

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie

Direktoren:

(Prof. Dr. med. Stefan Schreiber)

(Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel)

(Prof. Dr. rer. nat. Andre Franke)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Microbial regulation of hexokinase 2 and its impact on inflammation

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Finn Christian Hinrichsen

aus **Kiel**

Kiel, 2024

1. Berichterstatter: PD. Dr. rer. nat. Felix Sommer
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Petra Bacher
3. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Silvio Waschina

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.09.2025

Gez.: PD. Dr. rer. nat. Felix Sommer

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
II. Abbildungsverzeichnis	VII
III. Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Vorwort	1
1.2 Das Mikrobiom	2
1.2.1 Vorwort Mikrobiom	2
1.2.2 Das intestinale Mikrobiom	3
1.2.3 Kurzkettige Fettsäuren: Mikrobielle Metabolite mit vielfältigen Funktionen	4
1.2.4 Miteinander verbunden: Die Interaktionen zwischen Mensch und Mikrobiom	5
1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)	7
1.3.1 Vorwort CED	7
1.3.2 Epidemiologie	7
1.3.3 Ätiologie	8
1.3.4 Klinische Manifestationen	9
1.3.5 Diagnostik	9
1.3.6 Therapie	10
1.3.7 Intestinale Homöostase durch intestinale Epithelzellen und ihre Bedeutung für CED	11
1.3.8 Das Mikrobiom bei CED	12
1.4 Hexokinase 2	15
1.4.1 Das Mikrobiom reguliert Hexokinase 2	15
1.4.2 Funktion und Vorkommen der Hexokinasen	16
1.4.3 HK2 in Tumorerkrankungen	17
1.4.4 HK2 als Teil des Immunsystems	17
1.4.5 Die Rolle von HK2 im intestinalen Epithel	18
1.4.6 Intestinale HK2-Deletion schützt vor Colitis	18
1.4.7 HK2 Schnittstelle zwischen mitochondrialen Metabolismus mit Zelltod	19
1.4.8 Zusammenfassung zur Rolle von HK2	20
1.5 Ziele und Hypothesen der Arbeit	22
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.2 Zellkultur	23
2.2.1 Caco-2 Zellkultur	23
2.2.2 HT-29 Zellkultur	24
2.2.3 Herstellung eines Caco-2 ^{ΔHK2} CRISPR Klons	25
2.3 Intestinale Organoide	26
2.3.1 Gewinnung von intestinalen Organoiden	26
2.3.2 Noggin-konditioniertes Medium	27
2.3.3 R-Spondin-1-konditioniertes Medium	28
2.3.4 L-WRN-konditioniertes Medium	28
2.3.5 Kultur von intestinalen Organoiden	29
2.4 Zellbiologische Methoden	31
2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	31
2.4.2 Seahorseanalyse Caco-2	31
2.4.3 Seahorseanalyse intestinale Organoide	32
2.5 Molekularbiologische Methoden	33
2.5.1 mRNA-Isolation	33
2.5.2 cDNA-Synthese	33
2.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	34
2.5.4 Transfektion von small interfering RNA (siRNA)	35
2.6 Proteinbiochemische Methoden	36
2.6.1 Proteinisolation aus Zellen und Organoiden	36
2.6.2 Messung der Proteinkonzentration	36
2.6.3 Protein-Gelelektrophorese	37
2.6.4 Western Blot Analyse	37

