Modulation der angeborenen Immunantwort durch mikrobielle Metaboliten



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Biomedizinischen Wissenschaften (Dr. rer. physiol.)

> der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

> > vorgelegt von Christina Fischer aus Prien am Chiemsee

> > > im Jahr 2021

Modulation der angeborenen Immunantwort durch mikrobielle Metaboliten



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Biomedizinischen Wissenschaften (Dr. rer. physiol.)

> der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

> > vorgelegt von Christina Fischer aus Prien am Chiemsee

> > > im Jahr 2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hehlgans

Tag der mündlichen Prüfung:

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Fischer, Christina, geboren am 02.03.1992 in Prien am Chiemsee, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Christina Fischer

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		
Abkürzungsverzeichnis 12		
1	Ein	leitung 15
1.	.1	Das Mikrobiom
1.	.2	Die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase16
1.	.3	Die Entzündungsreaktion17
1.	.4	Der Toll-like-Rezeptor (TLR)-vermittelte Signalweg
1.	.5	Typ I und Typ III Interferone und der JAK/STAT Signalweg
1.	.6	Antimikrobielle Peptide
1.	.7	Die <i>Regenerating gene</i> (Reg) Familie
1.	.8	Endotoxin- und Kreuztoleranz
1.	.9	Kurzkettige Fettsäuren
1.	.10	Die Rolle von kurzkettigen Fettsäuren in Krankheiten
1.	.11	Signalvermittlung der kurzkettigen Fettsäuren
2	Ma	terial
2.	.1	Geräte
2.	.2	Verbrauchsmaterialien
2.	.3	Chemikalien, Medien und Reagenzien
2.	.4	Puffer und Lösungen
2.	.5	Kits
2.	.6	Enzyme
2.	.7	Oligonukleotide
2.	.8	Plasmide
2.	.9	Antikörper
2.	.10	Zelllinien
2.	.11	Versuchstiere
		7

	2.12 So	ftware und Internet-Ressourcen	
3	Method	len	
-	3.1 Mo	olekularbiologische Methoden	
	3.1.1	Isolation von genomischer DNA aus Geweben	
	3.1.2	Isolation von genomischer DNA aus Kot	
	3.1.3	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen	
	3.1.4	Isolation von Gesamt-RNA aus intestinalen Epithelzellen (IEC)	
	3.1.5	Bestimmung der RNA und DNA Konzentration	
	3.1.6	Affymetrix GeneChip Microarray	
	3.1.7	Reverse Transkription	
	3.1.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	
	3.1.9	Agarosegel-Elektrophorese	
	3.1.10	Quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR)	
	3.1.11	Restriktionsverdau von DNA	
	3.1.12	Isolation von DNA aus Agarosegelen	
	3.1.13	Ligation	
	3.1.14	Transformation	
	3.1.15	Bakterienkultur	
	3.1.16	Präparation von Plasmid-DNA	
	3.1.17	Sequenzierung von Plasmid-DNA	
	3.1.18	Mikrobiom-Analyse mittels Next-Generation-Sequencing	
-	3.2 Pro	oteinbiochemische Methoden	
	3.2.1	Isolation von Proteinextrakten	
	3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	
	3.2.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	
	3.2.4	Western-Blot	
	3.2.5	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
	3.2.6	Luciferase Assay	
			8

	3.2.7	Zellkulturbedingungen47
	3.2.8	Auftauen und Einfrieren von Zellen47
	3.2.9	Bestimmung der Lebendzellzahl
	3.2.1) Stabile Transfektion
	3.2.1	Generierung von humanen peripheral blood-derived macrophages (PBM). 48
	3.2.12	2 Stimulierungen
	3.2	.12.1 Stimulierung mit kurzkettigen Fettsäuren
	3.2	.12.2 Induktion einer Kreuztoleranz <i>in vitro</i>
	3.2	.12.3 Einsatz verschiedener Inhibitoren
	3.2.1	3 Durchflusszytometrie
	3.3	Tierexperimentelle Methoden
	3.3.1	Tierhaltung
	3.3.2	Organentnahmen51
	3.4 I	Histologische Methoden
	3.4.1	Immunhistochemische Färbung51
	3.5 I	nfektion mit VSV basierten Replikon Partikel51
	3.5.1	VSV*∆G(Luc)-Replikon Partikel51
	3.5.2	Infektion mit dem VSV*ΔG(Luc)-Replikon51
	3.6	Statistik
4	Ergeł	onisse
	4.1 0	Charakterisierung der hReg3α transgenen Mauslinie55
	4.1.1	Nachweis der hReg3a Expression auf Proteinebene in Darmepithelzellen von
	hReg	3α transgenen Mäusen
	4.1.2	Veränderte mikrobielle Diversität in hReg3a transgenen Mäusen55
	4.1.3	Erhöhte Expression von Interferon stimulierten Genen (ISG) in primären
	intest	inalen Epithelzellen von hReg3αtg Mäusen57
	4.2 I	nduktion von ISG und deren Auswirkung auf das angeborene Immunsystem 60
	4.2.1	Kurzkettige Fettsäuren induzieren die Ifit-Genexpression in CMT-93 Zellen

	4.2.2	Kurzkettige Fettsäuren induzieren die IFIT-Genexpression in A549 Zellen 61
	4.2.3	Kurzkettige Fettsäuren induzieren die IFIT-Genexpression in THP-1 Zellen 63
	4.2.4	Kurzkettige Fettsäuren induzieren Typ I und Typ III IFN
	4.2.5	Kurzkettige Fettsäuren induzieren die IFIT-Genexpression in PBM67
	4.2.6 FFAR2/	Kurzkettige Fettsäuren induzieren die Expression von ISG über den Gα _{q/11} -Signalweg in einer IFN-abhängigen Weise
4	.3 Pro	pionat induziert eine Kreuztoleranz in Epithelzellen und Makrophagen 72
	4.3.1	Propionat induziert eine Kreuztoleranz
	4.3.2	Propionat induziert eine IFIT-vermittelte Kreuztoleranz
	4.3.3	Propionat induziert eine Kreuztoleranz in PBM79
4	.4 Ku	rzkettige Fettsäuren induzieren eine erhöhte antivirale Aktivität in Epithelzellen
u	nd Makro	ophagen
	4.4.1	Propionat induziert die Expression von antiviralen Effektormolekülen 81
	4.4.2	Propionat induziert eine erhöhte antivirale Aktivität
5	Diskuss	ion
5	.1 Cha	arakterisierung der hReg3α transgenen Mauslinie
5	.2 Ind	uktion von ISG in verschiedenen Zelllinien durch Propionat und dessen
A	uswirku	ngen auf das angeborene Immunsystem
	5.2.1	Propionat induziert ISG Expression über den FFAR2/G $\alpha_{q/11}$ -Signalweg in
	einer IF	N-abhängigen Weise
	5.2.2	Propionat induziert eine IFIT-vermittelte Kreuztoleranz gegenüber TLR1/2
	und TLI	
	5.2.3	Propionat induziert eine erhöhte antivirale Aktivität in Epithelzellen und
	Makrop	hagen
6	Zusamn	nenfassung
7	Anhang	
A	bbildung	sverzeichnis
8	Danksag	gung113

Inhaltsverzeichnis

9	Lebenslauf	15	5
---	------------	----	---

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
cDNA	complementary DNA
СТ	threshold cycle
CTLD	<i>C-type lectin-like carbohydrate recognition domain</i>
CXCL-2	Chemokine C-X-C motif ligand 2
DAMP	damage-associated molecular pattern molecules
DC	dendritic cell
dd	bidestilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSS	dextrane sodium sulfate
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethvlendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbend assav
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
GALT	gut-associated lymphoid tissue
gDNA	genomische DNA
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRO	Growth-regulated protein
HIP/PAP	Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/ pancreatic associated
	protein
H ₂ O	Wasser
hReg3a	human Regenerating gene protein 3α
HRP	horseradish peroxidase
IBD	inflammatory bowel disease
IEC	intestinal epithelial cell
IESC	intestinal epithelial stem cells
IgG	Immunglobulin G
ΙκΒ	inhibitor of κB
IL	Interleukin
IFNα	Interferon a
ΙΓΝλ	Interferon λ
IRAK1	IL1- receptor associated kinase
ISG	interferon stimulated genes
ISGF3	
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex

MIP-2	macrophage inflammatory protein 2
M-MLV	moloney murine leukemia virus
MNCs	mononuclear cells
mReg3y	<i>mouse Regenerating gene protein</i> 3γ, Ortholog zu hReg3α
mRNA	messenger RNA
Muc2	Mucin 2
MvD88	mveloid differentiation primary response gene 88
NFκB	nuclear factor <i>kB</i>
NGS	next generation sequencing
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
Pam3CSK4	N-Palmitovl-S-[2,3-bis(palmitovloxy)-(2RS)-Propyl]-[R]-
	Cysteinyl-[S]-Seryl-[S]-Lysyl-[S]-Lysyl-[S]-Lysyl-[S]-
	Lysin
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBM	periphäre Blutmakrophagen
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
nDC	plasmacytoid dendritic cell
PG	Pentidoglykan
PRR	nattern recognition recentors
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
aPCR	quantitative PCR
Reg	Regenerating gene
RIII	relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure
RO8191	2-(2.4. his(Trifluoromethyl)imidazo1.2-a1.8nanhthyridin-8-
K00171	2-(2,+2) 3 4 - 0 2 3 4 - 0 2 3 4 - 0 2 3 4 -0 2 3 4 -0 2 3 4 -0 2 3 4 -0 2 3 4 -0 2 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0
	his(trifluoromethyl)imidazol 2-al 8nanhthyridine
ROS	reactive orvigen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT_PCR	Real time PCR
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS_PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektronhorese
SDS-I AGE	specific nathogen free
STAT	specific puriogen free signal transducer and activator of transcription
TRS	tris huffered saline
TIR	Toll/interleukin_1_Rezentor
TIR	Toll_lika_Rezentor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF recentor-associated factor 6
	Linit
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
** I	w nacyp

Teilweise wurden gängige Fachausdrücke aus dem Englischen übernommen, wenn kein entsprechender deutscher Fachausdruck existiert oder gebräuchlich ist. Die genormten Bezeichnungen für naturwissenschaftliche Größen und die festgelegten Wertangaben wurden unverändert gebraucht. Die in der deutschen Sprache genormten Abkürzungen (Duden) wurden benutzt.

1.1 Das Mikrobiom

Alle Säugetiere werden von Gemeinschaften von Mikroorganismen bewohnt, die für den Wirt unerlässlich sind. Die Wirtszellen und die mikrobiellen Organismen arbeiten in einem dynamischen, symbiontischen Gleichgewicht zusammen. Das vielfältige Konsortium aus Bakterien, Archaeen, Pilzen, Protozoen, Viren und ihrem kollektiven Genom, das auf und im Körper zu finden ist, bildet das Mikrobiom. Es leistet einen wichtigen Beitrag zur Energiehomöostase, zum Stoffwechsel, zur Gesundheit des Darmepithels, zur immunologischen Aktivität und zur Neuroentwicklung. Das Mikrobiom ist dynamisch und unterliegt während des Lebens des Wirts wichtigen Veränderungen als Reaktion auf eine Vielzahl von Faktoren wie Ernährung, Umwelt, medizinischen Eingriffen und Krankheitszuständen.(1, 2). Die Interaktionen zwischen Mikrobiom und Wirt hängen von lokalen Crosstalk-Netzwerken ab, wobei z.B. jede intestinale Nische ihre eigene mikrobielle Gemeinschaft beherbergt, die an die lokale Umgebung angepasst ist und darauf reagiert. Die Zusammensetzung der Phyla unterscheiden sich sowohl entlang der Länge und Breite des Gastrointestinal (GI)-Trakts, als auch innerhalb der verschiedenen Schleimschichten. Das Ileum und der Dickdarm sind immunologisch viel reaktiver als der proximale Dünndarm (3). Die Architektur der Wirt-Zell-Mikroben Interaktion ist äußerst Komplex und die interagierenden Zellen unterscheiden sich erheblich. In den Krypten des Dünndarms reguliert das Mikrobiom die Proliferation der Enterozyten, indem es die DNA-Replikation und die Genexpression beeinflusst, während es an den Zottenspitzen die Expression von Genen reguliert, die an der Stoffwechsel- und Immunfunktion beteiligt sind (4). Enterozyten und Paneth-Zellen wiederum regulieren die luminalen Bakterien durch die Produktion von Mukus und anti-mikrobiellen Peptiden. Im Dünndarm begrenzt der Mukus die Anzahl der Bakterien, die das Epithel und die Peyer-Plaques erreichen können. Im Dickdarm trennt die innere Mukusschicht die kommensalen Bakterien vom Wirtsepithel. Die äußere Dickdarmschleimschicht ist der natürliche Lebensraum der kommensalen Bakterien (5).

Die am Häufigsten verwendeten Modelle für die Untersuchung der Dynamik der Interaktion zwischen Wirt und Darmmikroben und der Entwicklung von Krankheiten sind Mäuse und Ratten. Sie sind geeignete Modelle für die Erforschung von Möglichkeiten zur Entwicklung neuer mikrobiell-basierter Therapien. Es gibt auch einen zunehmenden Anstieg in der Verwendung von keimfreien Mäusen und Ratten, um das Zusammenspiel von Wirt und

Mikrobiom zu stören, zu orchestrieren und zu erforschen, mit einem Ausmaß an experimentellen Paradigmen, die beim Menschen nicht möglich sind (6). Um die aus solchen Modellsystemen gewonnenen Informationen in Bezug auf das menschliche Milieu zu verstehen und zu interpretieren, ist es jedoch von Bedeutung, die wichtigsten Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten zu kennen. Dies ist besonders wichtig, angesichts der großen Unterschiede in verschiedenen Bereichen der Genetik, der Darmanatomie, der Darmphysiologie, des Darmimmunnetzwerks, des Stoffwechsels, des Ernährungsverhaltens und anderer Bereiche, die alle auch mit Unterschieden im Mikrobiom korrespondieren können, zwischen Menschen und verschiedenen Tierarten (7).

1.2 Die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase

Um die Homöostase im GI-Trakt zu gewährleisten, ist es erforderlich, dass Unterschieden werden kann zwischen Milliarden symbiontischen Mikroben und einem seltenen, pathogenen Eindringling. Sowohl angeborene als auch adaptive Immunantworten dienen dazu, die Besiedlung mit Pathogenen zu verhindern und lokale und systemische Entzündungsreaktionen angesichts der kontinuierlichen Exposition gegenüber fremden mikrobiellen und ernährungsbedingten Antigenen zu steuern. Das darmassoziierte lymphoide Gewebe (GALT) stellt den Großteil der Immunüberwachung und -abwehr dar. Lymphoide Follikel, die T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen enthalten, sind bereit, je nach den spezifischen mikrobiellen Signalen entweder, eine proinflammatorische oder eine entzündungshemmende Reaktion einzuleiten. Das Darmepithel wird kontinuierlich durch pluripotente intestinale epitheliale Stammzellen (pluripotente IESC) erneuert, die sich an der Basis der Krypten befinden. Hier werden Proliferation und Differenzierung der epithelialen Zellvorläufer durch die lokale Stammzellnische reguliert (8). Die Mehrheit der Zellen im Darmlumen bilden Enterozyten, welche an die Stoffwechsel- und Verdauungsfunktion angepasst sind. Sekretorische intestinale Epithelzellen (IEC) einschließlich enteroendokriner Zellen, Becherzellen und Paneth-Zellen, sind auf die Aufrechterhaltung der Verdauungs- oder Barrierefunktion des Epithels spezialisiert. Die luminale Sekretion von Muzinen und antimikrobiellen Proteinen (AMP) durch Becherzellen bzw. Paneth-Zellen stellt eine physikalische und biochemische Barriere für den Kontakt von Mikroben mit der Epitheloberfläche und den darunterliegenden Immunzellen dar. Enteroendokrine Zellen stellen durch die Sekretion zahlreicher Hormonregulatoren der Verdauungsfunktion eine Verbindung zwischen dem zentralen und dem enterischen neuroendokrinen System dar. Zusammengenommen ergeben die vielfältigen Funktionen der IEC eine dynamische Barriere zur Umwelt, die den Wirt vor Infektionen und der kontinuierlichen Exposition gegenüber potenziell entzündlichen Reizen schützt (Abbildung 1) (9, 10).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der intestinalen Barriere.

(links) Schematische Darstellung des Dünndarms. Enterozyten, Enteroendokrine Zellen, Becherzellen, Paneth-Zellen und intestinale epitheliale Stammzellen (IESC) bilden die Darmwand. Es werden antimikrobielle Peptide und Mukus sezerniert. In der Lamina Propria befinden sich Makrophagen und dendritische Zellen. (rechts) Schematische Darstellung des Kolons. In der oberen Mukusschicht befinden sich Mikroben, in der unteren Mukusschicht nicht. Auch hier werden AMP von IEC und Becherzellen sezerniert. Adaptiert aus Peterson et al., (11).

1.3 Die Entzündungsreaktion

Als Entzündungsreaktion werden all jene physiologischen Mechanismen bezeichnet, mit denen ein Organismus auf Verletzungen und pathogene Keime reagiert. Bei einer Entzündungsreaktion werden Krankheitserreger bekämpft und geschädigtes Gewebe strukturell und funktionell wiederhergestellt oder abgebaut (12).

Spezifische *pattern recognition receptors* (PRR), wie z.B. *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), auf der Oberfläche von Epithel- und Immunzellen, identifizieren sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) von Krankheitserregern (13). Nach Erkennen der PAMP wird eine Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF, IL-1 β oder IL-6 und Chemokinen wie z.B. CXCL-2 initiiert. Diese führen zu einer weiteren Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der

Entzündung. Auch Proteine des Komplementsystems wandern in das Gewebe ein. Durch ein spezifisches Chemokinprofil wird bestimmt, welche Immunzellen zum Ort der Entzündung rekrutiert werden. Zunächst wandern hauptsächlich neutrophile Granulozyten in die Entzündungsstelle ein, werden jedoch später durch Monozyten und Makrophagen ersetzt. Neutrophile sowie Makrophagen erkennen Pathogene vorwiegend durch Opsonierung, z.B. durch Antikörper oder Komplementproteine, phagozytieren diese und zerstören sie durch die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) oder Stickstoffmonoxid (NO). Antigenpräsentierende dendritische Zellen wandern, nachdem sie über PAMP Krankheitserreger erkannt, aufgenommen und Bestandteile an ihrer Oberfläche präsentiert haben, in die sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. in die drainierenden Lymphknoten, ein. Dort treffen sie auf T- und B-Zellen und lösen eine dem Pathogen entsprechende adaptive Immunantwort aus (14, 15).

1.4 Der Toll-like-Rezeptor (TLR)-vermittelte Signalweg

Die Erkennung von Mikroben beginnt mit den zwei wichtigsten *pattern recognition receptor* Systemen (PRR): *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und *nucleotide-binding oligomerization domain molecules* (NOD).

TLR sind single-pass Typ 1-Transmembranproteine, die durch extrazelluläre leucinreiche eine intrazelluläre Toll/interleukin-1-Rezeptor Sequenzen und (TIR)-Domäne charakterisiert sind. Die TLR gehören zu den PRR und erkennen pathogen-associated molecular patterns (PAMP) durch direkte Interaktion mit der Erregermembran und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung zwischen Fremd- und Eigenantigen durch das angeborenen Immunsystem (16). Im humanen System sind 10 TLR (TLR1-10), in der Maus sind 12 TLR (TLR1-9, TLR11-13) bekannt (17). Während sich TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär auf Endosomen oder Lysoendosomenmembranen befinden, kommen TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 an der Zelloberfläche vor. TLR2 kann mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bilden (18). Das Heterodimer TLR1/2 erkennt Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien, wohingegen der TLR4 das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien identifiziert (16). Die Bindung eines Liganden an den TLR führt zur Anlagerung eines zytoplasmatischen Adapterproteins, myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), an die TIR-Domäne. Daraufhin wird die IL1- receptor associated kinase (IRAK1) rekrutiert, die nach einer Autophosphorylierung von MyD88 dissoziiert und TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) aktiviert. Anschließend induziert

TRAF6 die *inhibitor of* κ B (I κ B)-Signalkaskade, die letztlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor* κ B) resultiert. Nach der Bindung an den entsprechenden TLR, kommt es zur Ausschüttung eines spezifischen inflammatorischen Zytokinprofils, das die weitere Immunreaktion steuert und beeinflusst (19, 20).

1.5 Typ I und Typ III Interferone und der JAK/STAT Signalweg

Interferone bilden die erste Verteidigungslinie gegen mikrobielle Infektionen, insbesondere gegen Viren. Sie verleihen den Zellen antivirale Eigenschaften, indem sie die Expression von Hunderten von Genen induzieren, die als *interferon stimulated genes* (ISG) bekannt sind.

Typ I IFN haben ein breites Spektrum an Funktionen, darunter wirken sie antiviral, antibakteriell und antimykotisch gegen Pathogene, haben antiproliferative Funktionen und die Fähigkeit, die angeborene und adaptive Immunantwort zu modulieren (21, 22). Die Familie besteht aus mehreren Subtypen: 13 IFN α bei Menschen (14 bei Mäusen) sowie IFN β , IFN ϵ , IFN κ und IFN ω beim Menschen und IFN ζ bei Mäusen (23). Typ I IFN werden von Zellen durch die Bindung des heterodimeren Rezeptors, bestehend aus dem IFN α Rezeptor 1 (IFNAR1) und dem IFN α Rezeptor 2 (IFNAR2), die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, wahrgenommen (24).

Im Jahr 2003 entdeckten zwei Gruppen gleichzeitig drei neue Zytokine beim Menschen, die in der Lage waren, eine virale Infektion zu blockieren: IL29, IL28A und IL28B, auch bekannt als IFN λ 1, IFN λ 2 bzw. IFN λ 3 (25, 26). Ähnlich wie Typ I IFN werden Typ III IFN von den meisten Zelltypen im Körper exprimiert, jedoch werden sie von einer begrenzteren Anzahl von Zellen, hauptsächlich epithelialen Ursprungs, wahrgenommen, was zu zelltypspezifischen Reaktionen führt (27). Typ III IFN binden an einen heterodimeren Rezeptor, der aus dem Typ III IFN-Rezeptor (IFNLR1, IL28RA) und dem Interleukin 10 Rezeptor 2 (IL10R2) besteht. Während IL10R2 in den meisten Zelltypen breit exprimiert wird, hat IL28RA eine begrenzte Expression und wird in Epithelzellen (z. B. Darm-, Lungen-, Vaginalepithel und Hepatozyten) (28, 29) und einigen Immunzellen (DCs, pDCs, NK-Zellen und Neutrophile) gefunden (30-32).

Die Bindung von IFN an ihre Rezeptoren führt zur Aktivierung bestimmter Signalwege, hauptsächlich des hochkonservierten Janus-Kinase (JAK)/ *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Weges. Durch die Bindung von IFN an dessen Rezeptor, wird ein transkriptionell aktives STAT1 und STAT2 durch rezeptorgebundene JAK-vermittelte

Phosphorylierung von Tyrosin (Y) 701 erzeugt. Nach der Bildung von Heterodimeren assoziieren diese beiden Proteine mit dem *interferon regulatory factor 9* (IRF9), um einen transkriptionell aktiven *interferon stimualted gene factor 3* (ISGF3) zu bilden, der die Genexpression durch Bindung an *interferon stimulated response element* (ISRE) kontrolliert (Abbildung 2) (33).



Abbildung 2: IFN Typ I und III induzierter JAK/STAT-Signalweg. Typ I und Typ III Interferone binden spezifische Rezeptoren und aktivieren den JAK/STAT Signalweg. Adaptiert aus Lazear et al.; (34).

Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats (Ifit) sind prominente Vertreter der Interferon stimulierten Gene (ISG). Die murine Ifit-Familie umfasst drei charakterisierte Mitglieder: *Ifit1*, *Ifit2* und *Ifit3* (35), wohingegen die humane IFIT-Genfamilie aus vier Genen namens *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3* und *IFIT5* besteht. Die Expression dieser Gene wird durch Interferon-Behandlung (Typ I und Typ III IFN), eine virale Infektion oder pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP) stark erhöht (36).

