker LC, Jones EC, Prince LR, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. Endotoxin tolerance induces selective alterations in neutrophil function. *J Leukoc Biol* 2005; 78:1301-5.
49. van der Hoven B, Nabuurs M, van Leengoed LA, Groeneveld AB, Thijs LG. Gut luminal endotoxin reduces ischemia-reperfusion injury of the small gut in germ-free pigs. *Shock.* 2001; 16:28-32.
50. Gathiram P, Wells MT, Brock-Utne JG, Wessels BC, Gaffin SL. Oral administered nonabsorbable antibiotics prevent endotoxemia in primates following intestinal ischemia. *J Surg Res.* 1988; 45:187-93.
51. Koike K, Moore FA, Moore EE, Trew CE, Banerjee A, Peterson VM. Endotoxin pretreatment inhibits neutrophil proliferation and function. *J Surg Res.* 1994; 57:49-54.

#### Highlights

- The gut microbiota suppresses NETosis in mesenteric ischemia-reperfusion injury in vivo.
- Isolated bone marrow-derived neutrophils from germ-free mice and broad-spectrum antibiotic-treated mice show hyperreactive LPS-induced NETosis.
- Enteric LPS administration and colonization with individual gut microbes or altered Schaedler flora suppresses hyperreactive NETosis of LPS-stimulated bone marrow neutrophils and in mesenteric ischemia-reperfusion injured venules.
- Tonic stimulation of the cell-intrinsic TLR4/TRIF signaling pathway by gut commensals attenuates LPS-induced NETosis.

#### Figure Legends

Figure 1. Germ-free mice show reduced leukocyte adhesion to ischemia-reperfusion injured mesenteric venules. (A) Germ-free (GF) and conventionally raised (CONV-R) mouse model (schematic representation). (B) Intravital imaging of mesenteric venules of GF and CONV-R mice pre- and post-ischemia; scale bar: 100  $\mu$ m; representative images; white frame: acridine orange-stained adherent leukocytes. (C) Number of adhering leukocytes pre-ischemia and one hour post-ischemia in GF and CONV-R mice (10 vs 9 mice/group). (D) Number of rolling leukocytes pre-ischemia and one hour post-ischemia in GF and CONV-R mice (10 vs 8 mice/group). (E) Number of leukocyte conjugates pre-ischemia and one hour post-ischemia in GF vs CONV-R mice (10 vs 9 mice/group). (F) Number of adhering platelets pre-ischemia and one hour post-ischemia in GF and CONV-R mice (10 vs 9 mice/group). (G) Number of platelet-leukocyte conjugates pre-ischemia and one hour post-ischemia in GF and CONV-R (9 vs 8 mice/group). (H) Plasma LPS levels in GF vs CONV-R mice (6 vs 10 mice). (I) FACS analysis on PSGL-1 (CD162) surface expression on monocytes (green) and neutrophils (blue) in whole blood of GF and CONV-R mice (8 vs 8 mice/group). Results are shown as means  $\pm$  s.e.m. Scale bar: 100  $\mu$ m. Statistical analyses were performed using the independent samples Student's t-test (\*) or the Mann-Whitney test (#), \*/#p<0.05, \*\*/##p<0.01.

Figure 2. Colonization with a gut microbiota or monocolonization with *Escherichia coli* augments leukocyte adhesion to the ischemia-reperfusion injured endothelium of mesenteric venules. (A) Number of adhering leukocytes pre-ischemia and one hour post-ischemia in germ-free (GF) and conventional-derived (CONV-D) mice (5 vs 4 mice/group); adhering leukocytes were stained with acridine orange. (B) Number of adhering leukocytes pre-ischemia and post-ischemia in conventionally raised (CONV-R) controls and CONV-R mice treated for 14 days with an antibiotic cocktail (Abx) via the drinking water (13 vs 9 mice/group); adhering leukocytes were stained with acridine orange. (C) Number of adhering leukocytes pre-ischemia and post-ischemia in GF mice and GF mice monocolonized for 14 days with *E. coli* JP313 (5 vs 5 mice/group); leukocytes were stained with acridine orange. Results are shown as means  $\pm$  s.e.m. Scale bar: 50  $\mu$ m or 100  $\mu$ m. Statistical analyses were performed using the independent samples Student's t-test (\*) or the Mann-Whitney test (#), \*/#p<0.05, \*\*/##p<0.01, \*\*\*/###p<0.001.

Figure 3. The presence of gut commensals restricts the formation of neutrophil extracellular traps (NETosis) in ischemia-reperfusion injured mesenteric venules. (A) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in GF and CONV-R mice (6 vs 13 mice/group). (B) NETosis in

mesenteric venules pre- and post-ischemia in GF and CONV-D mice (5 vs 4 mice/group). (C) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in CONV-R and Abx-treated CONV-R mice (13 vs 9 mice/group). (D) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in GF and GF mice monocolonized with E.coli JP 313 (5 vs 5 mice/group). Adhering leukocytes were stained with acridine orange; NETs were visualized by SYTOX orange. Results are shown as means  $\pm$  s.e.m. Scale bar: 50  $\mu$ m or 100  $\mu$ m as indicated in the photomicrograph. Statistical comparison were performed using the independent samples Student's t-test (\*) or the Mann-Whitney test (#), \*/#p<0.05, \*\*/##p<0.01.