2.7	In silico Methoden	39
2.7.1	Sanger-Sequenzierung	39
2.7.2	Quantifizierung von kurzkettigen Fettsäuren	40
2.7.3	Metabolisches Modell der Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch OMM-Bakterien	41
2.8	Histologie und Immunfärbungen	41
2.8.1	Verarbeitung und Fixation von Gewebe	41
2.8.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	41
2.8.3	Histologischer Inflammations-Score	42
2.8.4	Immunhistochemie	43
2.8.5	TUNEL-Färbung	44
2.9	Bakterienkultur	44
2.9.1	Bestandteile und in vitro Kultur von Bakterien	44
2.10	Tierversuche	46
2.10.1	Etablierung der Hk2 ^{ΔIEC} -Mauslinie	46
2.10.2	Tierhaltung und Tierwohl	46
2.10.3	Genotypisierung der Versuchstiere	46
2.10.4	Agarose-Gelelektrophorese	47
2.10.5	Basale Phänotypisierung und Organentnahmen	48
2.10.6	DSS-induzierte Colitis	48
2.10.7	Interventionen mit kurzkettigen Fettsäuren	49
2.10.8	Gnotobiotische Tierversuche	50
2.11	Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Einfluss der Mikrobiota auf die Hk2-Expression: Nicht alle Bakterien sind gleich	52
3.2	Die mikrobielle Modulation von Hk2 ist spezieabhängig	53
3.3	Metabolisches Modeling der Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch OMM	54
3.4	Kurzkettige Fettsäuren verändern die Expression von HK2 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	57
3.5	Butyrat induzierte Modulation von HK2 verläuft nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	59
3.6	Butyrat vermindert die Expression von HK2 über HDAC8	60
3.7	Der Verlust von HK2 mindert die Anfälligkeit für Zelltod <i>ex vivo</i>	61
3.8	Keine signifikante Veränderung der mitochondrialen Atmung durch den Verlust von HK2 in einem biologischen Replikat intestinaler Organoide	62
3.9	Butyrat reduziert die mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von HK2	64
3.10	Kurzkettige Fettsäuren modulieren den Verlauf einer murinen Colitis	65
3.11	Die epitheliale Deletion von HK2 verhindert Butyrat effekt auf Colitis	68
4	Diskussion	70
4.1	Identifikation der mikrobiellen Regulation von HK2	71
4.2	Analyse des Signalwegs zwischen Butyrat und HK2	73
4.3	Kurzkettige Fettsäuren: HK2-abhängige mikrobielle Therapeutika	75
4.4	Limitationen der Studie	78
4.5	Infektion, Entzündung, Tumor – One Size fits all?	81
4.6	Zeitalter der gezielten Mikrobiom-Therapie ?	84
4.7	Zukunftsvision – HK2 als Biomarker und therapeutisches Ziel.	87
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	93
7	Anhang	110
7.1	Angaben über genutzten Materialien	110
7.1.1	Antikörper	110
7.1.2	Bakterienstämme	110
7.1.3	Biologische Proben	110
7.1.4	Labormaterialien	111
7.1.5	Kritische kommerzielle Tests	113
7.1.6	Zelllinien	114
7.1.7	Organismen	114
7.1.8	Oligonukleotide	115
7.1.9	Rekombinante DNA	115

7.1.10	<i>Software und Algorithmen</i>	115
7.1.11	<i>Hardware</i>	116
7.1.12	<i>Versuchstierdiäten</i>	116
7.2	Danksagung	117
7.3	Eidesstaatliche Erklärung	118
7.4	Publikationen und wissenschaftliche Präsentationen	119
7.4.a.	<i>Publikationen</i>	119
7.4.b.	<i>Vorträge im Rahmen der Dissertation</i>	122
7.4.c.	<i>Posterpräsentationen im Rahmen der Dissertation</i>	123
7.4.d.	<i>Eingeworbene Drittmittel im Rahmen der Dissertation</i>	123

I. Abkürzungsverzeichnis

Advanced DMEM/F12 Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's *F-12*
ASF Altered Schaedler Flora
BSA Bovines Serumalbumin
CED Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CR Konventionell gehalten
CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CXCL1 Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 1
DAB 3,3'-Diaminobenzidin
DAI *Disease activity index*
DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTP Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium
DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSS Dextran Sulfat-Natriumsalz
EBM Experimental Biomedicine of Gothenburg
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
EGF Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EWAT Epididymales weißes Fettgewebe
FBS Fötales Kälberserum
FCCP Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon
FDA Amerikanische Food and Drug Administration
FFAR2 Free fatty acid receptor 2
FFAR3 *Free fatty acid receptor 3*
FMT Fäkale Mikrobiota Transplantation
G6P Glucose-6-phosphat
GF Keimfrei
HCAR2 *Hydroxycarboxylic acid receptor 2*
HDAC Histon-Deacetylasen
HE Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEK Human Embryonic Kidney
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 α Hypoxie-induzierter Faktor-1 alpha