1.6 Antimikrobielle Peptide

Wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind antimikrobielle Peptide (AMP), die in einer Vielzahl von Lebensformen und Mikroorganismen bis hin zum Menschen vorkommen (37). Viele AMP weisen ein außerordentlich breites Spektrum an antimikrobieller Aktivität auf, das sowohl gram-positive und gram-negative Bakterien als

auch Pilze, Viren und einzellige Protozoen umfasst (38). Neben einer direkten antimikrobiellen Aktivität zeigen mehrere AMP die Fähigkeit, die angeborene Immunantwort des Wirts zu modulieren und dadurch indirekt die Pathogen Abwehr zu fördern (39). Die Mitglieder der Gruppe der AMP unterscheiden sich stark in ihrer Sequenz und Struktur, zeichnen sich jedoch alle in erster Linie durch ihre geringe Größe (10-100 Aminosäuren), ihre positive Molekülladung und ihren amphipathischen Charakter aus. Je nach Aminosäuren-Zusammensetzung und der daraus resultierenden Sekundärstruktur, können AMP in vier Gruppen unterteilt werden: (1) α -helikale Peptide, (2) β -Faltblatt-Peptide, die durch zwei bis vier Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden, (3) schleifenoder ringförmige Peptide mit einer Disulfidbrückenbindung und (4) Peptide mit extended components Elementen (40). In Säugetieren befinden sich AMP vor allem in Granula von Neutrophilen und in Sekreten von Epithelzellen, die Haut- und Schleimhautoberflächen bedecken (41). Interessanterweise werden viele AMP als inaktive Vorläufer produziert, die erst nach einer proteolytischen Spaltung durch Proteasen aktiv werden (42). Sie können einerseits konstitutiv exprimiert, in hohen Konzentrationen als inaktive Vorstufen gespeichert und lokal an Infektions- und Entzündungsstellen freigesetzt werden, andererseits kann die Expression als Reaktion auf PAMP oder Zytokine induziert werden (43).

1.7 Die Regenerating gene (Reg) Familie

Im Gastrointestinal (GI)-Trakt spielen intestinale Epithelzellen (IEC) eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Mikrobiota und Wirt, indem sie eine Mukusbarriere aufbauen, humorale Immunantworten auslösen oder antimikrobielle Peptide (AMP) sezernieren (44). C-Typ-Lektine aus der *regenerating islet-derived protein type* (Reg) Familie gehören zu den wichtigsten AMP, die in der Darmschleimhaut produziert werden (45). Alle Mitglieder der Reg-Familie teilen sich das konservierte Sequenzmotiv der C-Typ Lektine, die sich durch ihre CA²⁺-abhängige *C-type lectin domain* (CTLD), auch bekannt als *carbohydrate-recognition domain* (CRD) auszeichnen. Diese CTLD-Struktur bildet eine ca. 16kDa große Doppelschleife (*'loop-in-a-loop'*), die durch zwei Disulfidbrückenbindungen stabilisiert wird und kann sowohl hydrophobe als auch polare Wechselbeziehungen mit Liganden eingehen (46). Je nach Primärstruktur wird die Reg-Familie in vier Untergruppen unterteilt: Reg I, II, III, IV (47). Die Mitglieder der Reg III Untergruppe werden hauptsächlich in den Paneth-Zellen exprimiert. Dabei stellen die

Paneth-Zellen eine differenzierten Epithelzellgruppen dar, die das Gewebe des Dünndarms bilden und sich am Fuß der Lieberkühn-Krypten befinden (48).

Im Menschen sind bisher humanes Reg3 α (auch hReg3 α oder HIP/PAP) sowie das hReg3 γ aus der Reg III Gruppe beschrieben worden (49), wohingegen in der Maus vier Reg III Proteine bekannt sind: mReg3 α - δ . mReg3 γ ist das Ortholog zu hReg3 α (45, 50). Die Mitglieder der Reg III Familie binden an Peptidoglycan und wirken spezifisch antimikrobiell gegen gram-positive Bakterien (45). Außerdem wird Reg3 an die Mukusschicht des Darms abgegeben, was einen direkten Kontakt der intestinalen Bakterien mit der Epithelschicht verhindert (51). Dies ermöglicht eine umfassende Regulation, sowohl der symbiontischen als auch der pathogenen Bakterien und unterstützt somit die Toleranz gegenüber dem Darmmikrobiom durch das Immunsystem (11). Wird die Mukusschicht von Bakterien überwunden, wird die Expression der Reg III Peptide unter anderem durch den TLR-Signalweg induziert (52).

Die antimikrobielle Aktivität von hReg3 α und mReg3 γ wird durch eine posttranslationale Modifikation kontrolliert. Das anionische N-terminale Prosegment scheint dabei die positivgeladene Kernregion des aktiven Proteins zu maskieren. Erst die Abspaltung des Prosegments durch das Enzym Trypsin legt die Kernregion frei, sodass diese mit bakteriellen Zellwandbestandteilen interagieren kann. Die antimikrobielle Aktivität von hReg3 α oder mReg3 γ erhöht sich dabei um das ca. 1000-fache. hReg3 α tötet spezifisch gram-positive Bakterien, letztlich durch die Ausbildung einer hexameren Pore, die zur Lyse des Bakteriums führt (Abbildung 3), (53, 54).



Abbildung 3: Modell der bakteriziden Funktion von Reg3a.

Trypsin spaltet Pro-Reg3α, wodurch das Peptid mit Peptidoglycan interagieren kann und eine hexamere Pore bildet, die zur Lyse des Bakteriums führt. Adaptiert aus Mukherjee et al.; (53).

1.8 Endotoxin- und Kreuztoleranz

Vor über 70 Jahren wurde das Phänomen der Endotoxin (LPS)-Toleranz das erste Mal beschrieben (55). Eine wiederholte oder anhaltende Exposition mit nicht-letalen Dosen LPS, führt zur Resistenz gegen Schock, der durch letale Dosen LPS induziert wird. LPS Toleranz ist somit ein induzierter Mechanismus des angeborenen Immunsystems zum Schutz des Körpers vor einer überschießenden Entzündungsreaktion und damit verbundenen Gewebszerstörung (56). Wie bereits beschrieben erkennen TLR Signaturmoleküle wie Lipopeptide, Peptidoglycan, LPS, Flagellin und Nukleinsäuren (57). Nach der Erkennung dieser PAMP lösen die nachfolgenden Signale eine Entzündungsreaktion aus, charakterisiert durch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, welche durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor* (NF)-kB, induziert werden. Im Gegensatz dazu ist eine pathologische Dysregulation dieses Prozesses ein Kennzeichen von Gewebsschäden und Autoimmunerkrankungen (58). Daher ist es wichtig, dass die, durch die TLR-Signalkaskade vermittelte Immunreaktion, streng reguliert wird.

Analog zur LPS Toleranz gibt es die sogenannte Kreuztoleranz. TRIM30 α wurde zum Beispiel als ein negativer Regulator der TLR-induzierten NF- κ B-Aktivierung, als Zielgen der LT β R-Signalisierung in Knochenmarks-Makrophagen identifiziert. Die LT β R-induzierte TRIM30 α -Expression hemmt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bei TLR4- und TLR9-Restimulation und zeigt damit, dass die LT β R-Aktivierung eine Kreuztoleranz bei der TLR-induzierten Zytokinproduktion induziert (59).

1.9 Kurzkettige Fettsäuren

Immer mehr Hinweise deuten darauf, dass kommensale Darmbakterien, hauptsächlich *Bacteroidetes, Firmicutes* und *Actinobacteria* entscheidend zur Gesundheit des Wirts und zur Darm- und Immunhomöostase beitragen. Sie gewinnen Energie aus der Fermentation und Transformation unverdauter Nahrungsmittel, insbesondere aus der Fermentation von Kohlenhydraten. Nicht verdauliche Polysaccharide werden zu Monosacchariden abgebaut und anschließend in bakterielle Fermentationsprodukte umgewandelt, insbesondere kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acidc*, SCFA) (60, 61). SCFA sind Carbonsäuren, die durch das Vorhandensein eines aliphatischen Endes mit zwei bis sechs Kohlenstoffen definiert sind. Im Dickdarm, dem Hauptproduktionsort der SCFA, müssen spezifische Bakterien vorhanden sein, was das Fehlen von SCFA in keimfreien Mäusen erklärt (62). Die

wichtigsten SCFA Acetat (C2), Propionat (C3) und Butyrat (C4), die durch die Fermentation von Ballaststoffen und resistenten Stärken freigesetzt werden, werden hauptsächlich im proximalen Dickdarm in einer Konzentration von 70-140mM freigesetzt (63). Die Bildung Butyrat Propionat im Darm erfolgt hauptsächlich von und aus dem Kohlenhydratstoffwechsel in der Glykolyse, kann aber auch aus dem Stoffwechsel organischer Säuren und Aminosäuren erfolgen (64). Acetat wird aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) aus der Glykolyse gebildet und kann durch das Enzym Butyryl-CoA:Acetyl-CoA-Transferase auch in Butyrat umgewandelt werden (65). Das molare Verhältnis der Acetat-, Propionat-, und Butyratproduktion im Dickdarm beträgt ungefähr 60:25:15 (66). Dieses Verhältnis ist jedoch stark abhängig von verschiedenen Faktoren wie Zusammensetzung der Mikrobiota, Ernährung, Ort der Fermentation und Genotyp des Wirts. Umfangreiche Untersuchungen haben die positiven Auswirkungen von kurzkettigen Fettsäuren bereits beschrieben, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen meist noch unklar sind.

1.10 Die Rolle von kurzkettigen Fettsäuren in Krankheiten

Bereits innerhalb eines Tages kann eine Ernährungsumstellung die Zusammensetzung der Darmmikrobiota verändern (67). Das größte Problem der westlichen Ernährung, die typischerweise einen hohen Anteil an Fetten und verdaulichen Sacchariden besitzt, ist, dass die Nährstoffe hauptsächlich im Zwölffingerdarm absorbiert werden und zu wenig Substrate für Bakterien im Kolon übrigbleiben. Dies führt zu einer Dysbiose, die Beeinträchtigung der Mikrobiota-Zusammensetzung und -Diversität und damit eine erhöhte Anfälligkeit für Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (IBD) oder sogar Dickdarmkrebs (68). Da Entzündungskrankheiten immer weiter zunehmen, müssen weitere Ansätze untersucht werden, um diese Krankheitsbilder zu verbessern. Eine Alternative wäre die direkte Verabreichung von nützlichen Bakteriencocktails einschließlich der SCFA-Produzenten Bifidobakterien. Eine Studie hat gezeigt, dass die Verabreichung von Bifidobacterium longum an Mäusen die Produktion von Acetat erhöht und ihre Anfälligkeit für Infektionen senkt (69). Eine andere Studie zeigt den positiven Effekt von Probiotika auf. Probiotika sind lebende Organismen, die in ausreichender Menge verabreicht, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen (70). VSL#3 ist eine kommerzielle probiotische Mischung aus acht Bakterienstämmen, darunter Lactobacillus, Bifidobacterium und einem Streptococcus Stamm. Interessanterweise wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass VSL#3 eine tiefgreifende Wirkung auf systemische Erkrankungen des Verdauungssystems

hat, insbesondere den Magen-Darm-Trakt. Außerdem zeigt das Probiotikum eine positive Wirkung auf Fettleibigkeit und Diabetes, allergische Erkrankungen, Krankheiten des Nervensystems und Knochenerkrankungen. Genauere Mechanismen und Wirkungsweisen müssen jedoch noch untersucht werden (71).

1.11 Signalvermittlung der kurzkettigen Fettsäuren

Kurzkettige Fettsäuren vermitteln durch zwei Hauptmechanismen Signale in die Wirtszellen. Erstens kann durch Hemmung der Histon-Deacetylasen (HDAC) die Genexpression direkt reguliert werden und zweites kann es durch die Bindung von SCFA an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, FFAR3 (GPCR41/GPR41), FFAR2 (GPCR43/GPR43) und GPR109A, zur Signalübertragung kommen.

Die Acetylierung von Lysinresten in Histonen induziert die Genaktivierung, indem sie den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu Promotorregionen erleichtert (72). HDAC entfernen Acetylgruppen von Histonen, daher kann eine Hemmung der HDAC-Aktivität die Genexpression erhöhen. Auf diese Weise können SCFA die Genexpression in einer Vielzahl von Zellen verändern (73).

Wenn GPCR durch Liganden aktiviert werden, dissoziieren die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, die an den Rezeptor gekoppelt sind, von den $\beta\gamma$ -Untereinheiten und wirken weiter auf intrazelluläre Signalproteine oder zielen direkt auf funktionelle Proteine, abhängig vom Typ der α -Untereinheiten wie G α_s , G $\alpha_{i/o}$, G $\alpha_{q/11}$ und G $\alpha_{12/13}$ (74). Der Effektor des G $\alpha_{i/o}$ -Weges ist die Adenylatzyklase, ein Enzym, das mit der Erzeugung von cAMP in Verbindung steht. Die Interaktion mit dem G $\alpha_{i/o}$ -Typ hemmt die cAMP-Bildung. Der Effektor des G $\alpha_{q/11}$ -Signalweges ist die Phospholipase C (PLC). Die Aktivierung von PLC fördert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3), woraufhin die Aktivierung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum führt (Abbildung 4) (75, 76).



Abbildung 4: Signalwege der Rezeptoren für kurzkettigen Fettsäuren (SCFA). Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) aktivieren GPCR41/FFAR3 und GPCR43/FFAR2. Durch die Bindung von FFAR3 kommt es zum G α i-vermittelten Signalweg und durch die Bindung an FFAR2 kommt es einerseits zum G α i – und andererseits zu G α q-vermittelten Signalweg. Adaptiert aus Kimura et al.; (77).

Interessanterweise koppelt FFAR3 ausschließlich über den Pertussis Toxin sensitiven $G\alpha_{i/o}$ -Signalweg, während FFAR2 eine Kopplung über $G\alpha_{i/o}$ - und den Pertussis Toxin unempfindlichen $G\alpha_{q/11}$ -Signalweg zeigt (78). SCFA sind natürliche Agonisten von FFAR2 und zeigen speziesabhängige Variationen in der Ligandenantwort. Die Potenzen einzelner SCFA bei der Aktivierung von FFAR2 beim Menschen werden durch EC50-Werte bestimmt und sind wie folgt geordnet: C2 = C3 > C4, während für den Maus Rezeptor gilt: C2 > C3 > C4. Diese Unterschiede in den beiden Spezies könnten darauf zurückzuführen sein, dass der Mausrezeptor ~84% Aminosäureähnlichkeit mit dem menschlichen Rezeptor teilt (79, 80).

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
Bakterienschüttler MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
BD FACSAria TM IIu	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACSCelesta TM	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACSymphony TM A5 SORP	BD Biosciences, Heidelberg
Begasungsbrutschrank Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
Eismaschine Ziegra	Ziegra Eismaschinen GmbH
Fusion Puls TS	Vilber, Eberhardzell
Gefrierschrank -80°C	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach
Geldokumentation GeneGenius	Syngene, Cambridge, UK
Geldokumentation ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad, München
Gelkammer Sub-Cell [®] GT	Bio-Rad, München
ImageQuant LAS4000 mini	GE Healthcare, Freiburg
Incucyte SX5	Sartorius AG, Goettingen, Germany
Inkubator BBD 6620	Heraeus, Hanau
Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab, Mettmenstetten
Luminometer Glomax [®]	Promega, Mannheim
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Microwelle	Severin, Sundern
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mini-PROTEAN [®] Electrophoresis System	Bio Rad, München
Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio Rad, München
Mr Frosty TM Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
Multizentrifuge X3FR	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA

Nanophotometer	Implen GmbH, München
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad, München
Netzgerät PowerPack P25 T	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Gerät T100	Bio-Rad, München
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipetten	Metler-Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhilfe accu-jet pro [®]	Brand, Wertheim
QuantStudio TM 3 Real-Time PCR System, 96-	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
well, 0,1mL	MA, USA
QuantStudio TM 5 Real-Time PCR System, 384-	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
well	MA, USA
Sterilbank HERAsafe [®] 2030i	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
Stickstofftank MVE 810 Eterne/MVE EuroCyl	German Cryo, Jüchen
Tecan Spark 10M	Tecan, Schweiz
Thermoblock Bio TDB-100	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
ThermoShaker TS-100	A. Hartenstein, Würzburg
Tissue Lyser LT	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Mörfelden-Walldorf
Vortex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich,
	Schweiz
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfcups (1,5 und 2ml) FACS-Röhrchen BD FalconTM Gel-Blotting-Papier Whatman[®] Eppendorf, Hamburg BD Biosciences, Heidelberg A. Hartenstein, Würzburg Gewebekulturschalen Glas-Pasteurpipetten HyperfilmTM MF Incucyte ImageLock 96-Well Platten Kanülen BD Microlance 3TM Kryoröhrchen Cryo TubesTM Microwelltiterplatten MicroWellTM (96-Well) Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96-Well) PCR Platte 96-/384 Well (farblos)

Petrischalen

Pipettenspitzen (10, 200 und 1000µl) PVDF Transfermembran Immobilon-P Reaktionsgefäß (1, 1,5, 15 und 50ml) Safe Seal-Tips professional Serologische Pipetten (5 und 10ml) Spritzen BD PlastikpakTM (1, 2, 5, 10 und 20ml) Stahlkugel, (rostfrei, 5mm) Sterilfilter $(0,2\mu M)$ Sterilfilter Bottle Top 75mm Nalgene® UV-Küvette micro, Plastibrand® Zellkulturflaschen (25, 75 und 175cm²) Zellkulturflaschen BD FalconTM (25, 75 und 175cm^2) Zellschaber (25 und 39cm) Zellsieb Cell Strainer BD Falcon (40µm und $70\mu M$)

Greiner Bio-One, Frickenhausen VWR, Darmstadt GE Healthcare, Freiburg Sartorius Group, Bath, UK BD Biosciences, Heidelberg Nunc, Langenselbold Nunc, Langenselbold

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Millipore, Schwalbach Sarstedt, Nümbrecht Biozym, Hessisch Oldendorf Sarstedt, Nümbrecht BD Biosciences, Heidelberg

Qiagen, Hilden Sartorius, Göttingen Nunc, Langenselbold Brand, Wertheim Sarstedt, Nümbrecht BD Biosciences, Heidelberg

Sarstedt, Nümbrecht BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach
AB-Gruppen-Serum, human	PAN Biotech, Aidenbach

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel® 30	Roth, Karlsruhe
Agar, bacteriological	Affymetrix, Cleveland, OH, USA
Agarose, electrophoresis grade	Bio&Sell, Nürnberg
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BD OptEIA TM Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Cölbe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Tablets EASYpack	
Coomassie Brillant Blue R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dextransodiumsulfat (DSS)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Standard (100bp und 1kb Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
ECL TM Prime Western Blotting Detection	GE Healthcare, Freiburg
Reagent	
Ethanol	Merck, Darmstadt
FKS	PAN Biotech, Aidenbach
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M
GelRed	Linaris, Dossenheim
Ham's F-12K (Kaighn's) Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
Hygromycin B	PAA Laboratories, Cölbe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB Broth	Affymetrix, Cleveland, OH, USA
Lipofectamine TM LTX Reagent with PLUS TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Reagent	MA, USA
LPS (Salmonella enterica Serotyp abortus equi)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
Metafectene PRO	Biontex, München
Natrium Acetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natrium Butyrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium Propionat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neomycin (G418/G420)	PAN Biotech, Aidenbach
nukleasefreies H ₂ O	Promega, Mannheim
Pam3CSK4	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
PeqGold Trifast	PeqLab, Erlangen
Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL	Dako, Carpinteria, CA, USA
Pertussis-Toxin	List Biological Laboratories,
	Campbell, CA, USA
Protein Marker VI (10-245) prestained	AppliChem, Darmstadt
Rekombinantes IL-28B/IFN-lambda 3 Protein	Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA
RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego
RNA later TM RNA Stabilisation Reagent	Qiagen, Hilden
RO8191	Biomol GmbH, Hamburg
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech, Aidenbach
Ruxolitinib	Biozol, Eching
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SOC Medium	New England Biolabs, Frankfurt a.M
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Universales Typ I IFN	Enzo Life Sciences, Lausen,
	Österreich
Wash Buffer 10x	Dako, Hamburg
YM-254890	Biomol, Hamburg

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel und Feststoffe wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.4 Puffer und Lösungen

Abstopplösung für ELISA	$2N H_2SO_4$
Blockierlösung für ELISA	1% BSA in PBS

fkirchen bs, Frankfurt a.M. fkirchen fkirchen nbach fkirchen Lausen,

Blockierlösung für Western Blot	5% BSA in TBS-T
Blotpuffer (10x)	2M Glycin
	250mM Tris
Coomassie-Entfärbepuffer	10% Essigsäure
	40% Ethanol
Coomassie-Färbepuffer	10% Essigsäure
	40% Ethanol
	0,2% Coomassie-Brillant Blue R250
Einfriermedium für Zellen (2x)	20% DMSO
	80% FCS
FACS-Puffer	2% FCS in PBS
	1mM EDTA
Lämmli-Auftragspuffer (4x)	0,5M Tris-HCl, pH 6,8
	40% Glycerin
	0,04% β-Mercaptoethanol
	4% SDS
	0,05% Bromphenolblau
Lämmli-Elektrophorese-Puffer (5x)	120mM Tris-Base
	0,95M Glycin
	0,5% SDS
PBS (pH 7,3)	137mM NaCl
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O
	1,5mM KH ₂ PO ₄
	2,7mM KCl
PBS-T	0,05% Tween [®] 20 in PBS
RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,5
	150mM NaCl
	1% Nonidet P40
	0,5% Natriumdesoxycholat
	0,1% SDS
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat
	1mM EDTA
TBS (pH 7,4)	150mM NaCl
	2,7mM KCl

	25mM Tris-Base
TBS-T	0,05% Tween [®] 20 in TBS
Tris-Puffer für SDS-PAGE	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
	und
	1,0M Tris-HCl (pH 6,8)
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16% (w/v) Trypanblau
	150mM NaCl

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde zweifach entsalztes Wasser aus der Millipore-Anlage MilliQ (Millipore, Schwalbach) verwendet.

2.5 Kits

BCA TM Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
eBioscience TM Foxp3/Transcription Factor	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Staining Buffer Set	MA, USA
ELISA Duo Sets (TNF und CXCL-2)	R&D Systems, Wiesbaden
innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytic Jena, Jena
M-MLV-Reverse Transkriptase Kit	Promega, Mannheim
PureLink PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
PureLink Plasmid Midi Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
PureLink Quick Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
PureLink Quick Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	MA, USA
QIAmp PowerFecal DNA Kit	Qiagen, Hilden
2.6 Enzyme	

GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Promega, Mannheim
REDTaq [®] DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

Takyon Low ROX SYBR 2X MasterMix

Eurogentech, Lüttich, Belgien

2.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden entweder von der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) oder von der Firma Metabion (Martiensried) bezogen. Oligonukleotide von Metabion wurden 1:20 vorverdünnt.