Figure 4. Hyperreactive TLR4 signaling promotes enhanced NETosis in the germ-free mouse model. (A) Representative fluorescence micrographs of LPS-induced in vitro NET formation; nuclear staining (DAPI; blue); NETs (visualized by citrullinated histone H3 antibody staining; red); scale bar: 100  $\mu$ m. LPS-induced in vitro NETosis of cultured bone marrow neutrophils from GF and CONV-R mice (7 vs 7 mice/group). (B) LPS-induced in vitro NETosis of cultured bone marrow neutrophils from GF and LPS-treated GF mice (7 vs 4 mice/group). (C) LPS-induced in vitro NETosis of cultured bone marrow neutrophils from CONV-R and Abx-treated CONV-R mice (12 vs 8 mice/group). (D) LPS-induced in vitro NETosis of cultured bone marrow neutrophils from CONV-R and DNase I-treated CONV-R control mice (9 vs 7 mice/group). (E) FACS analysis on TLR4 (CD284) surface expression on neutrophils in whole blood and bone marrow of GF and CONV-R mice. (F) Western Blot analysis of phosphorylated IRF-3 level to total IRF-3 in isolated bone marrow neutrophils from GF and CONV-R mice; results are normalized to  $\alpha$ -actinin. (G) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in GF and GF mice that were treated for 7 days with LPS (100  $\mu$ g/ml) via the drinking water (5 vs 4 mice/group). Results are shown as means  $\pm$  s.e.m. Scale bar: 100  $\mu$ m. Statistical comparison were performed using the independent samples Student's t-test (\*) or the Mann-Whitney test (#), \*/#p<0.05, \*\*/##p<0.01, \*\*\*/###p<0.001.

Figure 5. The TLR4/TRIF signaling axis is critically involved in mesenteric I/R injury-induced NETosis. (A) Intravital imaging of mesenteric venules of CONV-R WT and CONV-R TLR4-deficient mice pre- and post-ischemia; scale bar: 100  $\mu$ m; adhering leukocytes were stained with acridine orange; NETs were visualized by SYTOX orange. (B) Number of adhering leukocytes one hour post-ischemia in CONV-R WT and CONV-R TLR4-deficient mice (12 vs 12 mice/group); adhering leukocytes were stained with acridine orange. (C) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in CONV-R WT and CONV-R TLR4-deficient mice (13 vs 11 mice/group). (D) LPS-induced in vitro NETosis of cultured bone marrow neutrophils from CONV-R WT and CONV-R TLR4-deficient mice (9 vs 8 mice/group). (E) Intravital imaging

of mesenteric venules of CONV-R MyD88<sup>-/-</sup> mice pre- and post-ischemia; scale bar: 100  $\mu$ m; adhering leukocytes were stained with acridine orange; NETs were visualized by SYTOX orange. (F) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in CONV-R MyD88<sup>-/-</sup> mice (5 mice). (G) Intravital imaging of mesenteric venules of CONV-R Trif<sup>-/-</sup> mice pre- and post-ischemia; scale bar: 100  $\mu$ m; adhering leukocytes were stained with acridine orange; NETs were visualized by SYTOX orange. (H) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in CONV-R Trif<sup>-/-</sup> mice (4 mice). (I) Intravital imaging of mesenteric venules of TLR4-flox x VE-Cadherin-Cre (deficient in endothelial TLR4) mice and their controls pre- and post-ischemia; scale bar: 100  $\mu$ m; adhering leukocytes were stained with acridine orange; NETs were visualized by SYTOX orange. (J) Number of adhering leukocytes pre-ischemia and one hour post-ischemia in TLR4-flox x VE-Cadherin-Cre (deficient in endothelial TLR4) mice and their controls (7 vs 6 mice/group). (K) NETosis in mesenteric venules pre- and post-ischemia in TLR4-flox x VE-Cadherin-Cre (deficient in endothelial TLR4) mice and their controls (7 vs 6 mice/group). Results are shown as means  $\pm$  s.e.m. Scale bar: 100  $\mu$ m. Statistical comparison were performed using the independent samples Student's t-test (\*) or the Mann-Whitney test (#), \*/#p<0.05, \*\*/##p<0.01.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine besondere Dankbarkeit gegenüber ... zum Ausdruck bringen. Ich verdanke ihm nicht nur eine interessante Arbeitsthematik und einen tiefgreifenden Eindruck in das wissenschaftliche Arbeiten. Vielmehr haben die enge Zusammenarbeit und die großartige Unterstützung dazu beigetragen, dass diese Arbeit realisiert werden konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, und hierbei im Besonderen bei ....., für ihre großartige Unterstützung bedanken.

Mein weiterer Dank gilt meinen Freunden, die mich immer wieder zum Weitermachen ermutigt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Tochter bedanken, die immer an mich geglaubt hat.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf

Maria, Lilo Müller

E-Mail

Mobil

Adresse

Geburtsdatum

Familienstand

### Beruflicher Werdegang

Seit 11/2021

Assistenzärztin Anästhesie

Katholisches Klinikum Montabaur-Koblenz

01/2020 – 07/2021

Gesundheits- und Krankenpflegerin

St. Vincenz Krankenhaus Limburg

08/2014 – 03/2016

Gesundheits- und Krankenpflegerin

St. Vincenz Krankenhaus Limburg

10/2012 – 08/2014

Gesundheits- und Krankenpflegerin

St. Vincenz Krankenhaus Limburg

## Ausbildung & Schule

10/2014 – 10/2021	Studium Humanmedizin Johannes Gutenberg Universität Mainz
08/2012 – 08/2014	Abitur Adolf- Reichwein- Schule in Limburg
10/2009 – 10/2012	Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin St. Vincenz Krankenhaus Limburg
08/1999 – 10/2009	Königin-Luise-Gymnasium Erfurt

## Kenntnisse

EDV-Kenntnisse	Microsoft Office
Sprachkenntnisse	Deutsch (Muttersprache), Englisch, Russisch (Grundkenntnisse)
Führerschein	Klasse B

Koblenz, 24.07.2022

Maria Müller