HK Hexokinasen
 HK2 Hexokinase 2
Hk2^{ΔIEC}-Mäuse *Hk2^{fl/fl}-Villin::Cre+* Mäuse
 HKDC1 HK domain containing protein 1
 HRP Meerrettichperoxidase
 IEC Intestinale Epithelzellen / *Intestinal epithelial cells*
 Matrigel 60:40 BD Matrigel Growth factor reduced, Phenol red free + PBS (v/v)
 MEKUN-SH Ministeriums für Energiewende, Klimaschutz, Umwelt und Natur des Landes Schleswig-Holstein
 MEM Minimal Essential Medium
 MHH Medizinischen Hochschule Hannover
 Milchpulver Blotto Non-Fat Dry Milk
 MPTP Mitochondriale Permeabilitäts Transitions Pore
 NAC N-Acetylcystein
 NAM β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate
 OCR Sauerstoffverbrauchsrate
 OXPHOS Mitochondriale oxidative Phosphorylierung
 PARP1 Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1
 PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
 PCI PCI-34051
 Pen/Strep Penicillin/Streptomycin
 PPIF/CypD Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase / Cyclophilin D
 PVDF Polyvinylidenfluorid
 qRT-PCR Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
 RIPA-Puffer Radioimmunpräzipitations-Puffer
 RLT RNeasy Lysis Buffer
 RT Reverse Transkriptase
 SAHA Vorinostat
 SCFA kurzkettige Fettsäuren *Short chain fatty acids*
 SEM Standardfehler des Mittelwertes
 siRNA small interfering RNA
 TBS Tris-buffered saline
 TBS-Tween 20 TBS mit 0,1 % (v/v) Tween
 TCH Pimelin-Diphenylamin 106

TGS Tris/Glycine/SDS

TNF Tumor Nekrose Faktor

Tributyrin Tributansäureglycerolester

TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Tween Polysorbat 20

VDAC spannungsabhängige Anionen Kanäle

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Intestinale Homöostase unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen.....	14
Abbildung 1-2 Immunfluoreszenzfärbung für HK2 im murinen Colon.	16
Abbildung 1-3 Graphische Zusammenfassung der Dissertation von Jacob Hamm...	21
Abbildung 3-1 Hk2-Expression ist abhängig von der Zusammensetzung des Mikrobioms.....	53
Abbildung 3-2 Clostridium innocuum I46 und Flavonifractor plautii YL31 reprimieren die HK2-Expression in Caco-2-Zellen.....	54
Abbildung 3-3 HK2-Expression korreliert mit der Acetat- und Butyratproduktion der einzelnen OMM-Bakterien	56
Abbildung 3-4 Kurzkettige Fettsäuren modulieren HK2 in vitro und in vivo	58
Abbildung 3-5 Butyrat moduliert HK2 nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ..	59
Abbildung 3-6 HDAC8 reguliert HK2.....	61
Abbildung 3-7 Verlust von HK2 reduziert Anfälligkeit gegenüber Zelltod nach TNF-Stimulation	62
Abbildung 3-8 Seahorse-Analyse von Colon-Organoiden zeigen keine signifikante Änderung der mitochondrialen Atmung.	64
Abbildung 3-9 Butyrat reduziert die mitochondriale Atmung	65
Abbildung 3-10 Veränderte Krankheitsaktivität in WT-Mäusen durch kurzkettige Fettsäuren.....	67
Abbildung 3-11 Kurzkettige Fettsäuren verlieren ihren Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei Hk2 ^{ΔIEC} -Mäusen.....	69
Abbildung 4-1 Graphische Zusammenfassung der Erkenntnisse dieser Arbeit.....	71