Reverse Transkription	
Oligo (dT) 15 Primer	5' TTT TTT TTT TTT TTT 3'
Mikrobiomanalysen	
Firm9434F	5' GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA 3'
Firm1060R	5' AGCTGACGACAACCATGCAC 3'
Ver1165F	5' TCAKGTCAGTATGGCCCTTAT 3'
Ver1263R	5' CAGTTTTYAGGATTTCCTCCGCC 3'
Universal926F	5' AAACTCAAAKGAATTGACGG 3'
Universal1062R	5' CTCACRRCACGAGCTGAC 3'
mRNA-Expression (Maus)	
Cxcl-2	qMmuCED0003897
Ffar2	qMmuCED0050403
Ifit1	qMmuCID0012621
Ifit2	qMmuCID0026327
Ifit3	qMmuCID0041372
IL28b/IFNλ	qMmuCED0061471
Il28ra	qMmuCID0022767
Isg15 for	5'GAG CTA GAG CCT GCA GCA AT3'
Isg15 rev	5'TTC TGG GCA ATC TGC TTC TT3'
Mx1	qMmuCID0023356
Oasl2	qMmuCED0047823
Tnf for	5'CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC3'
Tnf rev	5'AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT3'

Housekeeping Gene (Maus) GAPDH for

5'CCTCGTCCCGTAGACAAAATG3'

pcDNA3.1 neo

Kan/Neo

mouse cDNA clone IFIT2 in PCMV6-

GAPDH rev	5'TCTCCACTTTGCCACTGCAA3'
Ubiquitin C for	5'AGC CCA GTG TTA CCA CCA AG3'
Ubiquitin C rev	5'ACC CAA GAA CAA GCA CAA GG3'
mRNA-Expression (human)	
FFAR2	qHsaCED0044139
IFIT1	qHsaCED0034841
IFIT2	qHsaCID0012875
IFIT3	qHsaCED0036466
IFNA1/IFNa	qHsaCED0048248
IL28A/IFNλ	qHsaCED0057428
IL28RA	qHsaCID0008583
ISG15 for	5'GCG AAC TCA TCT TTG CCA GTA3'
ISG15 rev	5'CCA GCA TCT TCA CCG TCA G3'
MX1 for	5'CCT GCC TTT AAT GCA CTG G3'
MX1 rev	5'ATG AGC CCT CGA TAA ACC TC3'
Housekeeping Gene (human)	
B2M	qHsaCID0015347
RPL37a	qHsaCED0005290
Primer zur Genotypisierung der hReg3αt	g-Mauslinie
hReg3atg reverse:	5' GCA ACG TGC TGG TTA TTG TG 3'
hReg3α tg forward:	5' CCA GAG GGC CGC TTC TGG CAG
	G 3'
Sequenzierprimer	
T7 Promotor forward	5' AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'
BGH reverse	5' TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3'
2.8 Plasmide	
huIFNL1_Promotor_luciferase_eGFP	eigene Herstellung
huISRE-IFNαβ Reporter	Geneart, Regensburg, Deutschland
mIFIT_Promoter_1.3KB_luciferase_eGFP	eigene Herstellung

Origene EU, Herford, Deutschland

mouse cDNA clone IFIT3 in PCMV6-Origene EU, Herford, Deutschland Kan/Neo mouse IFIT1 Gene ORF cDNA clone Sino Biological, Peking, China expression plasmid, C-GFPSpark tag CMV/Hygro NFAT Luciferase EGFP Geneart, Regensburg, Deutschland NFAT Luciferase pgl 4.14 eigene Herstellung pcDNA3.1 3xFLAG IFIT2 Addgene (Cat: #53555), MA, USA pcDNA3.1 3xFLAG IFIT3 Addgene (Cat: #53553), MA, USA pGL4.14 ISRE-STAT1/2_IFNabeigene Herstellung Luciferase Reporter pSBbi-GN Addgene (Cat: #60517), Watertown MA, USA pSBbi-GN FL mouse IFIT1 eigene Herstellung pSBbi-GN mIFIT2 eigene Herstellung pSBbi-GN mIFIT3 eigene Herstellung

2.9 Antikörper

Anti-Human CD11b AF488, Klon M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA	
(Ratte)		
Anti-Human GPCR43 AF647	Bioss Antibodies, Woburn, MA, USA	
Anti-Human HLA-DR BV605, Klon L243	BioLegend, San Diego, CA, USA	
(Maus)		
Anti-Human IFIT1, D2X9Z	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.	
Anti-Human Phospho-STAT2; D3P2P	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.	
Anti-Human Reg3α	Origene, Rockville, MD USA	
Anti-Human TNF-α PE, Klon Mab11	BioLegend, San Diego, CA, USA	
(Maus)		
Anti-Maus TNF-α PE, Klon MP6-XT22	BioLegend, San Diego, CA, USA	
(Ratte)		
eBioscience TM Fixable Viability Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,	
eFluor TM 506	USA	
Rabbit IgG (H+L), AF488 (Ziege)	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.	
2.10 Zelllinien		
-----------------	------------------------------	------------------------
Zelllinie	Beschreibung	Kultur
A549	human Lungen-	F-12K Medium, 10% FCS,
	Epithelzelllinie, adhärent	1% Pen/Strep
	(ATCC: CCL-185)	
СМТ-93	murine Kolon-	RPMI 1640, 10% FCS, 1%
	Adenokarzinom-Zelllinie,	Pen/Strep
	syngen zu C57BL/6,	
	adhärent (ATCC: CCL-223)	
THP-1	humane Blutmonozyten-	RPMI 1640, 10% FCS, 1%
	Zelllinie, Suspensionszellen	Pen/Strep
	(ATCC: TIB-202)	

2.11 Versuchstiere

C57BL/6N Wildtyp C57BL/6N-Tg(REG3A) bzw. hReg3αtg

Eigenzucht (D4) eigene Herstellung

2.12 Software und Internet-Ressourcen

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2016 erstellt. Die Darstellung der Abbildungen erfolgte mit Adobe Illustrator 2020. Die Auswertung von Quantitativen Real-Time PCR wurde durch das Programm QuantStudioTM Design & Analysis Software v1.5.1 unterstützt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 7 durchgeführt. Für die Auswertung durchflusszytometrischer Messungen kam die Software FlowJo_v10.6.1 zum Einsatz. Die Archivierung von Literatur und das Erstellen des Literaturverzeichnisses erfolgte unter Zuhilfenahme von EndNote X9.3.3. Außerdem wurde die Internetplattform Pubmed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) für die Literaturrecherche verwendet.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Geweben

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus frischen oder bei -20°C gelagerten Gewebestücken. Das zu verarbeitende Material wurde in 500µl Cell Lysis Solution (Qiagen) aufgenommen und 0,4µg/µl Proteinase K (Promega) hinzugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 56°C schüttelnd bei 700rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf) verdaut. Anschließend wurden 200µl *Protein Precipitation Solution* (Qiagen) hinzugegeben und mittels eines Vortex MS2 Minishakers (IKA) durchmischt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1700g wurde der Überstand zu 700µl 100%igem Isopropanol gegeben und durch Invertieren gemischt. Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1800g für 5min. Das Pellet wurde anschließend in 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun konnte das Pellet getrocknet und die DNA in 50µl nucleasefreiem ddH₂O resuspendiert werden. Die Lagerung von genomischer DNA erfolgte bei 4°C.

3.1.2 Isolation von genomischer DNA aus Kot

Mit Hilfe des QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen) wurde genomische DNA nach Herstellerangaben aus Mauskot isoliert. Für die Beschaffung der Proben wurden die Mäuse einzeln in Transportboxen gesetzt und nach 30 Minuten (min) ca. 80mg Faeces gesammelt und bis zur Isolation bei -80°C gelagert.

3.1.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des innuPrep RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena). Dazu wurden etwa 1 x 10^6 bis 1 x 10^7 Zellen geerntet und die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zuletzt mit 30µl nukleasefreiem H₂O eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zum Schutz vor Kontaminationen mit RNasen wurden alle Arbeitsfläche mit RNase AWAY (Molecular BioProducts) gereinigt. Außerdem fanden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen Verwendung. Die Arbeiten mit RNA erfolgten stets auf Eis.

3.1.4 Isolation von Gesamt-RNA aus intestinalen Epithelzellen (IEC)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus IEC erfolgte nach Shimada et al.; (81). Das Kolon wurde dazu longitudinal geöffnet, in kaltem PBS gewaschen und 20min in 5ml HBSS mit 5mM EDTA bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension für eine Minute gevortext und 20min bei 2000g und 4°C zentrifugiert. Um die RNA zu isolieren wurde das Pellet in 1ml PeqGold Trifast (PeqLab) resuspendiert, mit 200µl Chlorophorm versetzt und nach einer 8-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, 15min bei 13400g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in Säulen des innuPREP RNA mini Kit (Anlaytik Jena) transferiert und die RNA nach Herstellerangaben isoliert.

3.1.5 Bestimmung der RNA und DNA Konzentration

Die Vermessung von DNA und RNA erfolgte mit dem Nanophotometer (Implen GmbH) bei einer Wellenlänge von 260nm. Dabei berechnet sich die Nukleinsäure Konzentration folgendermaßen:

> Konzentration $DNA = 50 \mu g/ml \times OD_{260} \times Verdünnungsfaktor$ Konzentration $RNA = 40 \mu g/ml \times OD_{260} \times Verdünnungsfaktor$

Außerdem gibt das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ Aufschluss über die RNA-Reinheit der Lösung. Ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 spricht für eine saubere Nukleinsäure Isolation.

3.1.6 Affymetrix GeneChip Microarray

Die Durchführung des Affymetrix GeneChip Microarray erfolgte durch das Kompetenzzentrum Fluoreszente Bioanalytik (BioPark Regensburg).

3.1.7 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (complementary DNA oder cDNA).

Für die reverse Transkription wurde pro Ansatz 1µg der isolierten Gesamt-RNA aus Zellen (siehe 3.1.3) in 16,75µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Nach der Zugabe von 1µl Oligo(dT)₁₅ Primer (0,5µg) wurde die Probe für 5min bei 70 °C denaturiert und für 5min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden dem RNA-Ansatz folgende Komponenten zugegeben:

RNA-Ansatz	17,75µl
M-MLV 5 x Reaction Buffer	5µ1
dNTP-Mix (10mM)	1,25µl
M-MLV RT (200 Units)	<u>1µ1</u>
	25µl

Die cDNA Synthese erfolgte für 1h bei 39°C und wurde anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 5min bei 70°C terminiert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -20°C.

3.1.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Hierfür wurde die benötigte Menge DNA mit nukleasefreiem H₂O auf ein Volumen von 14µl aufgefüllt und in einem PCR-Reaktionsgefäß mit folgendem Mastermix gemischt:

Mastermix für die Polymerase-Kettenreaktion:

10µl	RedTaq Ready Mix TM PCR Reaction	
	Mix (enthält 2x RedTaq Puffer mit	
	Ladepuffer, dNTPs, MgCl2 und RedTa	
	DNA Polymerase (Sigma-Aldrich)	
0,5µl	5'-Primer (10pmol/µl)	
0,5µ1	3'-Primer (10pmol/µl)	

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm in einem PCR-Cycler:

	Programm für eine PCR	
1x	Initiale Denaturierung	94°C 3min
35x	Denaturierung	94°C 30s
	Primer-Annealing	54-60°C 30s
	Elongation	72°C 1min/1kb
1x	Finale Elongation	72°C 5min

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel (siehe 3.1.9) analysiert.

3.1.9 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Agarosegelen. Je nach Größe der zu trennenden DNA wurden 1 bis 1,5%ige Agarosegele verwendet. Zur Färbung der DNA wurde GelRed, ein interkalierender Farbstoff, verwendet. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit einem Auftragspuffer (6x Loading Dye) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Standard mit definierten Größen aufgetragen (100bp bzw. 1kb DNA-Ladder, NEB). Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer elektrischen Spannung von 5-10V/cm Gellänge bis zum gewünschten Auftrennungsgrad. Anschließend erfolgte die Geldokumentation mittels UV-Licht.

3.1.10 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung und damit der RNA-Expressionsanalyse bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende jedes PCR-Zyklus ermöglicht. Dazu werden Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. SYBR-Green genutzt. Dieser bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und emittiert durch Anregung bei 498 nm Licht mit der Wellenlänge 522 nm. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Für die quantitative Real Time PCR wurde der TakyonTM Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP verwendet, der bereits Puffer, DNA-Polymerase, dNTPs und den SYBR Green-Farbstoff beinhaltet. Die Proben wurden als Duplikate in 384-Well-Platten pipettiert und im QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System vermessen. Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

cDNA (70 ng)	4µ1
5'-Primer (5 pmol/µl)	0,5µl
3'-Primer (5 pmol/µl)	0,5µl
Takyon TM Low ROX SYBR 2X MasterM	<u>5µl</u>
	10µ1

Die Reaktion wurde mit folgender Programmierung des PCR-Gerätes durchgeführt:

		Temperatur	Zeit
1. Schritt	Denaturierung	95 °C	10 min
2. Schritt	Denaturierung	95 °C	15 s
(40 Zyklen)	Primer-Annealing und Elongation	60 °C	1 min
3. Schritt	Termination	95 °C	1 min
4. Schritt	Vorbereitung Schmelzkurve	60 °C	1 min
5. Schritt	Schmelzkurve	60 °C-95 °C	
	(in 0,075 °C/s Schritten)		

In der RT-PCR wird als Maß für die Quantifizierung der Startmenge der sog. CT Wert (threshold cycle) herangezogen. Der C_T-Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, die für ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht werden müssen, d.h. der Punkt, ab dem sich die Fluoreszenz signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Am C_T befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Je mehr Startkopien in die PCR eingebracht wurden, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Eine höhere Ausgangsmenge an cDNA und somit mRNA ergibt demnach einen früheren C_T-Wert. Um die relative cDNA Menge pro Probe bestimmen zu können, wird die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen, das sogenannte housekeeper Gen. Außerdem legt man innerhalb der getesteten Proben einen Kalibrator fest, der als 1 definiert wird und in dieser Arbeit unstimulierte Zellen darstellt. Die Expression des Zielgens wird schließlich als Zu- oder Abnahme relativ zum Kalibrator angegeben. Die Expression der untersuchten RNA kann nun mittels der ΔC_T Methode relativ zur Expression des housekeeping Gens berechnet werden. Die Spezifische Amplifikation wurde über die Schmelzkurve am PCR-Cycler verifiziert.

3.1.11 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktionsverdaue wurden Enzyme der Firma New England Biolabs verwendet. Dazu wurden jeweils 1U der entsprechenden Enzyme und 5µl des vom Hersteller empfohlenen Puffers zusammen mit 1µg DNA mit nukleasefreiem H₂O auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Anschließend konnten die verdauten DNA-Proben in einem Agarosegel aufgetrennt und gereinigt werden (3.1.9).

3.1.12 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (3.1.9). Die entsprechenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 312nm ausgeschnitten. Die Isolation von PCR-Produkten bzw. restriktionsverdauter DNA erfolgte anschließend mittels PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben.

3.1.13 Ligation

Der Ligationsansatz enthielt neben 14,5µl des gewünschten DNA-Fragments und 2µl des Zielvektors noch 1,5µl T4 DNA Ligase und 2µl 10x T4 Ligase Puffer (New England Biolabs). Die Reaktion fand für 2h bei RT statt. Das Produkt der Ligation wurde anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

3.1.14 Transformation

Zu 50µl kompetenter *E. coli* DH5α wurden jeweils 1µl DNA aus einer Plasmid-Präparation oder 20µl eines Ligationsansatzes gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach 30s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad wurden die Bakterien 5min auf Eis gehalten, bevor die Zugabe von 300µl vorgewärmten SOC Medium erfolgte. Die Bakterien wurden für 45min bei 37°C schüttelnd inkubiert, ehe 100µl des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit 200µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C vermehrt wurden.

3.1.15 Bakterienkultur

Nach der Transformation gewachsene Bakterienkolonien wurden in frisches LB-Medium mit 200µg/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C und 220rpm geschüttelt. Im Anschluss konnte die Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt werden.

Material und Methoden

3.1.16 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α erfolgte mit dem PureLink Quick Mini Kit oder dem PureLink Plasmid Midi Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben.

3.1.17 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Sequenzierungen wurden von GeneArt (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 300ng DNA sowie 1 μ l Primer (10 μ M) verwendet und auf 8 μ l Gesamtvolumen mit nukleasefreiem H₂O eingestellt. Die verwendeten Sequenzierprimer sind unter (2.7) aufgelistet.

3.1.18 Mikrobiom-Analyse mittels Next-Generation-Sequencing

Nachdem die genomische DNA aus Kotproben von Mäusen isoliert wurde (3.1.2), erfolgte die Klassifizierung der Bakterien durch Amplifikation spezifischer Regionen in der 16S ribosomalen RNA mittels des Illumina MiSeq. Die Klassifizierung erfolgte anhand einer Datenbak mit 16S rRNA Daten. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Wulf Schneider (Krankenhaushygiene und Infektiologie, Universitätsklinikum Regensburg).

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Isolation von Proteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden 3 x 10⁶ Zellen bei 300g und 4°C für 7min geerntet und anschließend in 50µl RIPA-Puffer lysiert, dem zuvor ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) laut Herstellerangaben hinzugefügt wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zelllysate bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCATM Protein Assay Kit von Pierce (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die dabei entstandene Farbreaktion wurde am Nanophotometer (Implen) bei einer OD₅₄₀ vermessen.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenauftrennung denaturierter Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher, eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Dabei wird durch gebundenes SDS die Eigenladung der Proteine maskiert und die Auftrennung nach deren Molekulargewicht ermöglicht.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN[®] Electrophoresis System (Bio-Rad) verwendet und Gele mit einer Konzentration von 4% Acrylamid/Bisacrylamid im Sammelgel und 10% Acrylamid/Bisacrylamid im Trenngel gegossen.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proteinproben mit 4x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5min bei 95°C aufgekocht. Zur späteren Kontrolle der Proteingröße wurden neben den Proben stets 3µl des Proteinstandards Protein Marker VI (AppliChem, Darmstadt) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 180V und 40mA für ca. 1h in der Elektrophoresekammer Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad).

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit der Western-Blot-Technik (3.2.4) auf eine PVDF-Membran transferiert.

3.2.4 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die aufgetrennten Proteine auf dem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendiflourid (PVDF)-Membran ImmobilonTM (Millipore) transferiert.

Für den Proteintransfer kam das sogenannte SemiDry-Verfahren zum Einsatz. Hierfür wurden 6 Whatman-Papiere und die PVDF-Membran zunächst auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Anschließend wurde die PVDF-Membran zur Hydrophilisierung für je 2min in Methanol und Wasser geschwenkt. Die Whatman[®]-Papiere, das SDS-Gel sowie die PVDF-Membran wurden in Blotpuffer äquilibriert und abschließend der Western-Blot auf der Blot-Apparatur Fast Blot (Biometra) aufgebaut. Hierfür wurden 3 Whatman[®]-Papiere, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und weitere 3 Whatman[®]-Papiere blasenfrei aufeinandergelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 60min bei einer Spannung von 1mA pro cm².

Anschließend konnten über die Bindung von spezifischen Antikörpern Proteine auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst für 3h bei RT in 5% BSA/TBS-T geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung Antikörper in BSA/TBS-T inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit TBS-T wurde der sekundäre Antikörper, an den das Enzym Meerrettich-

Peroxidase (HRP) kovalent gebunden war, in BSA/TBS-T für 1,5h bei RT zugegeben. Abschließend erfolgten drei zehnminütige Waschschritte mit BSA/TBS-T ehe das Signal mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen wurde. Dazu wurde die Membran für 1min im ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), welches das Substrat für die Peroxidase enthält, nach Angabe des Herstellers geschwenkt. Die Detektion des Signals erfolgte mit Hilfe des Fusion Puls TS (Vilber). Die Expositionslänge richtete sich nach der Stärke des Signals.

3.2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mittels eines ELISAs ist es möglich geringe Antikörper- oder Antigenkonzentrationen in Lösungen wie Seren oder Zellkulturüberständen nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde das System des "Sandwich-ELISAs" verwendet. Hierfür werden sogenannte "Fang"-Antikörper an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden, die anschließend das zu detektierende Antigen, z.B. ein Zytokin, aus der Probenlösung binden und dabei aufkonzentrieren. Anschließend können unspezifische Antigene weggewaschen werden. Danach erfolgt die Zugabe eines zweiten Detektions-Antikörpers, der ein anderes Epitop des gleichen Antigens erkennt. Die Auswertung eines ELISA erfolgt mit Hilfe einer Enzymreaktion, die auf der Meerrettich-Peroxidase (HRP) beruht. Das Enzym wird über eine Biotin-Streptavidin-Bindung zugegeben. Bei der anschließenden Inkubation mit einem chromogenen Substrat wird dieses umgesetzt und die resultierende Farbreaktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden. Hierzu wurde der Tecan Spark 10M (Tecan) verwendet.

In dieser Arbeit kamen zur Detektion von Zytokinen in Zellkulturüberständen verschiedene ELISA Duo Sets der Firma R&D Systems zum Einsatz (TNF, CXCL-2). Die Proben wurden unverdünnt oder falls notwendig entsprechend verdünnt eingesetzt. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.6 Luciferase Assay

Zur Untersuchung der Expression von Genen und deren Regulation wurde ein Luciferase Assay durchgeführt. Dazu liegt der zu untersuchende Promotor vor einem sogenannten Reportergen (wie Firefly-Luciferase), dessen Proteinaktivität leicht nachzuweisen ist. Die Aktivität des Proteins ist dabei proportional zur Aktivität des Promotors. Der Assay basiert auf der Enzym-katalysierten Chemilumineszenz, wobei das Firefly-Luciferaseenzym die oxidative Decarboxylierung von Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Mg-Ionen katalysiert. Die Lichtemission, die bei 562nm gemessen wird, hängt von der Konzentration der Luciferaseenzyme ab und ermöglicht die quantitative Bestimmung des Expressionslevels des Reportergens.

Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte unter Verwendung des Luciferase Reporter Assay Systems der Firma Promega. Nach stabiler Transfektion (siehe 3.2.10) und Stimulation (3.2.12) wurden die CMT-93, A549 oder THP-1 Zellen geerntet und die Aktivität der Firefly-Luciferase mit dem Luminometer Glomax[™] (Promega) gemessen. Die Aufbereitung der Zellen und die Durchführung des Luciferase Assays fanden nach Angaben des Herstellers statt.

3.2.7 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden stets unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien unter der Sterilbank HERAsafe[®] 2030i (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien und Primärzellkulturen wurden mit den entsprechenden Medien bei einer Temperatur von 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% im Begasungsbrutschrank HERAcell 240i (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Die Zelllinien wurden zwei- bis dreimal wöchentlich je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 geteilt. Hierfür wurden adhärente Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen gelöst und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 300g für 5min bei RT zentrifugiert und das Zellpellet in der benötigten Lösung resuspendiert. Um Zellkulturüberstände zu gewinnen, wurden die Zellen bei 3200g für 10min und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet verworfen.

3.2.8 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden diese für 5min bei 300g und 4°C pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1 x 10⁶ Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50% RPMI 1640, 40% FKS und 10% DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu je 1ml in Kryoröhrchen überführt und in einem Mr. FrostyTM Freezing Container (Thermo Fisher Scientific) bei -80°C tiefgefroren. Nach einigen Tagen wurden die so behandelten Zellen in den Stickstofftank überführt und aufbewahrt.

Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryoröhrchen der gewünschten Zelllinie im 37°C-Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit kaltem Medium pipettiert. Nach einem Waschschritt mit Medium zur Entfernung des giftigen DMSO wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

3.2.9 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einer Neubauer-Zählkammer (Brand) mikroskopisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen zumeist in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblaulösung verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Tote Zellen wurden dabei blau gefärbt. Die Zahl an lebenden Zellen, welche nicht durch Trypanblaulösung angefärbt waren, wurde mikroskopisch ermittelt. Ausgezählt wurden vier große Quadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten, ein Mittelwert gebildet und die Zellkonzentration nach folgender Formel bestimmt:

Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl/ml

3.2.10 Stabile Transfektion

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz Metafectene (CMT-93, THP-1) oder Lipofectamin LTX (A549) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden die Zellen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 4 x 10⁵ Zellen pro Well in 2ml Medium kultiviert und über Nacht im Brutschrank HERAcell 240i (Thermo Fisher Scientific) zum Adhärieren inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach einem Mediumwechsel die Transfektion der Zellen mit 2µg DNA durchgeführt. Das Medium wurde 4h nach der Transfektion erneuert. Zur Selektion der Zellen wurde das Medium 24h nach der Transfektion durch ein Antibiotikum-haltiges Medium ersetzt.

3.2.11 Generierung von humanen peripheral blood-derived macrophages (PBM)

Die Elutration von peripherer mononukleäre Blutzellen (PBMC) sowie die Reifung zu primären humanen peripheren Blutmakrophagen (*peripheral blood-derived macrophages*, PBM) wurde freundlicherweise mit der Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz (Molekulare Onkologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

3.2.12 Stimulierungen

Für Stimulierungen in 12-Well-Platten wurden 3 x 10^5 Zellen pro Well in 1ml ausgesät, für Stimulierungen in 96-Well-Platten wurden 1 x 10^4 Zellen in 100μ l ausgesät. Nach Ruhen der Zellen über Nacht wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

3.2.12.1 Stimulierung mit kurzkettigen Fettsäuren

Die Stimulierung von CMT-93, THP-1 und A549 Zellen erfolgte für 48h bzw. 24h bei PBMs, wobei CMT-93 und A549 Zellen mit 10mM und THP-1 Zellen und PBMs mit 5mM Natrium Acetat, Natrium Butyrat oder Natrium Propionat stimuliert wurden.

3.2.12.2 Induktion einer Kreuztoleranz in vitro

Zur Untersuchung der Rolle von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) in der Kreuztoleranz *in vitro*, wurden Zellen mit SCFA (siehe 3.2.12.1) oder dem IFNAR2-Liganden RO8191 vorstimuliert und anschließend mit einem TLR-Liganden restimuliert. Die niedermolekulare Verbindung RO8191 wurde in einer Konzentration von 10µM eingesetzt.

Als Kontrolle wurden CMT-93, A549 und THP-1 Zellen 48h mit 200ng/ml LPS oder 50ng/ml Pam3CSK4 vorstimuliert. PBM wurden 24h entweder mit 0,1ng/ml LPS oder 10ng/ml Pam3CSK4 vorstimuliert.

Nach einem Waschschritt mit PBS wurden die Zellen mit verschiedenen TLR-Liganden, wie 1µg/ml LPS für CMT-93, THP-1 und A549 Zellen bzw. 1ng/ml für PBM oder 250ng/ml bzw. 50µg/ml Pam3CSK4, für weitere 2h (CMT-93, A549, THP1-Zellen) oder 4h (PBM) restimuliert. Bis zur Durchführung eines entsprechenden ELISA (3.2.5) wurden die Überstände bei -20°C gelagert. Zur Lyse der Zellen werden diese einmal mit PBS gewaschen, anschließend in RLT Puffer (Analytik Jena) lysiert und bis zur RNA Isolation bei -80°C weggefroren.

3.2.12.3 Einsatz verschiedener Inhibitoren

Für eine differenzierte Analyse möglicher Signalmechanismen von SCFA kamen unterschiedliche Inhibitoren zum Einsatz.

Zur Inhibierung der Signalweiterleitung über G Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde zum einen das Pertussis Toxin (PTX) (List Biological Laboratories) verwendet und zum anderen YM-254890 (Biomol). PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Einheit des G_{i/o}-Protein-Komplexes und unterbindet somit dessen Anlagerung an den Rezeptor (Burns 1988). YM-254890 ist ein selektiver Inhibitor des $G_{q/11}$ -vermittelten Signalwegs. Die Zellen wurden 2h mit 100ng/ml PTX oder 15min mit 1 μ M YM-254890 vorinkubiert, gewaschen und wie unter 3.2.12.1 stimuliert.

Ein anderer Inhibitor in dieser Arbeit war Ruxolitinib, ein selektiver Inhibitor für JAK1/2. Die Zellen wurden mit 1μ M für 1h vorinkubiert und daraufhin wie unter 3.2.12.1 stimuliert.

3.2.13 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Charakterisierung einzelner Zellen in Zellsuspensionen. Die Zellen werden hierfür separat in einem Flüssigkeitsstrom an Lasern vorbeigeleitet. Durch das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward scatter) kann eine Aussage über die Größe, durch das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side scatter) über die Granularität der Zellen getroffen werden. Auch Oberflächeneigenschaften sowie die intrazelluläre Zusammensetzung einzelner Zellen können durch Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenund intrazellulären Strukturen charakterisiert werden. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Laserstrahl führt dabei zur Emission einer bestimmten Wellenlänge. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff erhält man somit ein spezifisches Signal.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurde an einem BD FACSCelestaTM oder an einem BD FACSymphonyTM A5 SORP Durchflusszytometer (BD Biosciences) durchgeführt. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo.

Die Antikörperfärbung wurde mit entsprechender Verdünnung in 96-Well Rundboden Platten durchgeführt. Das Färbevolumen betrug 50µl und gewaschen wurden die Zellen nach der Färbung zweimal mit FACS-Puffer.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Tierhaltung

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend den Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12h Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*.

3.3.2 Organentnahmen

Für eine Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Vor dem Öffnen des Bauchraums, wurden die Tiere mit 70% igem Ethanol desinfiziert und anschließend das Kolon entfernt und für weitere Analysen (siehe 3.1.2 und 3.1.4) prozessiert.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Immunhistochemische Färbung

Das zu untersuchende Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und Schnitte mit 3µm Dicke angefertigt. Die immunhistochemische Färbung wurde mit Hilfe des Institutes für Pathologie (Prof. Dr. Matthias Evert, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

3.5 Infektion mit VSV basierten Replikon Partikel

3.5.1 VSV*ΔG(Luc)-Replikon Partikel

Das rekombinante VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel basiert auf dem *Vesikulären Stomatitis-Virus* (einzelsträngiger RNA Virus) und kodiert für die *firefly* Luciferase und das *enhanced greenfluorescent protein* (GFP). Über diese zwei Reportergene ist eine Quantifizierung der Virusinfektion möglich. Außerdem fehlt dem VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel das Glykoprotein (G)-Gen. Somit können die die entsprechenden Zielzellen nur einmal infizieren und es werden keine infektiösen VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel neu produziert. Die VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel wurden freundlicherweise von PD Dr. Gert Zimmer (Institut für Virologie und Immunologie, Universität Bern) zur Verfügung gestellt.

3.5.2 Infektion mit dem VSV*\DG(Luc)-Replikon

Für eine Analyse des Einflusses von SCFA auf eine Virusinfektion wurden Zellen mit dem rekombinante VSV* Δ G(Luc)-Replikon infiziert. Vor der Infektion wurden 4 x 10⁴ Zellen in eine Incucyte ImageLock 96-Well Platte ausgesät und die Zellen wie in 3.2.12.1 beschrieben stimuliert. Als positiv Kontrolle diente 10U/ml IFN Typ I. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Verhältnis von Zelle zu Partikel von 1:5 (MOI=5) in einem Volumen von 40µl infiziert. Nach 1h Inkubationszeit wurden 60µl des entsprechendem Medium zugegeben und die Infektion für 24h mit Hilfe des Incucyte-Systems analysiert. Hier wurden stündlich Fotos über 2 verschiedene Kanäle aufgenommen:

Phasenkontrast Filter und Fluoreszenz Filter (400-480nm) zur Detektion des GFP Reportergens. Nach 24h wurden die Zellen in einem Luciferase Assay (3.2.6) analysiert.

3.6 Statistik

Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 7 unter Verwendung des *Mann-Whitney-U-Tests*. Die Ergebnisse aus Experimenten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben und Werte von p < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet.

Aufbauend auf vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von bakteriellen Metaboliten, insbesondere der SCFA, auf die angeborene Immunreaktion zu untersuchen. Hierbei gliedert sich die Arbeit in drei Hauptteile.

1) In der hReg3 α transgenen Mauslinie, welche das humane antimikrobielle Peptid hReg3 α in einer Vielzahl von Geweben und Organen überexprimiert, wurde mittels 16S rRNA Sequenzierung und Phyla-spezifischer quantitativer RT-PCR eine Veränderung in der mikrobiellen Diversität des Darmmikrobioms festgestellt. Durch die transgene Expression von hReg3 α kommt es zu einer Abnahme der gram-positiven Phyla der *Firmicutes* und zur Zunahme der gram-negativen Phyla der *Verrucomicrobia*. Diese Veränderung in der mikrobiellen Diversität korreliert mit veränderten Konzentrationen an bakteriellen Metaboliten in den hReg3 α transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp Tieren. In den transgenen Mäusen kam es zu einer erhöhten Expression von *interferon stimualted genes* (ISG). Ob diese veränderte Genexpression in Zusammenhang mit den veränderten Mengen an SCFA steht und welche Auswirkungen die veränderte Genexpression auf den Organismus hat, wurde in verschiedenen *in vitro* Experimenten untersucht.

2) Die Stimulation von Epithelzellen, monozytärer Zellen und Makrophagen mit Butyrat und Propionat führte zu einer Induktion der Expression der IFIT-Genfamilie. Es wurden die Auswirkungen dieser Genexpression auf verschiedene Zellen untersucht. Die Induktion der Genexpression von ISG durch Propionat läuft über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor FFAR2/G $\alpha_{q/11}$ -Signalweg in einer IFN-abhängigen Weise. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit der kurzkettigen Fettsäure Propionat und der dadurch resultierenden Genexpression, eine Toleranz gegenüber TLR4 (LPS) und TLR1/2 (Pam3CSK4) induziert werden kann. Die IFIT Genfamilie, die über Propionat induziert werden kann, scheint in der Regulation der proinflammatorischen Zytokinantwort beteiligt zu sein.

3) Sowohl in Epithelzellen als auch in monozytären Zellen und Makrophagen wurde eine antivirale Aktivität durch die Stimulation mit Propionat festgestellt. Wie oben erwähnt induziert die Behandlung mit Propionat die Expression von ISG. Neben den bereits beschriebenen IFIT Genfamilie werden weiter Gene wie ISG15, MX1 oder OASL2 erhöht exprimiert. All diese Gene sind bekannt für ihre antivirale Wirkung. In einem Modelsystem wurde die antivirale Wirkung von Propionat untersucht und nachgewiesen. Nach der

Infektion mit VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikeln, war eine signifikant geringere Virusinfektion in Zellen, die mit Propionat vorbehandelt wurden gemessen.

4.1 Charakterisierung der hReg3a transgenen Mauslinie

Eine wichtige Funktion der Reg3-Proteine zur Aufrechterhaltung der Darmbarriere ist die Abwehr gegen Mikroorganismen. Die Expression des anitmikrobiellen Peptids hReg3 α und des Orthologs der Maus mReg3 γ , wird unter anderem induziert durch bakterielle Besiedlung oder entzündliche Darmerkrankungen (82). Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hehlgans (RCI, Regensburg) hat eine transgene Mauslinie generiert, die humanes Reg3 α ubiquitär überexprimiert.

4.1.1 Nachweis der hReg3α Expression auf Proteinebene in Darmepithelzellen von hReg3α transgenen Mäusen

Humane Reg3 α transgene Mäuse exprimieren hReg3 α in einer Vielzahl von Organen und Geweben auf RNA Ebene (Daten nicht gezeigt). Um die Expression von hReg3 α auf Proteinebene nachzuweisen wurden Epithelzellen aus hReg3 α transgenen Mäusen immunhistochemisch auf die Expression von hReg3 α untersucht und mit entsprechenden Proben aus Wildtyp Mäusen (WT) verglichen. Die immunhistochemische Analyse von Dickdarmschnitten zeigt eine deutliche Expression von hReg3 α in den transgenen Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (Abbildung 5).



Abbildung 5: Immunhistochemische Untersuchung der hReg3α Expression im Dickdarm von Reg3α transgenen Mäusen.

Anti-hReg3α-Färbung in Paraffinschnitten des Dickdarms von einer hReg3α transgenen Maus im Vergleich zu einer Wildtyp Maus. Nach Entnahme der Gewebeproben wurde das Gewebe in Paraffin konserviert. Anschließend erfolgte die Anfertigung von 3µm Schnitten und eine Färbung mit einem anti-hReg3α-Antikörper. Die Signalentwicklung (braune Färbung) erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau angefärbt. Vergrößerung 160x.

4.1.2 Veränderte mikrobielle Diversität in hReg3α transgenen Mäusen

Interessanterweise wurde festgestellt, dass die transgenen Mäuse durch die Expression von hReg3α ein verändertes Mikrobiom im Vergleich zu Wildtyp Mäusen aufweisen. Sowohl mittels quantitativer RT-PCR (Abbildung 6), als auch mittels *Next Generation Sequencing* (in Kooperation mit Prof. Dr. Wulf Schneider, Lehrstuhl für Krankenhaushygiene,

Universitätsklinikum Regensburg) konnte eine Veränderung in der Zusammensetzung der bakteriellen Diversität (auf Ebene der bakteriellen Phyla) detektiert werden. Die Mitglieder der Reg III Familie binden an Peptidoglykan und wirken dadurch antimikrobiell spezifisch gegen gram-positive Bakterien (45, 83). In den transgenen Mäusen scheint es durch die Überexpression von hReg3α zu einer signifikanten Abnahme des gram-positiven Stammes der *Firmicutes* (Abbildung 6 A) und zu einer signifikanten Zunahme des gram-negativen Stammes der *Verrucomicrobia* (Abbildung 6 B) zu kommen.



Abbildung 6: Veränderte mikrobielle Diversität in hReg3atg Mäusen verglichen zu Wildtyp Mäusen. Aus dem Dickdarm von hReg3a transgenen (hReg3atg) Mäusen und Wildtyp Mäusen wurde Kot entnommen und daraus die gDNA isoliert. Der Nachweis der bakteriellen Phyla (A) *Firmicutes* und (B) *Verrucomicrobia* erfolgte mittel quantitativer PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Wildtyp Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Auch mittels 16S rRNA Sequenzierung (Illumina MiSeq), konnte gezeigt werden, dass der Stamm der gram-positiven *Firmicutes* (Abbildung 7 A) abnimmt, während es zu einer Zunahme des Stammes der gram-negativen *Verrucomicrobia* (Abbildung 7 B) kommt. Die Menge der gram-negativen *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* ist in den Wildtyp Mäusen und hReg3α transgenen Mäusen unverändert. Unter Sonstige fallen z.B. *Defferibacteres*, *Tenericutes* oder *Cyanobacteria*.



Abbildung 7: Wildtyp Mäuse und hReg3α transgene Mäuse zeigen eine veränderte Zusammensetzung der Darmmikrobiota.

Zusammensetzung der Darmmikrobiota von Stuhlproben aus (A) Wildtyp Mäusen und (B) hReg 3α transgenen Mäusen, wurde mittels 16S rRNA Sequenzierung analysiert. Die Kreisdiagramme zeigen die Verteilung auf Phylum-Ebene. Es wurden die Daten von je zehn Mäusen gemittelt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente.

4.1.3 Erhöhte Expression von Interferon stimulierten Genen (ISG) in primären intestinalen Epithelzellen von hReg3αtg Mäusen

Aus dem Dickdarm transgener hReg 3α Mäusen sowie aus Wildtyp Mäusen wurden intestinale Epithelzellen (IEC) isoliert, RNA präpariert und in Zusammenarbeit mit dem Kompetenzzetrum für Fluoreszente Bioanalytik, BioPark Regensburg mittels eines Affymetrix GeneChip Microarrays eine Expressionsanalyse erstellt. Das Ergebnis zeigt eine starke Induktion der Expression von ISG in hReg 3α transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Zum Beispiel konnte eine 15fach erhöhte Expression von Ifit1 in den hReg 3α tg Mäusen verglichen zu Wildtyp Mäusen detektiert werden. (Abbildung 8).



Abbildung 8: Genexpressionsanalyse von IEC aus hReg3αtg Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. RNA wurde aus intestinalen Epithelzellen von Wildtyp Mäusen und hReg3α transgenen Mäusen isoliert und eine Expressionsanalyse mittels eines Affymetrix GeneChip Microarrays durchgeführt. Die Abbildung zeigt zehn Gene, deren Expression am stärksten in den hReg3α transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen hochreguliert sind.

Um auszuschließen, dass die Induktion der ISG nicht durch eine Infektion der Reg 3α transgenen Mauslinie hervorgerufen ist, wurden mehrere "Sentinal" Mäuse der hReg 3α transgenen Mauslinie und der C57BL/6N Mauslinie aus der Zuchtbarriere bei Charles River nach FELASA Protokoll auf bakterielle und virale Infektionen untersucht. Alle Mäuse waren negativ auf die getesteten Erreger.

Um die in der Expressionsanalyse erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Expression einzelner ISG in IEC mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Sowohl die Expression aller Mitglieder der murinen IFIT-Genfamilie (Ifit1, Ifit2, Ifit3) als auch weiterer ISGs, wie Isg15 und Oasl2 ist in den IECs der hReg3αtg Mäusen, verglichen zu der Expression in den IECs der Wildtyp Mäusen, signifikant erhöht (Abbildung 9).



Abbildung 9: ISG Expression in intestinalen Epithelzellen transgener hReg3 α Mäuse. Die RNA Intestinaler Epithelzellen wurden aus dem Kolon von transgenen hReg3 α Mäusen und Wildtyp Mäusen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis der (A) Ifit1 mRNA (B) Iift2 mRNA (C) Ifit3 mRNA (D) Isg15 mRNA und (E) Oasl2 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Wildtyp Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Interessanterweise konnte in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass die veränderte mikrobielle Diversität in den hReg3α transgenen Tieren einher geht mit Veränderungen in den Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von Acetat und Butyrat im Dickdarm von hReg3α transgenen Mäusen reduziert ist im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Demgegenüber ist die Propionat Konzentration im Darm der hReg3α transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen stark erhöht (Daten nicht gezeigt).

4.2 Induktion von ISG und deren Auswirkung auf das angeborene Immunsystem

Um herauszufinden in wie weit kurzkettige Fettsäuren (SCFA) in der Lage sind die Expression von ISG zu induzieren wurden humane und murine Epithelzellen und Makrophagen mit Acetat, Propionat und Butyrat stimuliert und die Expression von ISG analysiert.

4.2.1 Kurzkettige Fettsäuren induzieren die Ifit-Genexpression in CMT-93 Zellen

Um den Einfluss von SCFA auf die Genexpression der Zellen des Dickdarms *in vitro* zu untersuchen, diente die murine intestinale Epithelzelllinie CMT-93.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, wird die Expression von Ifit1 (A), Ifit2 (B) und Ifit3 (C) in CMT-93 Zellen nach einer Stimulation mit Propionat signifikant induziert.



Abbildung 10: Kurzkettige Fettsäuren induzieren die Expression von Ifit1, Ifit2 und Ifit3. CMT-93 Zellen wurden 48h mit 10mM Natrium Acetat, Natrium Propionat oder Natrium Butyrat stimuliert. Der Nachweis der (A) Ifit1 mRNA (B) Ifft2 mRNA und (C) Ifit3 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Butyrat induziert ebenfalls die Ifit1 Expression in CMT-93 Zellen, wohingegen Acetat die Genexpression der Ifit-Familie kaum zu induzieren scheint. Wie bereits erwähnt, ist bekannt, dass die Expression der Ifit-Genfamilie durch IFN Typ III induziert werden kann.

Nun wurde der unmittelbare Einfluss von Propionat auf die Ifit1-Promotor-Aktivität im Reportergenassay und über eine FACS Analyse untersucht. CMT-93 Zellen wurden stabil mit dem Ifit1-Promotor Firefly-Luciferase/eGFP Plasmid transfiziert und 48h mit Propionat oder IFNλ stimuliert. Anschließend wurde einerseits die Aktivität der Luciferase, deren Bildung unter dem Einfluss des Ifit1-Promotors steht, und andererseits die GFP Expression ermittelt.



Abbildung 11: Einfluss von Propionat auf Ifit1-Reportergenaktivität in CMT-93 Zellen. CMT-93 Zellen wurden stabil mit dem Ifit1-Promotor Firefly-Luciferase/eGFP Plasmid transfiziert und 48h mit 10mM Natrium Propionat oder 1ng/ml IFN λ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen (A) auf eGFP Expression hin im FACS analysiert. (B) Anhand der eGFP Expression wurde die MFI bestimmt. (C) Die Zellen wurden nach Stimulation lysiert und auf ihre Luciferase-Aktivität hin untersucht. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die Stimulation mit Propionat führte, wie die Behandlung mit IFN λ , zur Ifit1-Promotoraktivierung und der daraus resultierenden signifikanten Erhöhung der eGFP Expression (Abbildung 11 A und B) und der Luciferase-Aktivität (Abbildung 11 C) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle.

4.2.2 Kurzkettige Fettsäuren induzieren die IFIT-Genexpression in A549 Zellen

Das Ergebnis, dass die Expression bestimmter ISG (IFIT1-3) in murinen Zellen durch kurzkettige Fettsäuren induziert wird, sollte auch unter Verwendung von humanen Zellen getestet werden. Hierfür wurde die humane Lungenepithelzelllinie A549 verwendet. Bislang

konnte die Induktion humaner ISGs nur nach Stimulation mit IFN und PAMP oder durch Virus Infektionen gezeigt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der humanen A549 Zelllinie mit Propionat und Butyrat die Expression eines ISRE-Luciferase-Reportergens induziert. Dies konnte für die Stimulierung mit Acetat nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12). Diese Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung des IFN-induzierten JAK/STAT-Signalwegs in diesen Zellen hin. IFN initiiert eine Signalkaskade, die zur Induktion einer Untergruppe von Genen führt, die als ISG bezeichnet werden. Diese Induktion wird durch ein spezifisches DNA-bindendes Element vermittelt, das als *IFNstimulated response element* (ISRE) bezeichnet wird (84).



Abbildung 12:Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren auf ISRE-Reportergenaktivität in A549 Zellen. A549 Zellen wurden stabil mit dem ISRE-IFN α/β -Reporter transfiziert und für 48h mit kurzkettigen Fettsäuren stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf ihr Reportergenaktivität mittels Luciferase Assay untersucht. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Darüber hinaus wurde die Expression von IFIT1 und IFIT2 nach Propionat Behandlung in A549 Zellen signifikant induziert (Abbildung 13 A und B). Im Gegensatz dazu scheint Propionat die IFIT3 Expression auf mRNA Ebene in A549 Zellen nicht zu induzieren (Abbildung 13 C).

Ergebnisse



Abbildung 13: Induktion der IFIT Expression nach Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren in A549 Zellen. A549 Zellen wurden 48h mit Natrium Acetat, Natrium Propionat oder Natrium Butyrat stimuliert. Der Nachweis der (A) IFIT1 mRNA (B) IFIT2 mRNA und (C) IFIT3 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angeschen. (D) Western-Blot-Analyse der IFIT1-Proteinexpression in A549 Zellen nach 16-stündiger Propionat-Behandlung. Als interne Ladekontrolle diente β -Actin. Die Daten sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Um die IFIT1 Proteinexpression in den humanen Epithelzellen zu untersuchen, wurde ein monoklonales Antiserum gegen humanes IFIT1 verwendet und die IFIT1 Expression nach Propionat Behandlung analysiert. Propionat führt zu einer Induktion der IFIT1 Expression auch auf Proteinebene in A549 Zellen (Abbildung 13 D), was die Ergebnisse der mRNA Expressionsanalyse bestätigt.

4.2.3 Kurzkettige Fettsäuren induzieren die IFIT-Genexpression in THP-1 Zellen

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch THP-1 Zellen, eine humane monozytäre Zelllinie, nach Propionat Stimulation IFIT1, IFIT2 und IFIT3 hochregulieren. Nach einer Behandlung mit Butyrat induzierten die Zellen IFIT1 wohingegen Acetat in den THP-1 Zellen keine IFIT Expression induziert. Die Induktion der IFIT1 Expression durch Propionat konnte nicht nur auf mRNA Ebene gezeigt werden (Abbildung 14 A-C) sondern auch auf Proteinebene. Mittels eines monoklonalen Antiserums gegen humanes IFIT1 konnte eine Induktion der IFIT1 Expression nach Stimulierung mit Propionat detektiert werden (Abbildung 14 D).



Abbildung 14: Induktion der IFIT Expression nach Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren in THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden 48h mit 5mM Natrium Acetat, Natrium Propionat oder Natrium Butyrat stimuliert. Der Nachweis der (A) IFIT1 mRNA (B) IFIT2 mRNA und (C) IFIT3 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angeschen. (D) Western-Blot-Analyse der IFIT1-Proteinexpression in THP-1 Zellen nach 16-stündiger Propionat-Behandlung. Als interne Ladekontrolle diente β -Actin.