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Experimentelles Design, Zellzahl und Nährmedium Caco-2-Zellen	24
Tabelle 2.2 Experimentelles Design, Zellzahl und Nährmedium HT-29 Zellen	24
Tabelle 2.3 Zusammensetzung 2x Basal Medium	30
Tabelle 2.4 Zusammensetzung ENR-konditioniertes Medium	30
Tabelle 2.5 Zusammensetzung L-WRN-konditioniertes Medium	30
Tabelle 2.6 Primer für qRT-PCR	35
Tabelle 2.7 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	37
Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Primärantikörper*	39
Tabelle 2.9 Liste der verwendeten Sekundärantikörper	39
Tabelle 2.10 Reagenzien zur Amplifikation der Plasmid-DNA (pro Well)	40
Tabelle 2.11 Histologischer Inflammations-Score	43
Tabelle 2.12 Liste der verwendeten Primärantikörper in der Histologie	44
Tabelle 2.13 Primer der Genotypisierung	47
Tabelle 2.14 Reagenzien der Genotypisierungs-PCR	47
Tabelle 2.15 <i>Disease activity index</i>	49
Tabelle 3.1 Statistik des linearen Models der HK2-Expression bedingt durch die Induktion der Metabolite, durch die einzelnen OMM Bakterien	55
Tabelle 7.1 Antikörper	110
Tabelle 7.2 Bakterienstämme	110
Tabelle 7.3 Biologische Proben	110
Tabelle 7.4 Labormaterialien	111
Tabelle 7.5 Kritische kommerzielle Tests	113
Tabelle 7.6 Zelllinien	114
Tabelle 7.7 Organismen	114
Tabelle 7.8 Oligonukleotide	115
Tabelle 7.9 Rekombinante DNA	115
Tabelle 7.10 Software und Algorithmen	115
Tabelle 7.11 Hardware	116
Tabelle 7.12 Versuchstierdiäten	116

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Die Ätiopathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) mit ihren beiden Hauptvertretern Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa ist trotz intensiver Forschung *bis dato* nicht vollständig verstanden. Die Aussicht auf eine Heilung ist trotz hochspezifischer Immuntherapien oft frustrierend und eine kausale medikamentöse Behandlung steht nicht zur Verfügung. Patienten müssen in der Regel lebenslang eine immunsupprimierende Therapie erhalten oder sich Operationen unterziehen. Die totale Kolektomie bei Colitis Ulcerosa ist die einzige definitive Therapie im Rahmen einer CED. Dank personalisierter Präzisionsmedizin konnten allerdings immer effektivere Therapeutika entwickelt werden, die die Notwendigkeit von invasiven Verfahren begrenzen können. Man versteht diese Erkrankungen heute als eine Dysbalance zwischen verschiedenen Faktoren. Dazu gehören genetische Prädispositionen, Umwelteinflüsse wie Ernährung, das Mikrobiom sowie eine fehlregulierte Immunregulation. Diese Dysbalance führt zu einer Störung der intestinalen Barriere und begünstigt eine dysregulierte Inflammation.

Diese Arbeit befasst sich mit mikrobiellen Metaboliten, speziell den kurzkettigen Fettsäuren, deren Einfluss auf intestinale Epithelzellen (*Intestinal epithelial cells* (IECs)) und ihrer Rolle für die CED. Sie baut auf der Dissertation von Jacob Hamm auf, dessen Ergebnisse Teil unserer gemeinsamen Publikation sind [1]. Jacob Hamm konnte zeigen, dass der Verlust des glykolytischen Enzyms Hexokinase 2 (HK2) im intestinalen Epithel zu einem protektiven anti-inflammatorischen Phänotyp im murinen Colitis-Modell führt. Mechanistisch liegt diesem Phänotyp ein veränderter mitochondrialer Metabolismus und eine verringerte Suszeptibilität gegenüber dem Zelltod zugrunde. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit werden zunächst aktuelle Erkenntnisse zum Mikrobiom, CED und HK2 zusammengefasst.