Des Weitern konnte, wie in der Epithelzelllinie A549, gezeigt werden, dass Propionat die Expression eines ISRE-abhängigen Luciferase-Reportergens induziert, was auf eine Aktivierung des IFN-induzierten JAK/STAT-Signalwegs auch in diesen Zellen hinweist (Abbildung 15 A). Darüber hinaus induziert die Stimulation von THP-1 Zellen mit Propionat die Phosphorylierung von *Signal Transduced and Activator of Transcription 2* (STAT2), einem charakteristischen Signaltransduktor, der nach IFN Rezeptor Typ I- und Typ III-vermittelter Signalgebung durch rezeptorassoziierte Kinasen phosphoryliert wird (Abbildung 15 B) (85). Diese Daten unterstützen unsere Annahme, dass Propionat die IFIT Expression in einer IFN-abhängigen Weise in verschiedenen Zelltypen induziert.



Abbildung 15: Induktion der Ifit1 Expression durch Propionat ist IFN-abhängig.

(A) THP-1 Zellen wurden stabil mit dem ISRE-IFN α/β -Reporter transfiziert und für 48h mit 5mM Propionat stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf ihr Reportergenaktivität mittels Luciferase Assay untersucht. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. (B) Western-Blot-Analyse der phosphorylierten STAT2-Proteinexpression in THP-1 Zellen nach 16-stündiger Propionat-Behandlung. IFN Typ I diente als Positivkontrolle. Als interne Ladekontrolle diente β -Actin.

4.2.4 Kurzkettige Fettsäuren induzieren Typ I und Typ III IFN

Aus den bisher erhalten Daten stellt sich die Frage, in wie weit eine SCFA induzierte Expression von ISG über eine induzierte Expression von IFN Typ I und Typ III vermittelt wird. Dementsprechend wurden CMT-93 Zellen und A549 Zellen mit kurzkettigen Fettsäuren stimuliert und die Genexpression von IFN α und IFN λ und deren Rezeptoren analysiert. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass Propionat und Butyrat zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von IFN Typ III und dessen Rezeptor IL28RA in CMT-93 und A549 Zellen führt. Acetat hingegen konnte die IL28RA Expression in CMT-93 Zellen kaum induzieren (Abbildung 16).



Abbildung 16: Propionat und Butyrat induzieren Typ III IFN und dessen Rezeptor IL28RA. (A und B) CMT-93 Zellen und (C und D) A549 Zellen wurden 48h mit Natrium Acetat, Natrium Propionat oder Natrium Butyrat stimuliert. Der Nachweis der (A und C) IFN λ mRNA und (B und D) IL28RA mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

In THP-1 Zellen konnte die Induktion der Expression von IFNα nach Propionat Behandlung nachgewiesen werden. Acetat und Butyrat hingegen induzierten die Expression von IFN Type I nicht signifikant im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Abbildung 17).



Abbildung 17: Propionat induziert Type I IFN in THP-1 Zellen.

THP-1 Zellen wurden 48h mit Natrium Acetat, Natrium Propionat oder Natrium Butyrat stimuliert. Der Nachweis der IFN α mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.2.5 Kurzkettige Fettsäuren induzieren die IFIT-Genexpression in PBM

Um zu testen, ob auch primäre Zellen myeloischen Ursprungs die Expression von IFIT1, IFIT2 oder IFIT3 nach Behandlung mit kurzkettigen Fettsäuren hochregulieren, testeten wir primäre humane Makrophagen, die sieben Tage aus peripheren Blutmonozyten differenziert wurden (periphere Blutmakrophagen, PBM, Abbildung 18).



Abbildung 18: FACS Analyse von peripheren Blutmakrophagen.

Periphere Blutmonozyten wurden wie in 3.2.11 beschrieben generiert. An Tag 7 wurden die Makrophagen mittels FACS analysiert. Lebende, CD11b+ und HLA-DR+ Zellen wurden für weiter Stimulierungsexperiment eingesetzt.

Interessanterweise konnte die Induktion der IFIT1, IFIT2 und IFIT3 Expression nach Behandlung mit Propionat oder Butyrat auch in humanen peripheren Blutmakrophagen (PBM) gezeigt werden. Acetat hingegen induziert die IFIT Genexpression nicht (Abbildung 19).



Abbildung 19: Induktion der IFIT Expression nach Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren in PBM. PBM wurden 24h mit 5mM Natrium Acetat, Natrium Propionat oder Natrium Butyrat stimuliert. Der Nachweis der (A) IFIT1 mRNA (B) IFIT2 mRNA und (C) IFIT3 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.2.6 Kurzkettige Fettsäuren induzieren die Expression von ISG über den FFAR2/Gα_{q/11}-Signalweg in einer IFN-abhängigen Weise

Kurzkettige Fettsäuren binden an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren FFAR2 und FFAR3 und aktivieren diese. Sowohl FFAR2 als auch FFAR3 vermitteln eine G_i -gekoppelte Signalübertragung. FFAR2 Agonisten können außerdem selektiv die $G_{q/11}$ -vermittelte Signalübertragung aktivieren (78).

FFAR3 (Daten nicht gezeigt) und FFAR2 werden sowohl auf CMT-93, A549 und THP-1 Zellen als auch auf den PBM exprimiert (Abbildung 20).



Abbildung 20: FFAR2 Expression auf verschiedenen Zelltypen. Durchflusszytometrische Analyse von FFAR2 auf CMT-93, A549, THP-1 Zellen und PBM. Die FFAR2 Expression ist orange gekennzeichnet.

Außerdem zeigen die Daten, dass eine Behandlung der Zellen mit Propionat zu einer erhöhten FFAR2 Expression auf CMT-93, A549, THP-1 Zellen und PBM führt (Abbildung 21).



Abbildung 21: Propionat erhöht die FFAR2 Expression in verschiedenen Zelltypen. (A) CMT-93 Zellen, (B) A549 Zellen, (C) THP-1 Zellen oder (D) PBM wurden 48h mit 10mM (A und B) oder 5mM (C und D) Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis von FFAR2 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Über welchen Signalweg Propionat die Induktion der IFIT Expression vermittelt, konnte anhand spezifischer Inhibitoren der FFAR2- und FFAR3-Signalwege gezeigt werden. Wir fanden heraus, dass die Vorinkubation mit dem spezifischen $G\alpha_i$ -Signalweg-Inhibitor Pertussis Toxin (PTX), die IFIT1 Induktion durch Propionat nicht beeinflusst (Abbildung 22).



Abbildung 22: PTX beeinträchtigt die Propionat-induzierte IFIT1 Expression nicht. (A) CMT-93 Zellen, (B) A549 Zellen oder (C) THP-1 Zellen wurden 2h mit PTX vorstimuliert und anschließend 48h mit 10mM (A und B) oder 5mM (C) Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis von IFIT1 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Im Gegensatz dazu, konnte mittels des spezifischen $G\alpha_{q/11}$ -Siganlweg Inhibitors YM-254890 gezeigt werden, dass die durch Propionat induzierte IFIT1-Expression von dem

FFAR2-abhängigen, $G\alpha_{q/11}$ gekoppelten Signalweg abhängig zu sein scheint. Nach einer Vorstimulierung mit YM-254890 und anschließender Stimulation mit Propionat konnte die IFIT1 Expression in CMT-93 und A549 Zellen nicht induziert werde (Abbildung 23 A und B).



Abbildung 23: Die Propionat-induzierte IFIT1 Expression wird durch den Inhibitor YM-254890 gehemmt.
(A) CMT-93 Zellen und (B) A549 Zellen wurden 15min mit 1µM YM-254890 vorstimuliert und anschließend 48h mit 10mM Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis von IFIT1 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR.
(C) A549 Zellen wurden stabil mit dem NFAT-Luciferase Reportergen transfiziert, 15min mit 1µM YM-254890 vorinkubiert und anschließend für 48h mit 10mM Natrium Propionat stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf ihr Reportergenaktivität mittels Luciferase Assay untersucht. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe eines *Nuclear Factor of Activated T Cells* (NFAT)-Luciferase Reporter Assays verifiziert. Im $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Signalswegs, wird intrazelluläres Ca²⁺ mobilisiert, welches die Calcineurin Aktivierung fördert und die Dephosphorilierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NFAT zur Folge hat (86). In Abbildung 23 C ist zu sehen, dass die Aktivität des NFAT-Luciferase Reportergens in A549 Zellen nach Propionat Stimulation erhöht ist. Wie erwartet kommt es zu keiner Induktion der NFAT-abhängigen Reportergenaktivität durch Propionat nach Behandlung der A549 Zellen mit dem spezifischen $G\alpha_{q/11}$ -Signalweg Inhibitor YM-254890.

Die gezeigten Daten unterstützen die Annahme, dass die durch Propionat induzierte Expression von IFIT1 in CMT-93 und A549 Zellen über den FFAR2/G $\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Signalweg vermittelt wird.

Typ I und Typ III Interferone vermitteln intrazelluläre Signale, indem sie an ihre jeweiligen Rezeptoren binden und dadurch eine Phosphorylierung und Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs induzieren. Der IFNα Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2 und der IFNλ Rezeptor besteht aus IL28RA und IL10R. Basierend auf unseren

Daten, welche zeigen, dass die Stimulation von CMT-93 und A549 Zellen mit Propionat zu einer Induktion der Typ III IFN und dessen Rezeptor IL28RA führt (Abbildung 16), stellt sich die Frage, ob die Propionat induzierte IFIT1 Expression, von einer IFN-vermittelten Signalübertragung abhängig ist.

Aus diesem Grund wurden CMT-93 und A549 Zellen vor der Stimulation mit Propionat oder RO8191, einem spezifischen IFN-Rezeptor-2-Agonisten (87), mit Ruxolitinib, einem spezifischen JAK1/2 Tyrosinkinaseinhibitor behandelt (88). Wie Abbildung 24 A und B zeigen, wird die IFIT1 Expression signifikant nach einer Vorstimulation mit Ruxolitinib und anschließender Stimulation mit Propionat gehemmt. In Abbildung 24 C ist zu sehen, dass der spezifische IFNAR2 Agonist RO8191 die Induktion der IFIT1 Expression stark induziert, welche durch eine Vorbehandlung mit dem spezifischen JAK1/2 Tyrosinkinaseinhibitor Ruxolitinib vollständig gehemmt werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Propionat induzierte IFIT1 Expression in CMT-93 und A549 Zellen abhängig ist, von einer IFN vermittelten Signalgebung.



Abbildung 24: Die Propionat-induzierte IFIT1 Expression ist abhängig vom JAK/STAT Signalweg. (A) CMT-93 Zellen oder (B und C) A549 Zellen wurden 2h mit Ruxolitinib vorstimuliert und anschließend 48h entweder mit (A und B) 10mM Natrium Propionat oder (C) 10 μ M RO8191 stimuliert. Der Nachweis von IFIT1 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.3 Propionat induziert eine Kreuztoleranz in Epithelzellen und Makrophagen

Kommt es zu einer antiviralen Immunantwort, gehört die IFIT-Genfamilie zu den am stärksten induzierten ISG. Durch die Hemmung der Transkription von viralen Genen, kann die Replikation der Viren blockiert werden (89). Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass einige Mitglieder der IFIT-Genfamilie auch an der Regulation der
Entzündungsreaktion beteiligt zu sein scheinen (90, 91). Ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin ist in diesem Zusammenhang *Tumor Necrosis Factor* (TNF) oder das Chemokin *Macrophage inflammatory protein 2* (MIP-2/CXCL-2/GRO). Die Expression der beiden Gene wird unter anderen durch TLR1/2 und TLR4 Agonisten induziert, wobei TNF ein breites Spektrum biologischer Vorgänge reguliert, welche den Verlauf und die Stärke einer Entzündungsreaktion bestimmen. CXCL-2 wird unter anderem von Zellen des Darmepithels exprimiert und wirkt chemotaktisch für Neutrophile (92).

4.3.1 Propionat induziert eine Kreuztoleranz

Da wir bereits zeigen konnten, dass Propionat die Expression von Genen der IFIT-Familie induziert, sollte nun überprüft werden, ob die durch Propionat induzierte IFIT-Expression die Entzündungsreaktion in verschiedenen Zelllinien reguliert.

Nach Stimulation von murinen CMT-93 Zellen mit dem TLR4-Agonisten LPS (Abbildung 25 A und B) oder mit Pam3CSK4, einem spezifischen Agonisten für TLR1/2 (Abbildung 25 C), werden große Mengen TNF (Abbildung 25 A und C) und große Mengen Cxcl-2 (Abbildung 25 B) auf mRNA Ebene induziert.



Abbildung 25: Propionat reguliert die proinflammatorische Immunantwort in CMT-93 Zellen. CMT-93 Zellen wurden 48h mit (A-C) 10mM Propionat, (A und B) 200ng/ml LPS oder (C) 50ng/ml Pam3CSK4 vorstimuliert und anschließend für 2h mit (A und B) 1 μ g/ml LPS oder (C) 250ng/ml Pam3CSK4 restimuliert. Der Nachweis von (A und C) TNF oder (B) Cxcl-2 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Wie erwartet, führt die Vorbehandlung von CMT-93 Zellen mit LPS oder Pam3CSK4 zu einer signifikanten Suppression der TNF Expression. Auch die Expression des Chemokins Cxcl-2 ist gehemmt. Dieses Phänomen ist als LPS-Toleranz bekannt (93). Interessanterweise führt die Vorstimulation der Zellen mit Propionat ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF und des Chemokins Cxcl-2 auf mRNA Ebene, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Propionat vorstimuliert wurden (Abbildung 25).

Auch in der humanen Lungenepithelzelllinie A549 konnte gezeigt werden, dass eine Vorstimulation mit Propionat zu einer signifikanten Hemmung der TNF Expression nach LPS Restimulation führt. Zusätzlich ist in Abbildung 26 zu sehen, dass eine Vorstimulation von A549 Zellen mit dem spezifischen IFNRA2 Agonisten RO8191 ebenfalls zu einer stark reduzierten Induktion der TNF Expression in diesen Zellen führt. RO8191 induziert, wie in Abbildung 24 C zu sehen ist, die IFIT1 Expression. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass durch Propionat eine Kreuztoleranz in den verwendeten Zelltypen gegenüber TLR1/2 und TLR4 Agonisten induziert werden kann. Ebenfalls neuartig ist der Befund das eine Vorstimulierung des IFNRA2 zu einer Kreuztoleranz in den getesteten Zellen, gegenüber einer TLR4 Restimulierung führt.



Abbildung 26: Propionat und RO8191 regulieren die proinflammatorische Immunreaktion in A549 Zellen. (A) A549 Zellen wurden 48h mit 10mM Propionat, 10μ M RO8191 oder 200ng/ml LPS vorstimuliert und anschließend für 2h mit 1 μ g/ml LPS restimuliert. Der Nachweis von (A) TNF, (B) IFIT1 oder (C) IFIT2 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

In der humanen monozytären Zelllinie THP-1 konnte sowohl auf mRNA (Abbildung 27 A) als auch auf Proteinebene (Abbildung 27 B-D) gezeigt werden, dass Propionat eine Kreuztoleranz gegenüber TLR4 und TLR1/2 Agonisten induziert. Das heißt, dass nach einer Vorinkubation mit Propionat und einer anschließenden Restimulation mit LPS oder

Ergebnisse

Pam3CSK4, die TNF und CXCL-2 Expression stark gehemmt wird. Als Kontrolle für die Toleranzinduktion wurde jeweils eine Vorstimulierung mit LPS (Abbildung 27 A-C) sowie eine Stimulierung mit Pam3CSK4 (Abbildung 27 D) durchgeführt.



Abbildung 27: Propionat reguliert die proinflammatorische Immunreaktion in THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden 48h mit (A-D) 5mM Propionat, (A-C) 200ng/ml LPS oder (D) 50ng/ml Pam3CSK4 vorstimuliert und anschließend für 2h mit (A-C) 1 μ g/ml LPS oder (D) 250ng/ml Pam3CSK4 restimuliert. (A) Der Nachweis von TNF auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. (B-D) Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die (B und D) TNF oder (C) CXCL-2 Proteinkonzentration mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Zusätzlich wurde getestet, ob eine Vorstimulierung mit Propionat ebenfalls zur Induktion einer Kreuztoleranz bezüglich einer über TLR4 induzierten MHC-Klasse-II (HLA-DR) Expression auf THP-1 Zellen führt. Wie bereits beschrieben, reduziert die Vorbehandlung mit LPS (TLR4 Agonist) die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen auf THP-1 Zellen (94). Tatsächlich reduziert die Vorstimulierung dieser Zellen mit Propionat in hohem Maße die über TLR4-induzierte Expression von MHC-Klasse-II Molekülen, im Vergleich zu den nicht vorstimulierten Zellen (Abbildung 28).



Abbildung 28: Die Vorstimulierung mit Propionat hemmt die HLA-DR Expression in THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden 48h mit (1) 5mM Propionat oder (2) 200ng/ml LPS vorstimuliert und anschließend für 2h mit (1-3) 1µg/ml LPS restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem HLA-DR Antikörper gefärbt und im FACS analysiert. Die Zellen sind vorsortiert auf Einzelzellen und lebende Zellen.

4.3.2 Propionat induziert eine IFIT-vermittelte Kreuztoleranz

Um zu identifizieren, welches Mitglied der IFIT-Genfamilie an der Induktion der Hypo-Responsivität in Bezug auf die TNF oder Cxcl-2 Expression nach TLR4 Stimulierung beteiligt ist, transfizierten wir CMT-93, A549 und THP-1 Zellen stabil mit Expressionsvektoren, die für die cDNA von IFIT1, IFIT2 und IFIT3 kodieren, und bestimmten die TNF und/oder Cxcl-2 Expression nach Stimulation mit LPS. Interessanterweise zeigen CMT-93 Zellen, die Ifit1, Ifit2 oder Ifit3 überexprimieren und mit LPS stimuliert wurden, eine stark reduzierte TNF Expression im Vergleich zu nichttransfizierten Kontrollzellen (Abbildung 29 A). Die quantitative RT-PCR Analyse von Cxcl-2 in CMT-93 Zellen zeigt jedoch, dass nur Ifit1 die Toleranz gegenüber TLR4 (LPS) in diesen Zellen induzieren kann (Abbildung 29 B).



Abbildung 29: Induktion einer Kreuztoleranz in Ifit überexprimierenden CMT-93 Zellen. CMT-93 Zellen wurden mit Expressionsvektoren stabil transfiziert, die entweder für Ifit1, Ifit2 oder Ifit3 kodieren. Wildtyp CMT-93 Zellen (weiß) sowie die Ifit exprimierenden CMT-93 Zellen (Graustufen) wurde mit 1 μ g/ml LPS restimuliert. Als positiv Kontrolle wurden CMT-93 Wildtyp Zellen 48h mit 200ng/ml LPS vorstimuliert. Der Nachweis von (A) TNF oder (B) Cxcl-2 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nichtstimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Interessanterweise konnte auch in den humanen A549 Zellen gezeigt werden, dass die Zellen, welche entweder IFIT1, IFIT2 oder IFIT3 überexprimieren und mit LPS restimuliert wurden, eine im hohen Maße reduzierte TNF Expression im Vergleich zu Wildtyp Zellen aufweisen. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen, die mit LPS vorstimuliert wurden. Nach LPS Restimulation kam es zu einer reduzierte TNF Expression (Abbildung 30).



Abbildung 30: Induktion einer Kreuztoleranz in IFIT überexprimierenden A549 Zellen.

A549 Zellen wurden mit Expressionsvektoren stabil transfiziert, die entweder für IFIT1, IFIT2 oder IFIT3 kodieren. Wildtyp A549 Zellen (weiß) sowie die IFIT exprimierenden A549 Zellen (Graustufen) wurden für 2h mit 1 μ g/ml LPS restimuliert. Als positiv Kontrolle wurden A549 Wildtyp Zellen 48h mit 200ng/ml LPS vorstimuliert. Der Nachweis von TNF auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die

statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Monozytäre THP-1 Zellen wurden ebenfalls mit den IFIT1, IFIT2 oder IFIT3 Expressionsvektoren stabil transfiziert und die TNF Expression nach Restimulation mit LPS detektiert. Die FACS Analyse in Abbildung 31 zeigt, dass in THP-1 Zellen nur IFIT2 und IFIT3 nach LPS Restimulation die TNF Expression hemmen und somit eine Toleranz gegenüber TLR4 induzieren. Im Gegensatz dazu hemmt die Überexpression von IFIT1 in THP-1 Zellen die TNF Expression nicht. Wie zu erwarten, wird die TNF Expression nach einer Vorinkubation mit LPS und einer zweiten LPS Stimulation in Wildtyp THP-1 Zellen gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, (1) dass die Überexpression einzelner Mitglieder der IFIT Genfamilie auszureichen scheint um die beobachtete Kreuztoleranz in den einzelnen Zelltypen zu induzieren und (2) das unterschiedliche Mitglieder der IFIT Genfamilie zelltypspezifisch in der Induktion einer Kreuztoleranz beteiligt zu sein scheinen (Abbildung 31).



Abbildung 31: Induktion einer Kreuztoleranz in IFIT2 und IFIT3 überexprimierenden THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden mit Expressionsvektoren stabil transfiziert, die entweder für IFIT1, IFIT2 oder IFIT3 kodieren. Wildtyp THP-1 Zellen (weiß) sowie die IFIT exprimierenden THP-1 Zellen (Graustufen) wurde mit 1μ g/ml LPS restimuliert. Als positiv Kontrolle wurden THP-1 Wildtyp Zellen 48h mit 200ng/ml LPS vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem TNF Antikörper gefärbt und im FACS analysiert. Die Zellen sind vorsortiert auf Einzelzellen und lebende Zellen. Oben: TNF Expression der THP-1 Zellen; unten: Auswertung mittels Mittlerer Fluoreszenz Intensität (MFI). Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.3.3 Propionat induziert eine Kreuztoleranz in PBM

Um unsere erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, testeten wir primäre humane Makrophagen, die aus peripheren Blutmonozyten differenziert wurden (Abbildung 18). Große Mengen an TNF sind in den Überständen von PBM nach Stimulation mit LPS (Abbildung 32 A) oder mit Pam3CSK4 (Abbildung 32 C) nachweisbar. Auch wird die Expression von CXCL-2 in PBM durch LPS induziert (Abbildung 32 B). Wie in den bisherigen Versuchen mit den entsprechenden Zelllinien (A549 und THP-1), führt die Vorbehandlung von PBM mit LPS oder Pam3CSK4 zu einer signifikanten Reduktion der TNF Expression im Vergleich zu 79

Ergebnisse

nicht vorstimulierten Zellen (Abbildung 32). Werden die Zellen mit Propionat vorbehandelt, und mit LPS oder Pam3CSK4 restimuliert, wird die Expression von TNF und CXCL-2 gehemmt. Es scheint, als würde Propionat in den PBM eine Kreuztoleranz gegenüber TLR1/2 und TLR4 induzieren.



Abbildung 32: Propionat reguliert die proinflammatorische Immunantwort in PBM. PBM wurden 24h mit (A-C) 5mM Propionat, (A und B) 0,1ng/ml LPS oder (C) 10ng/ml Pam3CSK4 vorstimuliert und anschließend für 4h mit (A und B) 1ng/ml LPS oder (B) 50ng/ml Pam3CSK4 restimuliert. Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die (A und C) TNF oder (B) CXCL-2 Proteinkonzentration mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.4 Kurzkettige Fettsäuren induzieren eine erhöhte antivirale Aktivität in Epithelzellen und Makrophagen

Kommt es zu einer viralen Infektion, ist die angeborene Immunantwort stark abhängig von der Produktion von Interferonen (IFN), einer Familie von Zytokinen mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften (95, 96). Die vielfältigen Wirkungen von IFN werden durch die Induktion einer enormen Anzahl von Interferon stimulierten Genen (ISG) vermittelt, die überwiegend durch den JAK/STAT (*Januskinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*) Signalweg reguliert werden. Einige bekannte ISG sind, wie bereits genannt IFIT1, IFIT2, IFIT3. Weitere ISG die in dem Affymetrix GeneChip Microarray (Abbildung 8) detektiert wurden und deren Expression durch Propionat in intestinalen Epithelzellen (Maus) induziert wurden, sind MX1, OASL2 oder ISG15. Auch diese ISG sind bekannt für ihre antivirale Aktivität (97).

4.4.1 Propionat induziert die Expression von antiviralen Effektormolekülen

Neben der IFIT-Genfamilie gibt es viele weitere ISG. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass in CMT-93, A549, THP-1 Zellen und in peripheren Blutmakrophagen die Expression verschiedener ISG durch Propionat induziert wird.

Werden CMT-93 Zellen mit Propionat stimuliert, kommt es zu einer signifikanten Induktion der Expression von Isg15 (Abbildung 33 A), Mx1 (Abbildung 33 B) und Oasl2 (Abbildung 33 C).



Abbildung 33: Propionat induziert die ISG Expression in CMT-93 Zellen. CMT-93 Zellen wurden 48h mit 10mM Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis der (A) Isg15 mRNA (B) Mx1 mRNA und (C) Oasl2 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Des Weiteren konnte die Induktion dieser antiviralen Effektormoleküle auch in humanen Lungenepithelzellen (A549) detektiert werden. Sowohl die Expression von ISG15 (Abbildung 34 A) als auch von MX1 (Abbildung 34 B) wird in A549 Zellen nach Propionat Behandlung induziert.

Ergebnisse



Abbildung 34: Propionat induziert die ISG Expression in A549 Zellen.

A549 Zellen wurden 48h mit 10mM Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis der (A) ISG15 mRNA und (B) MX1 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Darüber hinaus konnte signifikant erhöhte ISG Expression nach Propionat Stimulierung auch in der humanen monozytären Zelllinie THP-1 nachgewiesen werden. Nach einer Stimulation mit der kurzkettigen Fettsäure Propionat, kommt es zu einer erhöhten Expression von ISG15 (Abbildung 35 A) und MX1 (Abbildung 35 B) in diesen Zellen.



Abbildung 35: Propionat induziert die ISG Expression in THP-1 Zellen.

THP-1 Zellen wurden 48h mit 5mM Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis der (A) ISG15 mRNA und (B) MX1 mRNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Um unsere Ergebnisse noch einmal zu untermauern, wurden primäre, humane PBM mit Propionat stimuliert. Wie zu erwarten, konnte die Expression von MX1 nach Propionat Behandlung induziert werden (Abbildung 36).



Abbildung 36: Propionat induziert die Expression von MX1 in PBM.

Periphere Blutmakrophagen wurden 24h mit 5mM Natrium Propionat stimuliert. Der Nachweis von MX1 auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivität der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.4.2 Propionat induziert eine erhöhte antivirale Aktivität

Unter 4.2 und 4.4.1 wurde mehrfach in verschiedenen Zelllinien und sogar in primären Makrophagen gezeigt, dass durch die Stimulation von Epithelzellen oder Makrophagen mit Propionat die Expression von Interferon Stimulierten Genen (ISGs) stark induziert wird. Es sollten nun die durch Propionat induzierten antiviralen Aktivitäten in einem viralen Infektionsmodell *in vitro* überprüft werden.

Klassische Virusinfektionsmodelle sind oft nur unter hohen Biosicherheitsmaßnahmen durchführbar. Ein alternatives Verfahren zur Bestimmung einer Virusinfektion/-replikation bzw. eines Virustiters kann mit rekombinanten Viren erreicht werden, die Reporterproteine wie grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder Firefly-Luciferase exprimieren. Interessanterweise haben Rentsch und Mitarbeiter (98) einen neuartigen Bioassay entwickelt, der auf den als BSL-1-klassifizierten *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV)* ΔG (Luc)-Replikon Partikeln basiert. Durch die Expression des GFP/Firefly-Luciferase-Reportergens ist der Assay hochsensitiv und quantifizierbar. Außerdem fehlt dem Virus Partikel das Glykoprotein G (VSV* ΔG (Luc)). Dadurch kann der Virus-Partikel die Zelle nur einmal infizieren, sich in der Zelle replizieren aber keine infektiösen Virus-Partikel (Nachkommen) bilden. Dieser Bioassay kann auch zum Nachweis von bioaktiven IFN *in vitro* verwendet werden (98, 99).

Murine, epitheliale Kolonzellen (CMT-93) und humane, alveolar Epithelzellen (A549) wurden für 48h mit Propionat behandelt und mit dem VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel in

Ergebnisse

einem Verhältnis von Zelle zu Partikel von 1:5 (MOI=5) infiziert. Nach 18h wurde die GFP/Firefly-Luciferase Reportergenaktivität gemessen um die virale Infektion/Replikation zu quantifizieren. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl in CMT-93 Zellen (Abbildung 37 A) als auch in A549 Zellen (Abbildung 37 B), die mit IFNα vorbehandelt wurden, keine GFP Expression detektierbar ist, während in den unstimulierten Zellen eine starke GFP Expression nach 18h zu beobachten ist. Interessanterweise kommt es sowohl in CMT-93 als auch in A549 Zellen die mit Propionat vorbehandelt wurden, zu einer sehr stark reduzierten Expression des GFP Reportergens (Abbildung 37 A und B).



Abbildung 37: Expression des GFP Reportergens durch das VSV* $\Delta G(Luc)$ in CMT-93 und A549 Zellen. (A) CMT-93 Zellen (4x Vergrößerung) und (B) A549 Zellen (10x Vergrößerung) wurden mit 10U/ml IFN Typ I oder 10mM Natrium Propionat vorstimuliert und anschließend mit VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikeln infiziert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Die obere Bildreihe zeigt jeweils die Zellen im Phasenkanal und die untere Reihe zeigt den grünen Bildkanal. Die Zellen wurden 18h nach der Infektion im Incucyte analysiert.

Die Luciferase-Reporteraktivität in VSV* $\Delta G(Luc)$ -infizierten Zellen ist abhängig vom Replikations- und Transkriptionsniveau des VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikons. Daher führt eine

Reduktion der viralen Replikation zu entsprechend niedrigeren Luciferase-Werten (98). Wir konnten in einem Luciferase-Reporterassay zeigen, dass die Vorbehandlung von CMT-93 (Abbildung 38 A) und A549 (Abbildung 38 B) Zellen mit Propionat, genau wie die Vorbehandlung mit IFN α zu einer sehr starken Reduktion der Infektion/Replikation des VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikons führt, was durch eine sehr stark verminderten Detektion des Luciferase Reportergens nachgewiesen werden konnte.



Abbildung 38: Expression des Firefly-Luciferase Reportergens durch das VSV*∆G(Luc) in CMT-93 und A549 Zellen.

Um diese Ergebnisse, die wir aus den Versuchen mit CMT-93 Zellen und A549 Zellen erhalten haben, zu bestätigen, wurden monozytäre THP-1 Zellen mit VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikeln infiziert und die GFP Expression mittels FACS Analyse gemessen. Zellen die mit IFN α vorstimuliert waren zeigen eine deutliche GFP Abnahme im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Es konnte auch in THP-1 Zellen eine stark reduzierte GFP Expression des VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikons in den mit Propionat behandelten Zellen, im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 39). Dieses Resultat bestätigt unsere Annahme, dass eine Propionat Behandlung in verschiedenen Zellenlinien die Infektion/Replikation des VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikons inhibieren kann.

⁽A) CMT-93 Zellen und (B) A549 Zellen wurden mit 10U/ml IFN Typ I oder 10mM Propionat vorstimuliert und anschließend mit den VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikeln infiziert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Nach einer 18-stündigen Infektion wurden die Zellen lysiert und ein Luciferase Assay durchgeführt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.



Abbildung 39: Expression des GFP Reportergens durch das VSV*ΔG(Luc) in THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden mit 10 U/ml IFN Typ I oder 5mM Propionat vorstimuliert und anschließend mit den VSV*ΔG(Luc)-Replikon Partikeln infiziert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Nach 18h wurden die Zellen im FACS auf ihre GFP Expression hin analysiert. Anhand der GFP Expression wurde die MFI bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

In einem weiteren Experiment wurden primäre, humane Makrophagen in dem VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel Infektionsmodel getestet. PBM wurden deshalb mit IFN α oder Propionat vorbehandelt und anschließend mit dem VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel infiziert. Nach 18h wurde die Firefly-Luciferase Reportergenaktivität gemessen um die Infektion/Replikation des VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikons zu quantifizieren. Interessanterweise zeigen die PBM, welche entweder mit IFN Typ I oder Propionat vorstimuliert wurden, eine ebenfalls stark reduzierte Luciferase-Reportergenaktivität in den Primärzellen gegenüber der nicht stimulieren Kontrollzellen (Abbildung 40).

Ergebnisse



Abbildung 40: Expression des Firefly-Luciferase Reportergens durch VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikel in PBM. PBM wurden für 24h mit 10U/ml IFN Typ I oder 5mM Propionat vorstimuliert und anschließend mit dem VSV* $\Delta G(Luc)$ Replikon Partikel infiziert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Nach einer 18-stündigen Infektion wurden die Zellen lysiert und ein Luciferase Assay durchgeführt. Es wurden jeweils 5 Proben gesammelt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente; die statistische Analyse wurde mit einer *one-way ANOVA* durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt, und p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Im viralen Infektionsmodell mit VSV*∆G(Luc)-Replikon Partikeln konnte mit Hilfe der Analyse der GFP/Luciferase Reportergene gezeigt werden, dass sowohl CMT-93, A549, THP-1 Zellen als auch primäre humane PBM durch eine Propionat Vorbehandlung vor einer Infektion/Replikation mit den VSV-Replikon-Partikeln geschützt sind.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der hReg3a transgenen Mauslinie

In der vorliegenden Arbeit wurde die hReg3a transgene Mauslinie, die von der Arbeitsgruppe Hehlgans generiert wurde, weiterführend charakterisiert. In dieser Mauslinie wird humanes Reg3a ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben und Organen exprimiert. hReg3a wird als Biomarker zur Früherkennung einer gastrointestinalen Graf versus Host Disease (GvHD) klinisch angewandt, da es im Plasma der Patienten nachweislich erhöht ist (100, 101). Im Gegensatz dazu, wird die antiinflammatorische und regenerative Wirkung von hReg3a durch eine Vielzahl von Studien gestützt. hReg3a unterstützt während der Wundheilung der Haut die Proliferation von Keranozyten (102) und wirkt regenerierend auf das Blasenepithel nach einer Zystitis (103). Interessanterweise fand man in ex vivo-Studien heraus, dass die Behandlung von Biopsien von Morbus Crohn Patienten mit rekombinantem hReg3a die Produktion an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF, IL6 oder IFNy verringert. Außerdem verhindert hReg 3α eine Immunreaktion, indem es die Aktivierung des NFκB-Signalwegs in Immunzellen blockiert. Demnach scheint hReg3α antiinflammatorisch im Falle einer Entzündung im Darm zu wirken (104). hReg3a zeigt als antimikrobielles Peptid spezifische antimikrobielle Aktivität gegen gram-positive Erreger. Eine Analyse der16S rRNA hat bereits gezeigt, dass zwei bakterielle Phyla, Bacteroidetes und Firmicutes, ca. 90% der bekannten phylogenetischen Kategorien ausmachen. Andere subdominante Gruppen sind Proteobacteria, Actinobacteria und Verrucomicrobia (105, 106). Durch die 16S rRNA Analyse konnten wir diese Verteilung der Phyla in Wildtyp Mäusen bestätigen. Durch die Überexpression von hReg3a in den transgenen Mäusen hingegen, nehmen die gram-positiven Firmicutes ab. Es scheint als würde die freigewordene Nische von den gramnegativen Verrucomicrobia besiedelt werden, da eine deutliche Zunahme dieses Phylum zu detektieren ist (Abbildung 7). Tiefergehende Sequenzierungen zeigen, dass die gramnegative Spezies Akkermansia muciniphila (A. muciniphila) aus dem Phylum der Verrucomicrobia in den hReg3a transgenen Mäusen zunimmt (Daten nicht gezeigt). A. muciniphila besiedelt die Schleimhaut des Darms und ist bekannt als Muzin-degradierendes Bakterium. Durch die Produktion von Muzin-abbauenden Enzymen kann A. muciniphila Muzine der Schleimschicht des Epithels als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nutzen und diese zu Essig- und Propionsäure abbauen (107, 108). Die Zunahme der Spezies A.

muciniphila in den hReg3a transgenen Mäusen korreliert mit der Zunahme der kurzkettigen Fettsäure Propionat in diesen Mäusen.

Die Veränderungen in der mikrobiellen Diversität in den Rege3α transgenen Mäusen ist derart ausgeprägt, dass der Nachweis der veränderten mikrobiellen Diversität nicht nur mittels 16S rRNA Sequenzierung, sondern auch mittels Phyla-spezifischer quantitativer PCR im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden konnte (Abbildung 6).

Gram-negative Bacteroidetes sind neben den gram-positiven Firmicutes die am häufigsten Vorkommenden Bakterien im Darm. Während Bacteroidetes hauptsächlich Propionat und Acetat produzieren (61), ist das primäre metabolische Endprodukt der Firmicutes Butyrat (109). Zu den Butyrat-produzierende Bakterien im Darm der Firmicutes gehören insbesondere Faecalibacterium prausnitzii und Clostridium leptum aus der Familie Ruminococcaceae sowie Eubacterium rectale und Roseburia spp. aus der Familie Lachnospiraceae. Die Tatsache, dass in den hReg3a transgenen Mäusen weniger Firmicutes und mehr Verrucomicrobia im Darm detektierbar sind, korreliert mit den Daten, dass in diesen Mäusen weniger des bakteriellen Metaboliten Butyrat zu finden ist, jedoch die Propionatkonzentration stark zunimmt. Um zu untersuchen, in wie weit eine Veränderung der Mikrobiomzusammensetzung und der daraus resultierenden Veränderung in der Produktion bakterieller Metaboliten (z.B. Propionat) Einfluss auf die Genexpression von intestinalen Epithelzellen nehmen, wurde eine Expressionanalyse von intestinalen Epithelzellen aus hReg3a transgenen Mäusen und WT Mäusen durchgeführt. Es konnte ein signifikanter Anstieg von ISG detektiert werden. Daher sollte in dieser Arbeit in vitro die Auswirkungen von Propionat auf die Genexpression genauer untersucht werden. Unsere Daten zeigen einen signifikanten Anstieg antiviraler Interferon stimulierter Gene (ISG) nach Propionat Behandlung in verschiedenen Zelltypen.

5.2 Induktion von ISG in verschiedenen Zelllinien durch Propionat und dessen Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem

5.2.1 Propionat induziert ISG Expression über den FFAR2/Gα_{q/11}-Signalweg in einer IFN-abhängigen Weise

Die erste Verteidigungslinie gegen virale Pathogene stellt das angeborene Immunsystem dar (97). Hierzu gehören ISG wie zum Beispiel die *interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats* (IFIT)-Familie. Die Induktion dieser Gene wird nach der Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), einschließlich 89 einzelsträngiger und doppelsträngiger viraler Nukleinsäuren, eingeleitet. Die PAMP werden von spezifischen *Pattern Recognition Receptors* (PPR) erkannt.

Nachdem ein PAMP an einen PPR bindet, kommt es zur Aktivierung spezifischer Signalkaskaden, die zur Expression von Typ I (IFN α/β) und Typ III (IFN λ) IFN führen. Typ III IFN binden an einen heterodimeren Rezeptor, der aus dem Typ III IFN-Rezeptor (IFNLR1, IL28RA) und dem Interleukin 10 Rezeptor 2 (IL10R2) besteht. Während IL-10R2 in den meisten Zelltypen breit exprimiert wird, hat IL28RA eine begrenzte Expression und wird in Epithelzellen (z. B. Darm-, Lungen-, Vaginalepithel und Hepatozyten) (28, 29) und einigen Immunzellen (DCs, pDCs, NK-Zellen und Neutrophile) gefunden (30-32).

Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse, dass die Expression der IFIT-Genfamilie durch kurzkettige Fettsäuren induziert werden kann. Sowohl in intestinalen und aveolaren Epithelzellen (Abbildung 10; Abbildung 13) als auch in Monozyten und primären humanen Makrophagen (Abbildung 14; Abbildung 19) induzieren SCFA die Expression der IFIT-Genfamilie.

Propionat bindet an den FFAR3 (GPCR41) oder den FFAR2 (GPCR43) Rezeptor und induziert einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelten Signalweg. Die Aktivierung des Signalwegs führt zu einer zelltypspezifischen Induktion von Typ I und Typ III IFN, was darauf hindeutet, dass mikrobielle Metaboliten an der Regulation der proinflammatorischen Zytokinexpression beteiligt zu sein scheinen. Darüber hinaus scheint es, dass dieser Signalweg in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, einschließlich Fibroblasten, T- und B-Zellen, aktiviert ist (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren zeigen unsere Ergebnisse, dass die Stimulation mit Propionat zu einer Erhöhung der FFAR2-Expression auf den untersuchten Epithelzellen, monozytären Zellen und den PBM führt. Wir konnten zeigen, dass die kurzkettige Fettsäure Propionat an FFAR2 bindet, und über den spezifischen $G\alpha_{q/11}$ -Signalweg die Expression von Interferon induzierten Genen (ISG) induziert. Zum einen konnte die Expression der ISG durch den spezifischen $G\alpha_{q/11}$ -Inhibitor YM-254890 gehemmt werden und zum anderen konnten wir eine erhöhte Aktivität des NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) Promotors durch die Stimulation mit Propionat demonstrieren (Abbildung 23). Proteine, die zur NFAT Transkriptionsfaktorfamilie gehören, spielen eine zentrale Rolle bei der induzierbaren Gentranskription während der Immunantwort. Trotz ihres Namens, werden NFAT Proteine nicht nur in T Zellen, sondern auch in anderen Immunzellen exprimiert. NFAT Proteine werden durch Stimulation von Rezeptoren aktiviert, die an die Kalziummobilisierung gekoppelt sind, wie z.B. GPCR. Rezeptorstimulation und Kalziummobilisierung führen zur Aktivierung vieler intrazellulärer Enzyme, darunter die Kalzium- und Calmodulinabhängige Phosphatase Calcineurin, ein wichtiger *Upstream*-Regulator der NFAT-Proteine (110).

Diese Daten unterstützen unsere bisherigen Ergebnisse, dass die Propionat induzierte IFIT1 Expression in Epithelzellen über FFAR2 in einer $G\alpha_{q/11}$ -Signalweg abhängigen Weise vermittelt wird. Eine Reihe von Studien haben eine Rolle des $G\alpha_{q/11}$ -Signalwegs bei Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas und Typ-2-Diabetes aufgezeigt (111). Zum Beispiel zeigen FFAR2 *knock out* (KO) Mäuse sowohl in *vivo* als auch in *vitro* eine reduzierte SCFA-induzierte GLP-1 Sekretion und haben eine gestörte Glukosetoleranz (112). Es gibt weitere Belege, dass Propionat wichtige physiologische Rollen zum Beispiel in der Adipogenese durch FFAR2, nicht aber durch FFAR3 übernimmt. Hier kann Propionat die Isoproterenol-induzierte Lipolyse in einer dosisabhängigen Weise hemmen (113). Der FFAR2/G $\alpha_{q/11}$ -Signalwegs scheint wichtige immunmodulatorische Funktionen zu vermittelt.

Wie bereits erwähnt, signalisieren Typ I IFN über den IFNAR1 und IFNAR2 Rezeptorkomplex und Typ III IFN nutzen den IL28RA und IL10R2 Rezeptorkomplexe zur Signalübertragung (114, 115). Unsere Daten zeigen eine signifikante Induktion von IFN λ und dessen Rezeptor IL28RA in Epithelzellen nach Stimulation mit Propionat oder Butyrat *in vitro* (Abbildung 16) und eine signifikante Hochregulation von IFN α durch Propionat in der monozytären Zelllinie THP-1 (Abbildung 17). Da Typ I und Typ III IFN auf autokrine und parakrine Weise sezerniert werden (116), scheint es, als würde die Hochregulation von IFN Typ I in monozytären Zellen und die Hochregulation von IFN Typ III in Epithelzellen, die ISG Expression induzieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine parakrine Sekretion von IFN α/β und/oder IFN λ an der durch Propionat induzierten Expression der IFIT-Genfamilie beteiligt ist.

5.2.2 Propionat induziert eine IFIT-vermittelte Kreuztoleranz gegenüber TLR1/2 und TLR4

Bisher wurden die immunmodulierenden Funktionen von SCFA auf Immunzellen hauptsächlich im Hinblick auf die Regulation adaptiver Immunzellantworten, zum Beispiel T-Zell Subpopulationen, untersucht.

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste nicht-traumatische neurologische Erkrankung in Industrieländern. Gekennzeichnet ist diese Krankheit durch chronische Autoimmunangriffe

auf die weiße Substanz, die typischerweise zu einer Zerstörung der Myelinscheide führen, die die Nervenaxome im zentraler Nervensystem umgibt. Diese Autoimmunkomponente zeichnet sich durch eine Zunahme von proinflammatorischen autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Helfer (Th)17- und Th1-Zellen, und eine verminderte Anzahl und beeinträchtigte Funktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) aus. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die weltweit steigende Zahl von MS-Fällen teilweise auf ernährungsbedingte Veränderungen zurückgeführt werden kann, die zu einem veränderten Darmmikrobiom führen können. Es gibt zunehmende Hinweise, dass kurzkettige Fettsäuren, wie Propionat zu einem signifikanten Anstieg der Darm-assoziierten Treg-Zellpopulation, einer anschließenden Reduktion der Entzündungsreaktion und damit zu einer Krankheitsverbesserung führen (117).

Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von SCFA auf T-Zell Subpopulationen wurde anhand der Untersuchung von CD8+ T-Zellen dargelegt. Durch Versuche mit keimfreien Mäusen konnte gezeigt werden, dass kurzkettige Fettsäuren wichtig sind, für das Langzeitüberleben und die Funktion von CD8+ Gedächtniszellen (118).

Wir konnten zeigen, dass Propionat die Expression der IFIT-Genfamilie induziert. Neuere Arbeiten zeigen, das IFIT1 neben seiner antiviralen Aktivität auch als negativer Regulator einer proinflammatorischen Immunreaktion wirken kann. Darüber hinaus zeigt die Studie, dass IFIT1 mit Chromatinregulatoren wie HDAC2 und SAP25 zu assoziieren scheint, welches ursächlich zu einer reduzierten proinflammatorischen Zytokinexpression führt, die auf transkriptioneller Ebene reguliert zu sein scheint (90). Interessanterweise unterstützen unsere Daten die Idee, dass eine induzierte Expression von Mitgliedern der IFIT-Genfamilie ausreicht, um eine PPR-induzierte proinflammatorische Zytokinproduktion zu hemmen.

Die Endotoxin-Toleranz beschreibt einen Zustand der Hypo-Responsivität, der durch eine reduzierte Fähigkeit der Zellen gekennzeichnet ist, auf Entzündungsreize zu reagieren. Definiert ist die Endotoxin-Toleranz als reduzierte Fähigkeit der Zelle auf LPS, nach einer ersten Exposition gegenüber diesem Stimulus, zu reagieren. Dieses Phänomen tritt als Folge einer anhaltenden TLR-Stimulation nicht nur durch LPS, sondern auch durch andere TLR-Agonisten und sogar TLR-unabhängige Entzündungsmediatoren auf. Der Mechanismus, durch den die Exposition gegenüber einem bestimmten TLR-Liganden oder anderen Entzündungsmediatoren, wie Zytokinen, die Entzündungsreaktion auf andere TLR-Liganden reduziert, ist als Kreuztoleranz bzw. Zytokin-induzierte Toleranz bekannt. (119). Die Endotoxin-Toleranz und Kreuztoleranz wurde ausgiebig an Monozyten und Makrophagen untersucht, obwohl die Mehrheit der angeborenen Immunzellen Toleranz

Diskussion

gegenüber sekundären TLR-Stimuli entwickeln. Dazu gehören dendritische Zellen, Neutrophile, Mastzellen sowie Endothel- und Epithelzellen (119). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, die eine Kreuztoleranz gegenüber TLR1/2 (Pam3CSK4) und TLR4 (LPS) Agonisten in Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen zeigen.

Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass IFN Typ I-induzierte Signale eine Kreuztoleranz gegenüber einer nachfolgenden Stimulation mit TLR4 oder TLR1/2 Agonisten vermittelt.

Des Weiteren induziert die Stimulation von A549 und CMT-93 Zellen mit Propionat eine IFN λ Expression und die Stimulation von THP-1 Zellen eine Induktion der IFN α Expression (Abbildung 17) *in vitro*, die in einer autokrinen Weise die IFIT-Expression steigert und in Folge dessen zu einer stark reduzierten Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass zusätzliche zelluläre Quellen von IFN α und/oder IFN λ , die parakrin wirken, an der Induktion von tolerogenen Wirtszellen *in vivo* beteiligt sind.

Unsere Analyse der CMT-93, A549 oder THP-1 Zellen die IFIT1, IFIT2 und IFIT3 überexprimieren, und die anschließende Bestimmung der TNF und CXCL-2 Expression nach LPS Stimulation ergab, dass in CMT-93 und A549 Zellen die Reduktion der proinflammatorischen Zytokin-(TNF) und Chemokinexpression (CXCL-2) offenbar durch murines und humanes IFIT1, IFIT2 und IFIT3 vermittelt wird. CXCL-2 wirkt chemotaktisch für Neutrophile und rekrutiert diese an den Ort der Entzündung (120). Darüber hinaus konnten wir in THP-1-Zellen, die IFIT1 überexprimieren, keine Reduktion der TNF-Expression beobachten, während THP-1-Zellen, die IFIT2 und IFIT3 überexprimieren, durch eine reduzierte Zytokinexpression nach LPS Restimulation gekennzeichnet sind. Diese Beobachtung ergänzt frühere Ergebnisse, die IFIT2 als an der Regulation der proinflammatorischen Zytokinproduktion in Mausmakrophagen beteiligt, identifizieren (91). Es wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung von humanen Makrophagen mit Acetat in vitro, die HDAC-Aktivität reduziert und die globale Histon-Acetylierung erhöht, was mit einer verringerten Produktion der entzündlichen Zytokine TNF, IL-6 und IL-8 korreliert (121). Ähnlich verringerten Butyrat und Propionat die LPS-induzierte TNF Produktion in vitro in humanen PBMC in einer ähnlichen Weise wie der HDAC Inhibitor Trichostatin A (122). Unsere Ergebnisse zur Induktion von Kreuztoleranz werden durch die Verwendung primärer humaner peripherer Blutmakrophagen weiter untermauert. Es wurde sowohl die konstitutive Expression von FFAR2 als auch die Induktion der IFIT-Genfamilie (IFIT1 bis IFIT3) nach Stimulation mit Propionat beobachtet (Abbildung 20-21). Wie erwartet führt die Vorstimulation primärer humaner PBM sowohl mit dem TLR4-Agonisten LPS als auch dem TLR1/2-Agonisten Pam3CSK4 zu einer stark reduzierten TNF Produktion nach agonistischer Restimulation. Auch die CXCL-2 Produktion ist nach einer Vorstimulation mit LPS und anschließender Restimulation mit dem TLR4-Agonisten gehemmt (Abbildung 32).

Die klinische Manifestation der Endotoxin-Toleranz wird als *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome* (CARS) bezeichnet. CARS stellt die "Erschöpfung" des Immunsystems dar und wird bei manchen septischen Patienten im Anschluss an die erste Phase der Sepsis, die als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) bekannt ist, beobachtet. Die Endotoxin-Toleranz erklärt den Zustand der CARS-Immunsuppression bei Sepsis, da Blutleukozyten von septischen Patienten einen ähnlichen Phänotyp wie endotoxin-tolerante Zellen aufweisen. Neutrophile und Monozyten von septischen Patienten sind refraktär gegenüber der Produktion von Entzündungsmediatoren, während sie antiinflammatorische Moleküle hochregulieren, wenn sie sekundären TLR-Stimuli ausgesetzt sind. Infolgedessen weisen Patienten mit CARS eine erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen auf (119).

Unsere Daten zeigen, dass die Propionat-induzierte Signalisierung die spezifische Hochregulierung von Mitgliedern der IFIT-Genfamilie in einer Zelltyp-spezifischen Weise induziert, um frühe proinflammatorische Immunreaktionen zu kontrollieren, indem ein negativer Rückkopplungsmechanismus für die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren induziert wird, um den Wirt vor einer übermäßigen und verlängerten Entzündungsreaktion zu schützen. Die TLR-Toleranz wird durch mehrere Mechanismen erreicht, zum Beispiel unter Beteiligung negativer intrazellulärer Regulatoren wie A20, IRAK-M, SOCS-1 sowie TRIM30 (123, 124). Die Propionat induzierte IFIT1, IFIT2 oder IFIT3 Expression hemmt die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (TNF, CXCL2) bei TLR1/2 und TLR4 Restimulation und führt zu einer Kreuztoleranz bezüglich TLR-induzierter Zytokinproduktion (Abbildung 25-31).

Wie bereits in der Literatur beschrieben, reduziert die Vorbehandlung von Monozyten mit dem TLR4 Agonisten LPS die Expression von MHC-Klasse-II (HLA-DR) Molekülen auf diesen Zellen (94). Dementsprechend konnten wir zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Propionat die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen auf THP-1 Zellen im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen stark reduziert. Die Propionat vermittelten Signale induzieren somit eine Kreuztoleranz bezüglich einer TLR-induzierten Zytokin- und MHC-Klasse-II Expression (Abbildung 28). Die verminderte Expression von MHC-Klasse-II Molekülen führt zu einer eingeschränkten Antigenpräsentation dieser Zellen (119).

Diskussion

Basierend auf unseren Erkenntnissen, dass Propionat eine Kreuztoleranz in Epithelzellen und Zellen myeloischen Ursprungs induziert, ist es verlockend zu spekulieren, dass mikrobielle Metaboliten, im speziellen Propionat, mit einer Vielzahl von Immun- und Nicht-Immunzellen interagieren und kommunizieren, um Entzündungsreaktionen zu kontrollieren und gegenzuregulieren. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob Veränderungen in der mikrobiellen Diversität des Wirts direkten Einfluss auf die Kontrolle von Entzündungsreaktionen *in vivo* nehmen.

5.2.3 Propionat induziert eine erhöhte antivirale Aktivität in Epithelzellen und Makrophagen

Unsere Versuche zeigen, dass die kurzkettige Fettsäure Propionat die Expression vieler ISG induziert. Die gesamte Ifit-Genfamilie in murinen primären Kolonepithelzellen und der Epithelzellinie CMT-93 werden durch Propionat hochreguliert als auch IFIT1 und IFIT2 in humanen Lungenepithelzellen, und IFIT1-IFIT3 in monozytären THP-1 Zellen und primären Blutmakrophagen. Darüber hinaus fanden wir die Expression von ISG15, MX1 und OASL2 durch Propionat Stimulation erhöht (Abbildung 33 bis Abbildung 36). Im Gegensatz dazu scheint es, als würde Butyrat zwar die globale Expression von über 800 Genen erhöhen, jedoch die Expression spezifischer antiviraler ISG zu unterdrückt (125).

Das Ubiquitin-ähnliche Protein ISG15 ist eines von Hunderten von Interferon stimulierten Genen, dass als Antwort auf eine virale Infektion hochreguliert wird. Es spielt eine zentrale Rolle in der antiviralen Antwort des Wirts durch die Hemmung der viralen Replikation. Außerdem nimmt man an, dass ISG15 die Reperaturreaktion, die Immunantwort und weitere Signalwege des Wirts moduliert (126). Wir konnten zeigen, dass ISG15 sowohl in primären Epithelzellen, in CMT-93 und in A549 Zellen als auch in THP-1 Zellen nach Propionat Behandlung induziert wird.

Ein weiterer Schlüsselmediator der Interferon-induzierten antiviralen Antwort gegen eine Vielzahl von Viren, ist das Myxovirus-Resistenzprotein 1 (MX1; MxA). Die Expression von MX1 wird streng durch Typ I und Typ III IFN reguliert und ist nicht direkt durch Viren oder andere Stimuli induzierbar (127). Dies korreliert mit unseren Ergebnissen, dass Propionat die IFN Typ I und Typ III Expression zelltypspezifisch induzieren kann. Interessanterweise induziert Propionat in den Epithelzelllinien CMT-93 und A549 als auch in monozytären THP-1 Zellen und primären Blutmakrophagen die Expression von MX1.

Virusinfektionen können im Zytoplasma durch das Retinsäure-induzierbare Gen I (RIG-I) wahrgenommen werden, das RNA- und Polyubiquitin-Bindung benötigt, um Typ-I-Interferon (IFN) zu induzieren und die zelluläre angeborene Immunantwort aktiviert. Das

Diskussion

IFN induzierbare humane Oligoadenylat-Synthetasen-ähnliche (OASL) Protein und sein Maus-Ortholog Oasl2, besitzen eine antivirale Aktivität und vermitteln die RIG-I-Aktivierung durch Nachahmung von Polyubiquitin. Man nimmt an, dass die Expression von OASL die Replikation einer Reihe von Viren in einer RIG-I-abhängigen Weise unterdrückt (128, 129). Wir konnten zeigen, dass Oasl2 in murinen primären IEC und in der Kolonepithelzellinie CMT-93 durch eine Behandlung mit Propionat induziert wird.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde bereits gezeigt, dass Mäuse, denen fermentierbare Ballaststoffe über die Nahrung zugeführt wurden, bei einer Influenza Virusinfektion bessere Überlebenschancen hatten. Es wird vermutet, dass es durch die ballaststoffreiche Nahrung (HFD) zu einer verstärkten Bildung von Ly6c patrouillierenden Monozyten kommt und die Effektorfunktion der CD8+ T-Zellen durch die kurzkettigen Fettsäuren verbessert wird. Folglich stellen fermentierbare Ballaststoffe und kurzkettige Fettsäuren in der Nahrung ein immunologisches Gleichgewicht her, das die angeborene und adaptive Immunreaktion ausgleicht, um die Auflösung der Influenza-Infektion zu fördern und gleichzeitig immunassoziierte Pathologie zu verhindern (130).

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Propionat verschiedene Zelltypen vor einer Infektion mit VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikeln schützt. Basierend auf unseren bisherigen Daten gehen wir davon aus, dass durch eine Vorstimulation mit der kurzkettigen Fettsäure Propionat sowohl von Epithelzellen, Zellen myeloiden Ursprungs und auch primären humanen Makrophagen das Eindringen und die Replikation der Virus Partikel stark verringert wird (Abbildung 37-40). Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch begründen, dass Propionat antivirale Gene wie IFIT1, IFIT2, IFIT3, ISG15, MX1 oder Oasl2 induziert. Welche der durch IFN-induzierten Gene letztlich für die erhöhte antivirale Aktivität verantwortlich sind, kann abschließend nicht eindeutig bestimmt werden.

Des Weiteren konnte mit Hilfe des VSV*∆G(Luc)-Replikon Modelsystems der Nachweis erbracht werden, dass die Stimulierung mit Propionat zu einer Freisetzung von bioaktiven IFN in den entsprechenden Zielzellen führt.

Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt der Arbeit könnten die Grundlage bilden für weiterführende Experimente in denen die prophylaktische oder therapeutische Wirkung von Propionat auf Virus-infizierte Zellen untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass kurzkettige Fettsäuren (SCFA) eine wichtige Rolle sowohl beim Erhalt der Gesundheit als auch bei der Entstehung von Krankheiten spielen. Wir konnten zeigen, dass sich durch die Überexpression des antimikrobiellen Peptids hReg3 α in transgenen Mäusen die bakterielle Zusammensetzung von gram-positiven *Firmicutes* hin zu gram-negativen *Verrucomicrobia* verändert. Die meisten Spezies aus dem Stamm der *Firmicutes* sind als Butyrat-Produzenten bekannt, wohingegen zum Beispiel *Akkermansia muciniphila* aus dem Stamm der *Verrucomicrobia* zu den Propionat-Produzenten gehört. Die Abnahme des Stammes der *Firmicutes* und die Zunahme des Stammes der *Verrucomicrobia* korreliert mit der Abnahme der Butyratkonzentration und der Zunahme der Propionatkonzentration im Kot von hReg3 α transgenen Mäusen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften von Propionat. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Propionat Konzentration, zu einer signifikant erhöhten Induktion der Expression von Interferon Stimulierten Genen (ISG) führt.

Wir konnten zeigen, dass in murinen Kolonepithelzellen (CMT-93), humanen Lungenepithelzellen (A549), humanen monozytären Zellen (THP-1), sowie in primären, peripheren Blutmakrophagen (PBM) Propionat und Butyrat die Expression von Mitgliedern der IFIT-Genfamilie induzieren. Unsere Daten zeigen, dass die Induktion von ISG durch Propionat über den Ga_{q/11}-Signalweg des G-Protein gekoppelten Rezeptors FFAR2 in einer IFN Typ I (IFN α) und IFN Typ III (IFN λ)-abhängigen Weise (JAK/STAT-Signalweg) vermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit Propionat oder dem IFNAR2 Agonisten RO8191 eine Kreuztoleranz gegenüber der Stimulierung mit TLR1/2 (Pam3CSK4) und TLR4 (LPS) Agonisten induziert werden konnte. Nach der Restimulation mit LPS oder Pam3CSK4 kam es zu einer signifikanten Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (z.B. TNF und CXCL2) sowohl in den untersuchten Epithelzelllinien (CMT-93) als auch in der monozytären Zelllinie THP-1 und den primären PBM. A549 Zellen zeigen eine Propionat-induzierte Kreuztoleranz gegenüber der Stimulierung mit LPS. Interessanterweise scheint die durch Propionat induzierte Expression einzelner Mitglieder der IFIT-Genfamilie ausreichend zu sein, die proinflammatorische Zytokinproduktion als Reaktion auf eine nachfolgende PRR-Stimulation zu hemmen. Darüber hinaus zeigen unsere Daten, dass die Propionat-induzierte IFIT-Expression die MHC-Klasse-II Expression nach erfolgter TLR4 Stimulation hemmt, was zeigt, dass Propionat vermittelte Signale eine Toleranz bezüglich der TLR-induzierten MHC-Klasse-II Expression zu induzieren scheint. Zur Bestimmung einer Relevanz dieser Ergebnisse *in vivo* sind noch weitere Experimente notwendig.

Da nicht nur die IFIT-Genfamilie in den Epithelzellen und in den Zellen myeloiden Ursprungs durch Propionat induziert wurde, sondern auch weitere ISG wie ISG15, MX1 oder OASL2, wurde die antivirale Aktivität in diesen Zellen nach Propionat Stimulierung genauer untersucht. Wir konnten in Infektionsexperimenten mit dem VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon Partikeln zeigen, dass eine Vorstimulation mit Propionat die Infektion und Replikation des VSV* $\Delta G(Luc)$ -Replikon *in vitro* signifikant verringert.

Um die erhaltenen Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren und möglicherweise translational weiter zu entwickeln müssen noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, um die Bedeutung von Propionat in der antiviralen Immunantwort *in vivo* genauer zu bestimmen.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der intestinalen Barriere
Abbildung 2: IFN Typ I und III induzierter JAK/STAT-Signalweg
Abbildung 3: Modell der bakteriziden Funktion von Reg3α22
Abbildung 4: Signalwege der Rezeptoren für kurzkettigen Fettsäuren (SCFA)
Abbildung 5: Immunhistochemische Untersuchung der hReg3a Expression im Dickdarm
von Reg3α transgenen Mäusen55
Abbildung 6: Veränderte mikrobielle Diversität in hReg3atg Mäusen verglichen zu Wildtyp
Mäusen
Abbildung 7: Wildtyp Mäuse und hReg3a transgene Mäuse zeigen eine veränderte
Zusammensetzung der Darmmikrobiota
Abbildung 8: Genexpressionsanalyse von IEC aus hReg3atg Mäusen im Vergleich zu
Wildtyp Mäusen
Abbildung 9: ISG Expression in intestinalen Epithelzellen transgener hReg3a Mäuse 59
Abbildung 10: Kurzkettige Fettsäuren induzieren die Expression von Ifit1, Ifit2 und Ifit3.
Abbildung 11: Einfluss von Propionat auf Ifit1-Reportergenaktivität in CMT-93 Zellen61
Abbildung 12:Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren auf ISRE-Reportergenaktivität in A549
Zellen
Abbildung 13: Induktion der IFIT Expression nach Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren
in A549 Zellen
Abbildung 14: Induktion der IFIT Expression nach Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren
in THP-1 Zellen
Abbildung 15: Induktion der Ifit1 Expression durch Propionat ist IFN-abhängig
Abbildung 16: Propionat und Butyrat induzieren Typ III IFN und dessen Rezeptor IL28RA.
Abbildung 17: Propionat induziert Type I IFN in THP-1 Zellen
Abbildung 18: FACS Analyse von peripheren Blutmakrophagen
Abbildung 19: Induktion der IFIT Expression nach Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren
in PBM

Abbildung 20: FFAR2 Expression auf verschiedenen Zelltypen
Abbildung 21: Propionat erhöht die FFAR2 Expression in verschiedenen Zelltypen 70
Abbildung 22: PTX beeinträchtigt die Propionat-induzierte IFIT1 Expression nicht70
Abbildung 23: Die Propionat-induzierte IFIT1 Expression wird durch den Inhibitor YM-
254890 gehemmt
Abbildung 24: Die Propionat-induzierte IFIT1 Expression ist abhängig vom JAK/STAT
Signalweg72
Abbildung 25: Propionat reguliert die proinflammatorische Immunantwort in CMT-93
Zellen
Abbildung 26: Propionat und RO8191 regulieren die proinflammatorische Immunreaktion
in A549 Zellen
Abbildung 27: Propionat reguliert die proinflammatorische Immunreaktion in THP-1 Zellen.
Abbildung 28: Die Vorstimulierung mit Propionat hemmt die HLA-DR Expression in THP-
1 Zellen
Abbildung 29: Induktion einer Kreuztoleranz in Ifit überexprimierenden CMT-93 Zellen.
Abbildung 30: Induktion einer Kreuztoleranz in IFIT überexprimierenden A549 Zellen. 77
Abbildung 31: Induktion einer Kreuztoleranz in IFIT2 und IFIT3 überexprimierenden THP-
1 Zellen
Abbildung 32: Propionat reguliert die proinflammatorische Immunantwort in PBM 80
Abbildung 33: Propionat induziert die ISG Expression in CMT-93 Zellen
Abbildung 34: Propionat induziert die ISG Expression in A549 Zellen
Abbildung 35: Propionat induziert die ISG Expression in THP-1 Zellen
Abbildung 36: Propionat induziert die Expression von MX1 in PBM
Abbildung 37: Expression des GFP Reportergens durch das VSV* $\Delta G(Luc)$ in CMT-93 und
A549 Zellen
Abbildung 38: Expression des Firefly-Luciferase Reportergens durch das $VSV^*\Delta G(Luc)$ in
CMT-93 und A549 Zellen
Abbildung 39: Expression des GFP Reportergens durch das VSV* $\Delta G(Luc)$ in THP-1 Zellen.
Abbildung 40: Expression des Firefly-Luciferase Reportergens durch VSV*AG(Luc)-
Replikon Partikel in PBM

Literaturverzeichnis

- 1. Shreiner, A. B., J. Y. Kao, and V. B. Young. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 31: 69-75.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J. I. Gordon. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* 449: 804-810.
- 3. Sommer, F., and F. Bäckhed. 2015. The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunology* 8: 372-379.
- Olszak, T., D. An, S. Zeissig, M. P. Vera, J. Richter, A. Franke, J. N. Glickman, R. Siebert, R. M. Baron, D. L. Kasper, and R. S. Blumberg. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336: 489-493.
- Pelaseyed, T., J. H. Bergström, J. K. Gustafsson, A. Ermund, G. M. H. Birchenough, A. Schütte, S. van der Post, F. Svensson, A. M. Rodríguez-Piñeiro, E. E. L. Nyström, C. Wising, M. E. V. Johansson, and G. C. Hansson. 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews* 260: 8-20.
- 6. Faith, J. J., N. P. McNulty, F. E. Rey, and J. I. Gordon. 2011. Predicting a Human Gut Microbiota's Response to Diet in Gnotobiotic Mice. *Science* 333: 101-104.
- 7. Nguyen, T. L., S. Vieira-Silva, A. Liston, and J. Raes. 2015. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech* 8: 1-16.
- Crosnier, C., D. Stamataki, and J. Lewis. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics* 7: 349-359.
- 9. Kim, Y. S., and S. B. Ho. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 319-330.
- 10. Gallo, R. L., and L. V. Hooper. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology* 12: 503-516.
- 11. Peterson, L. W., and D. Artis. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14: 141-153.
- 12. Henson, P. M. 2005. Dampening inflammation. Nat Immunol 6: 1179-1181.
- 13. Tang, D., R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh, and M. T. Lotze. 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249: 158-175.

- Bennett, J. M., G. Reeves, G. E. Billman, and J. P. Sturmberg. 2018. Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases. *Front Med* (*Lausanne*) 5: 316.
- Chen, L., H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, and L. Zhao.
 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9: 7204-7218.
- Moresco, E. M. Y., D. LaVine, and B. Beutler. 2011. Toll-like receptors. *Current Biology* 21: R488-R493.
- 17. Kawasaki, T., and T. Kawai. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5: 461.
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
- 19. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257-263.
- Lin, S. C., Y. C. Lo, and H. Wu. 2010. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465: 885-890.
- Takaoka, A., and H. Yanai. 2006. Interferon signalling network in innate defence. Cellular Microbiology 8: 907-922.
- Hoffmann, H.-H., W. M. Schneider, and C. M. Rice. 2015. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends in Immunology* 36: 124-138.
- LaFleur, D. W., B. Nardelli, T. Tsareva, D. Mather, P. Feng, M. Semenuk, K. Taylor, M. Buergin, D. Chinchilla, V. Roshke, G. Chen, S. M. Ruben, P. M. Pitha, T. A. Coleman, and P. A. Moore. 2001. Interferon-к, a Novel Type I Interferon Expressed in Human Keratinocytes*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 39765-39771.
- Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The human interferon αβ receptor: Characterization and molecular cloning. *Cell* 77: 391-400.
- Kotenko, S. V., G. Gallagher, V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N. K. Shah, J. A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R. P. Donnelly. 2002. IFN-λs mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology* 4: 69-77.
- 26. Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T. E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong,

J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F. J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster, and K. M. Klucher. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology* 4: 63-68.

- Sommereyns, C., S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels. 2008. IFN-Lambda (IFN-λ)
 Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells
 In Vivo. *PLOS Pathogens* 4: e1000017.
- Pott, J., T. Mahlakõiv, M. Mordstein, C. U. Duerr, T. Michiels, S. Stockinger, P. Staeheli, and M. W. Hornef. 2011. IFN-λ determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 7944-7949.
- Zhou, Z., O. J. Hamming, N. Ank, S. R. Paludan, A. L. Nielsen, and R. Hartmann.
 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 81: 7749-7758.
- Koltsida, O., M. Hausding, A. Stavropoulos, S. Koch, G. Tzelepis, C. Übel, S. V. Kotenko, P. Sideras, H. A. Lehr, M. Tepe, K. M. Klucher, S. E. Doyle, M. F. Neurath, S. Finotto, and E. Andreakos. 2011. IL-28A (IFN-λ2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease. *EMBO Molecular Medicine* 3: 348-361.
- Galani, I. E., V. Triantafyllia, E.-E. Eleminiadou, O. Koltsida, A. Stavropoulos, M. Manioudaki, D. Thanos, S. E. Doyle, S. V. Kotenko, K. Thanopoulou, and E. Andreakos. 2017. Interferon-λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* 46: 875-890.e876.
- Broggi, A., Y. Tan, F. Granucci, and I. Zanoni. 2017. IFN-λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nature Immunology* 18: 1084-1093.
- Majoros, A., E. Platanitis, E. Kernbauer-Hölzl, F. Rosebrock, M. Müller, and T. Decker. 2017. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK–STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Frontiers in Immunology* 8: 29.
- Lazear, H. M., J. W. Schoggins, and M. S. Diamond. 2019. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* 50: 907-923.
- 35. Fensterl, V., and G. C. Sen. 2015. Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis. *Journal of virology* 89: 2462-2468.

- Pidugu, V. K., H. B. Pidugu, M. M. Wu, C. J. Liu, and T. C. Lee. 2019. Emerging Functions of Human IFIT Proteins in Cancer. *Front Mol Biosci* 6: 148.
- 37. Hancock, R. E. W., and D. S. Chapple. 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1317-1323.
- 38. Marr, A. K., W. J. Gooderham, and R. E. W. Hancock. 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology* 6: 468-472.
- Yeung, A. T. Y., S. L. Gellatly, and R. E. W. Hancock. 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2161.
- Jenssen, H., P. Hamill, and R. E. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19: 491-511.
- 41. Hancock, R. E. W., A. Nijnik, and D. J. Philpott. 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology* 10: 243-254.
- Bals, R., X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 1998.
 Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102: 874-880.
- 43. Lai, Y., and R. L. Gallo. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* 30: 131-141.
- 44. Okumura, R., and K. Takeda. 2017. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med* 49: e338.
- 45. Cash, H. L., C. V. Whitham, C. L. Behrendt, and L. V. Hooper. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313: 1126-1130.
- 46. Zelensky, A. N., and J. E. Gready. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *Febs j* 272: 6179-6217.
- Hartupee, J. C., H. Zhang, M. F. Bonaldo, M. B. Soares, and B. K. Dieckgraefe.
 2001. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. *Biochim Biophys Acta* 1518: 287-293.
- 48. Gallo, R. L., and L. V. Hooper. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12: 503-516.
- Nata, K., Y. Liu, L. Xu, T. Ikeda, T. Akiyama, N. Noguchi, S. Kawaguchi, A. Yamauchi, I. Takahashi, N. J. Shervani, T. Onogawa, S. Takasawa, and H. Okamoto. 2004. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III. *Gene* 340: 161-170.

- Abe, M., K. Nata, T. Akiyama, N. J. Shervani, S. Kobayashi, T. Tomioka-Kumagai, S. Ito, S. Takasawa, and H. Okamoto. 2000. Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene* 246: 111-122.
- 51. Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. K. Wakeland, and L. V. Hooper. 2011. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334: 255-258.
- 52. Vaishnava, S., C. L. Behrendt, A. S. Ismail, L. Eckmann, and L. V. Hooper. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 20858-20863.
- Mukherjee, S., H. Zheng, M. G. Derebe, K. M. Callenberg, C. L. Partch, D. Rollins, D. C. Propheter, J. Rizo, M. Grabe, Q. X. Jiang, and L. V. Hooper. 2014. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* 505: 103-107.
- 54. Mukherjee, S., and L. V. Hooper. 2015. Antimicrobial defense of the intestine. *Immunity* 42: 28-39.
- 55. Beeson. 1947. TOLERANCE TO BACTERIAL PYROGENS : I. FACTORS INFLUENCING ITS DEVELOPMENT Journal of Experimental Medicine.
- 56. Foster, S. L., and R. Medzhitov. 2009. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 130: 7-15.
- 57. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
- 58. Cook, D. N., D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5: 975-979.
- 59. Wimmer, N., B. Huber, N. Barabas, J. Rohrl, K. Pfeffer, and T. Hehlgans. 2012. Lymphotoxin beta receptor activation on macrophages induces cross-tolerance to TLR4 and TLR9 ligands. *J Immunol* 188: 3426-3433.
- 60. Morrison, D. J., and T. Preston. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7: 189-200.
- 61. den Besten, G., K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D.-J. Reijngoud, and B. M. Bakker. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* 54: 2325-2340.

- 62. Høverstad, T., and T. Midtvedt. 1986. Short-Chain Fatty Acids in Germfree Mice and Rats. *The Journal of Nutrition* 116: 1772-1776.
- 63. Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam, and D. J. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40: 235-243.
- 64. Louis, P., and H. J. Flint. 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* 19: 29-41.
- 65. Duncan, S. H., A. Barcenilla, C. S. Stewart, S. E. Pryde, and H. J. Flint. 2002. Acetate Utilization and Butyryl Coenzyme A (CoA):Acetate-CoA Transferase in Butyrate-Producing Bacteria from the Human Large Intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5186-5190.
- 66. Tazoe, H., Y. Otomo, I. Kaji, R. Tanaka, S. I. Karaki, and A. Kuwahara. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. J Physiol Pharmacol 59 Suppl 2: 251-262.
- Donohoe, D. R., N. Garge, X. Zhang, W. Sun, T. M. O'Connell, M. K. Bunger, and S. J. Bultman. 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 13: 517-526.
- De Filippo, C., D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart,
 S. Collini, G. Pieraccini, and P. Lionetti. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 14691-14696.
- 69. Xiong, Y., N. Miyamoto, K. Shibata, M. A. Valasek, T. Motoike, R. M. Kedzierski, and M. Yanagisawa. 2004. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S* A 101: 1045-1050.
- Sanders, M. E. 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 2: S58-61; discussion S144-151.
- Cheng, F. S., D. Pan, B. Chang, M. Jiang, and L. X. Sang. 2020. Probiotic mixture VSL#3: An overview of basic and clinical studies in chronic diseases. *World J Clin Cases* 8: 1361-1384.
- 72. MacDonald, V. E., and L. J. Howe. 2009. Histone acetylation: where to go and how to get there. *Epigenetics* 4: 139-143.
- Kim, H. J., and S. C. Bae. 2011. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 3: 166-179.

- 74. Marinissen, M. J., and J. S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22: 368-376.
- Haack, K. K. V., and N. A. McCarty. Functional Consequences of GPCR Heterodimerization: GPCRs as Allosteric Modulators. Pharmaceuticals (Basel).
 2011 Mar 14;4(3):509-23. doi: 10.3390/ph4030509. eCollection 2011 Mar.
- 76. Premont, R. T., and R. R. Gainetdinov. 2007. Physiological roles of G proteincoupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 511-534.
- Kimura, I., A. Ichimura, R. Ohue-Kitano, and M. Igarashi. 2020. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiological Reviews* 100: 171-210.
- Le Poul, E., C. Loison, S. Struyf, J. Y. Springael, V. Lannoy, M. E. Decobecq, S. Brezillon, V. Dupriez, G. Vassart, J. Van Damme, M. Parmentier, and M. Detheux. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* 278: 25481-25489.
- 79. Hudson, B. D., I. G. Tikhonova, S. K. Pandey, T. Ulven, and G. Milligan. 2012. Extracellular ionic locks determine variation in constitutive activity and ligand potency between species orthologs of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *J Biol Chem* 287: 41195-41209.
- 80. Brown, A. J., S. M. Goldsworthy, A. A. Barnes, M. M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, A. I. Muir, M. J. Wigglesworth, I. Kinghorn, N. J. Fraser, N. B. Pike, J. C. Strum, K. M. Steplewski, P. R. Murdock, J. C. Holder, F. H. Marshall, P. G. Szekeres, S. Wilson, D. M. Ignar, S. M. Foord, A. Wise, and S. J. Dowell. 2003. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278: 11312-11319.
- Shimada, Y., M. Kinoshita, K. Harada, M. Mizutani, K. Masahata, H. Kayama, and K. Takeda. 2013. Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS One* 8: e80604.
- Douros, J. D., and J. E. Campbell. 2019. Reg3 Proteins as Gut Hormones? Don't Be Hasty. *Endocrinology* 160: 1677-1678.
- 83. Brandl, K., G. Plitas, B. Schnabl, R. P. DeMatteo, and E. G. Pamer. 2007. MyD88mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection. *J Exp Med* 204: 1891-1900.
- 84. Meraro, D., M. Gleit-Kielmanowicz, H. Hauser, and B. Z. Levi. 2002. IFNstimulated gene 15 is synergistically activated through interactions between the myelocyte/lymphocyte-specific transcription factors, PU.1, IFN regulatory factor-

8/IFN consensus sequence binding protein, and IFN regulatory factor-4: characterization of a new subtype of IFN-stimulated response element. *J Immunol* 168: 6224-6231.

- 85. Steen, H. C., and A. M. Gamero. 2013. STAT2 phosphorylation and signaling. *Jakstat* 2: e25790.
- Wettschureck, N., and S. Offermanns. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204.
- 87. Konishi, H., K. Okamoto, Y. Ohmori, H. Yoshino, H. Ohmori, M. Ashihara, Y. Hirata, A. Ohta, H. Sakamoto, N. Hada, A. Katsume, M. Kohara, K. Morikawa, T. Tsukuda, N. Shimma, G. R. Foster, W. Alazawi, Y. Aoki, M. Arisawa, and M. Sudoh. 2012. An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication. *Sci Rep* 2: 259.
- Yang, L. P., and G. M. Keating. 2012. Ruxolitinib: in the treatment of myelofibrosis. Drugs 72: 2117-2127.
- Mears, H. V., E. Emmott, Y. Chaudhry, M. Hosmillo, I. G. Goodfellow, and T. R. Sweeney. 2019. Ifit1 regulates norovirus infection and enhances the interferon response in murine macrophage-like cells. *Wellcome Open Res* 4: 82.
- 90. John, S. P., J. Sun, R. J. Carlson, B. Cao, C. J. Bradfield, J. Song, M. Smelkinson, and I. D. C. Fraser. 2018. IFIT1 Exerts Opposing Regulatory Effects on the Inflammatory and Interferon Gene Programs in LPS-Activated Human Macrophages. *Cell Rep* 25: 95-106 e106.
- Berchtold, S., B. Manncke, J. Klenk, J. Geisel, I. B. Autenrieth, and E. Bohn. 2008.
 Forced IFIT-2 expression represses LPS induced TNF-alpha expression at posttranscriptional levels. *BMC Immunol* 9: 75.
- 92. da Silva, J. B., E. Carvalho, A. E. Covarrubias, A. T. Ching, V. G. Mattaraia, D. Paiva, M. de Franco, R. D. Fávaro, M. M. Pereira, S. Vasconcellos, T. T. Zorn, P. L. Ho, and E. A. Martins. 2012. Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic Leptospira. *Microb Pathog* 52: 206-216.
- 93. Beutler, B. 2004. SHIP, TGF-beta, and endotoxin tolerance. *Immunity* 21: 134-135.
- 94. del Fresno, C., F. Garcia-Rio, V. Gomez-Pina, A. Soares-Schanoski, I. Fernandez-Ruiz, T. Jurado, T. Kajiji, C. Shu, E. Marin, A. Gutierrez del Arroyo, C. Prados, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, S. K. Biswas, and E. Lopez-Collazo. 2009. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying
lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 182: 6494-6507.

- 95. Sarkar, S. N., and G. C. Sen. 2004. Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacology & Therapeutics* 103: 245-259.
- 96. Takeuchi, O., and S. Akira. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227: 75-86.
- 97. Schoggins, J. W., and C. M. Rice. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1: 519-525.
- 98. Berger Rentsch, M., and G. Zimmer. 2011. A vesicular stomatitis virus repliconbased bioassay for the rapid and sensitive determination of multi-species type I interferon. *PLoS One* 6: e25858.
- Kalhoro, N. H., J. Veits, S. Rautenschlein, and G. Zimmer. 2009. A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). *Vaccine* 27: 1174-1183.
- 100. Harris, A. C., J. L. Ferrara, T. M. Braun, E. Holler, T. Teshima, J. E. Levine, S. W. Choi, K. Landfried, K. Akashi, M. Vander Lugt, D. R. Couriel, P. Reddy, and S. Paczesny. 2012. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* 119: 2960-2963.
- Ferrara, J. L., A. C. Harris, J. K. Greenson, T. M. Braun, E. Holler, T. Teshima, J. E. Levine, S. W. Choi, E. Huber, K. Landfried, K. Akashi, M. Vander Lugt, P. Reddy, A. Chin, Q. Zhang, S. Hanash, and S. Paczesny. 2011. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118: 6702-6708.
- 102. Lai, Y., D. Li, C. Li, B. Muehleisen, K. A. Radek, H. J. Park, Z. Jiang, Z. Li, H. Lei, Y. Quan, T. Zhang, Y. Wu, P. Kotol, S. Morizane, T. R. Hata, K. Iwatsuki, C. Tang, and R. L. Gallo. 2012. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity* 37: 74-84.
- 103. Spencer, J. D., A. R. Jackson, B. Li, C. B. Ching, M. Vonau, R. S. Easterling, A. L. Schwaderer, K. M. McHugh, and B. Becknell. 2015. Expression and Significance of the HIP/PAP and RegIIIgamma Antimicrobial Peptides during Mammalian Urinary Tract Infection. *PLoS One* 10: e0144024.
- 104. Gironella, M., J. L. Iovanna, M. Sans, F. Gil, M. Penalva, D. Closa, R. Miquel, J. M. Pique, and J. Panes. 2005. Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 54: 1244-1253.

- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Doré, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork, S. D. Ehrlich, and J. Wang. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65.
- 106. Magne, F., M. Gotteland, L. Gauthier, A. Zazueta, S. Pesoa, P. Navarrete, and R. Balamurugan. 2020. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 12.
- 107. Huang, K., M. M. Wang, A. Kulinich, H. L. Yao, H. Y. Ma, J. E. R. Martínez, X. C. Duan, H. Chen, Z. P. Cai, S. L. Flitsch, L. Liu, and J. Voglmeir. 2015. Biochemical characterisation of the neuraminidase pool of the human gut symbiont Akkermansia muciniphila. *Carbohydrate Research* 415: 60-65.
- 108. Ottman, N., L. Huuskonen, J. Reunanen, S. Boeren, J. Klievink, H. Smidt, C. Belzer, and W. M. de Vos. 2016. Characterization of Outer Membrane Proteome of Akkermansia muciniphila Reveals Sets of Novel Proteins Exposed to the Human Intestine. *Front Microbiol* 7: 1157.
- Macfarlane, S., and G. T. Macfarlane. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62: 67-72.
- Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747.
- 111. Kimple, M. E., J. C. Neuman, A. K. Linnemann, and P. J. Casey. 2014. Inhibitory G proteins and their receptors: emerging therapeutic targets for obesity and diabetes. *Exp Mol Med* 46: e102.
- Ichimura, A., S. Hasegawa, M. Kasubuchi, and I. Kimura. 2014. Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes. *Front Pharmacol* 5: 236.
- 113. Hong, Y.-H., Y. Nishimura, D. Hishikawa, H. Tsuzuki, H. Miyahara, C. Gotoh, K.-C. Choi, D. D. Feng, C. Chen, H.-G. Lee, K. Katoh, S.-G. Roh, and S. Sasaki. 2005. Acetate and Propionate Short Chain Fatty Acids Stimulate Adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 146: 5092-5099.

- Kotenko, S. V., and J. A. Langer. 2004. Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int Immunopharmacol* 4: 593-608.
- 115. Huang, J., S. V. Smirnov, A. Lewis-Antes, M. Balan, W. Li, S. Tang, G. V. Silke, M. M. Pütz, G. L. Smith, and S. V. Kotenko. 2007. Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9822-9827.
- Stanifer, M. L., K. Pervolaraki, and S. Boulant. 2019. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *Int J Mol Sci* 20.
- 117. Duscha, A., B. Gisevius, S. Hirschberg, N. Yissachar, G. I. Stangl, E. Eilers, V. Bader, S. Haase, J. Kaisler, C. David, R. Schneider, R. Troisi, D. Zent, T. Hegelmaier, N. Dokalis, S. Gerstein, S. Del Mare-Roumani, S. Amidror, O. Staszewski, G. Poschmann, K. Stuhler, F. Hirche, A. Balogh, S. Kempa, P. Trager, M. M. Zaiss, J. B. Holm, M. G. Massa, H. B. Nielsen, A. Faissner, C. Lukas, S. G. Gatermann, M. Scholz, H. Przuntek, M. Prinz, S. K. Forslund, K. F. Winklhofer, D. N. Muller, R. A. Linker, R. Gold, and A. Haghikia. 2020. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* 180: 1067-1080 e1016.
- Bachem, A., C. Makhlouf, K. J. Binger, D. P. de Souza, D. Tull, K. Hochheiser, P. G. Whitney, D. Fernandez-Ruiz, S. Dahling, W. Kastenmuller, J. Jonsson, E. Gressier, A. M. Lew, C. Perdomo, A. Kupz, W. Figgett, F. Mackay, M. Oleshansky, B. E. Russ, I. A. Parish, A. Kallies, M. J. McConville, S. J. Turner, T. Gebhardt, and S. Bedoui. 2019. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8(+) T Cells. *Immunity* 51: 285-297 e285.
- Vergadi, E., K. Vaporidi, and C. Tsatsanis. 2018. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Front Immunol* 9: 2705.
- 120. De Filippo, K., R. B. Henderson, M. Laschinger, and N. Hogg. 2008. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol* 180: 4308-4315.
- 121. Kendrick, S. F., G. O'Boyle, J. Mann, M. Zeybel, J. Palmer, D. E. Jones, and C. P. Day. 2010. Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 51: 1988-1997.

- 122. Usami, M., K. Kishimoto, A. Ohata, M. Miyoshi, M. Aoyama, Y. Fueda, and J. Kotani. 2008. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr Res* 28: 321-328.
- Mansell, A., R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson,
 D. J. Hilton, L. A. O'Neill, and P. J. Hertzog. 2006. Suppressor of cytokine signaling
 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7: 148-155.
- 124. Wimmer, N., B. Huber, N. Barabas, J. Röhrl, K. Pfeffer, and T. Hehlgans. 2012. Lymphotoxin β receptor activation on macrophages induces cross-tolerance to TLR4 and TLR9 ligands. *J Immunol* 188: 3426-3433.
- Chemudupati, M., A. D. Kenney, A. C. Smith, R. J. Fillinger, L. Zhang, A. Zani, S. L. Liu, M. Z. Anderson, A. Sharma, and J. S. Yount. 2020. Butyrate Reprograms Expression of Specific Interferon-Stimulated Genes. *J Virol* 94.
- 126. Perng, Y. C., and D. J. Lenschow. 2018. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol* 16: 423-439.
- Haller, O., and G. Kochs. 2011. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* 31: 79-87.
- 128. Zhu, J., Y. Zhang, A. Ghosh, Rolando A. Cuevas, A. Forero, J. Dhar, Mikkel S. Ibsen, Jonathan L. Schmid-Burgk, T. Schmidt, Madhavi K. Ganapathiraju, T. Fujita, R. Hartmann, S. Barik, V. Hornung, Carolyn B. Coyne, and Saumendra N. Sarkar. 2014. Antiviral Activity of Human OASL Protein Is Mediated by Enhancing Signaling of the RIG-I RNA Sensor. *Immunity* 40: 936-948.
- 129. Ghosh, A., L. Shao, P. Sampath, B. Zhao, N. V. Patel, J. Zhu, B. Behl, R. A. Parise, J. H. Beumer, R. J. O'Sullivan, N. A. DeLuca, S. H. Thorne, V. A. K. Rathinam, P. Li, and S. N. Sarkar. 2019. Oligoadenylate-Synthetase-Family Protein OASL Inhibits Activity of the DNA Sensor cGAS during DNA Virus Infection to Limit Interferon Production. *Immunity* 50: 51-63.e55.
- 130. Trompette, A., E. S. Gollwitzer, C. Pattaroni, I. C. Lopez-Mejia, E. Riva, J. Pernot, N. Ubags, L. Fajas, L. P. Nicod, and B. J. Marsland. 2018. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c(-) Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8(+) T Cell Metabolism. *Immunity* 48: 992-1005 e1008.

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Thomas Hehlgans**, der mir dieses interessante Thema zu Verfügung gestellt hat und mich während der Zeit meiner Arbeit unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank auch für das allzeit offene Ohr bei Problemen und Fragen, sowie die vielen Vorschläge und Anregungen.

Ein großer Dank gilt auch meinen Mentoren **Prof. Dr. Wulf Schneider, Prof. Dr. Ernst Holler und Prof. Dr. Charalampos Aslanidis** für die konstruktive Kritik, wertvollen Ratschläge und die Diskussionsbereitschaft auch während der Seminare.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt **Dorothea Weber-Steffens** für die tägliche, tatkräftige Unterstützung. Danke, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast. Mit dir hat die Arbeit doppelt so viel Spaß gemacht!

Dank an alle Mitglieder des Lehrstuhls Immunologie, für die gute Stimmung und Hilfestellungen. Danke vor allem an Prof. Dr. Markus Feuerer, für die wertvollen Ratschläge und Diskussionsbereitschaft während den Seminaren. Danke an Sebastian Bittner, Michael Delacher und Lisa Schmidleithner für die wertvollen Ratschläge. Mein besonderer Dank gilt Kathrin Schambeck für die tatkräftige Unterstützung im Labor und den Zuspruch während den Kaffeepausen. Dank auch an Dania Riegel und Severin Gütter für eure Unterstützung. Ein weiterer besonderer Dank gilt Sandra Huber für ihr offenes Ohr und das Teilen der Leidenschaft für die Berge und das Rennradfahren.

Dank auch an Alice Peuker, für den unermüdlichen Nachschub an primären humanen Makrophagen sowie Rudolf Jung für die Färbung von histologischen Schnitten. Danke auch an Rebecca Fechter für die Unterstützung bei den Mikrobiomanalysen.

Dank an meine Freunde, ihr seid die Besten.

Dank gilt **Tom**, für das tägliche Mut machen und die unermüdliche Unterstützung. Danke, dass du immer für mich da bist.

Ganz herzlicher Dank gilt schließlich **meiner Familie** für die anhaltende Unterstützung und den ermutigenden Zuspruch in jeder Phase meines Studiums. **Mama**, **Papa**, **Andrea**, **Theresa**, **Sebastian** und **Erick** ohne euch wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin.

9 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Christina Fischer
Geburtstag/-ort:	02.03.1992 in Prien am Chiemsee
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Akademische Ausbildung:

5/2018-heute	Promotion , Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Hehlgans, Lehrstuhl für Immunologie, Universität Regensburg, Bayern
	Thema: "Modulation der angeborenen Immunantwort durch mikrobielle Metaboliten"
	Angestrebter Abschluss: Dr. rer. physiol.
4/2016-4/2018	Masterstudium Biologie, Universität Regensburg, Bayern Studienschwerpunkte: Biochemie, Evolutionsbiologie/Molekulare Ökologie und Immunologie Master of Science (Note: 1,2)
	Masterarbeit, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Hehlgans; Lehrstuhl für Immunologie, Universität Regensburg, Bayern
	Themensteller: Prof. Dr. C. Aslanidis, Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Thema: "Funktionelle Charakterisierung des antimikrobiellen Peptids hReg3α" (Note: 1,3)
10/2012-3/2016	Bachelorstudium Biologie , Universität Regensburg, Bayern Bachelor of Science (Note: 2,4)
	Bachelorarbeit, Arbeitsgruppe Dr. Attila Németh, Lehrstuhl für Biochemie, Universität Regensburg, Bayern
	Thema: "Quantitative Analyse der Veränderungen der posttranslationalen Histon H3- und H3K9-Modifikationen und des Lamin Proteinlevels in der Zellalterung" (Note:1,0)
10/2011-07/2012	Bachelorstudium Medizinische Informatik , Fachhochschule Regensburg, Bayern 2 Semester

Lebenslauf

Schule:

2002-2011	Ludwig-Thoma Gymnasium, Prien am Chiemsee
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1998-2002	Grundschule Rimsting

Manuskript, das im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist:

"Propionate induces cross-tolerance to TLR 1/2 and TLR4 agonists in an IFIT-dependent manner" (Manuskript eingereicht)

Ein weiteres Manuskript ist in Arbeit.

Poster:

"Reg3α impairs intestinal epithelial cell regeneration by inducing alterations in microbial diversity and bacterial metabolite production", Gordon Research Conferences: Antimicrobial Peptides, 24.02.-01.03 2019, Lucca, Italien.