1.2 Das Mikrobiom

1.2.1 Vorwort Mikrobiom

Das Mikrobiom bezeichnet die Gesamtheit aller Mikroorganismen, die eine ökologische Nische besiedeln. Dazu zählen Bakterien, Archaeen, Pilze, Algen und Protisten. Im erweiterten Sinne werden auch Viren, Plasmide und Bakteriophagen zum Mikrobiom gezählt. Zur Differenzierung werden mitunter die Begriffe Bakteriom, Mykobiom oder Virom verwendet [2]. Es kommt zu einer ständigen Interaktion zwischen Mikrobiom und Wirt. Nahezu jedes Organsystem interagiert entweder über direkten Kontakt (Haut, Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt) mit dem Mikrobiom oder indirekt über mikrobielle Stoffwechselprodukte (Leber, Gehirn). Beispiele hierfür sind die Mikrobiom-Darm-Gehirn-Achse, die Mikrobiom-Darm-Lungen-Achse oder die Mikrobiom-Darm-Leber-Achse [3-5]. Die Komposition des Mikrobioms variiert nicht nur interspezifisch, sondern interindividuell und sogar intraindividuell [6-8]. Neuere Schätzungen gehen davon aus, dass im menschlichen Körper etwa 3.9×10^{13} bakterielle Zellen leben. Das entspricht in etwa der Anzahl der menschlichen Zellen [9]. Bestandteile wie Viren, Plasmide oder Bakteriophagen sind in diesen Schätzungen nicht enthalten. Das Zusammenspiel verschiedener beeinflussender Faktoren wie Genetik, Umwelt, Ernährung, Lokalisation, Immunsystem und dem Mikrobiom selbst führt zu einer großen Diversität [10-14]. Ein Beispiel für dieses komplexe Zusammenspiel sind die Unterschiede im Mikrobiom in Zwillingsstudien. Dessen Komposition wird durch verschiedene Faktoren, wie CED oder Umweltbedingungen, beeinflusst [15, 16]. Pathogene Erreger werden zwar nicht zum Mikrobiom gezählt, aber bestimmte Organismen des Mikrobioms können unter bestimmten Konditionen ein pathogenes Potenzial entwickeln und werden als Pathobionten bezeichnet. Jedes Individuum trägt einen eigenen mikrobiotischen Fingerabdruck. Jedoch wandelt sich die Komposition des Mikrobiom mit dem Leben seines Wirtes und wird von der Geburt bis zu seinem Tod durch die verschiedenen Einflüsse geprägt [13, 17]. Das Mikrobiom kann vor Erkrankungen schützen oder diese verursachen und die Effektivität medikamentöser Therapien vermindern oder verstärken [13, 18-21]. Insbesondere der Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die CED ist für diese Arbeit von großer Bedeutung.

1.2.2 Das intestinale Mikrobiom

Das Intestinum, der Darmabschnitt vom Duodenum bis zum Analkanal, beherbergt ein komplexes Mikrobiom, das aus unzähligen Mikroorganismen besteht. Die Biomasse des bakteriellen Mikrobioms wird auf 200 g geschätzt [9]. Innerhalb des Intestinums nimmt die Konzentration der Mikroben von oral nach aboral zu und erreicht im Colon ihre höchste Dichte [22]. Mit geschätzten 10^{11} - 10^{12} Mikroorganismen pro ml liegt hier eine der höchsten bekannten Dichten an Bakterien vor [23]. Das Erbmaterial des intestinalen Metagenoms übertrifft das des menschlichen Genoms um das 130-fache [24]. Das intestinale Mikrobiom setzt sich vorwiegend aus den 5 Phyla der Bacillota (ehemals Firmicutes), Actinomycetota (ehemals Actinobacteria), Bacteroidota (ehemals Bacteroidetes), Pseudomonadota (ehemals Proteobacteria) und Verrucomicrobiota (ehemals Verrucomicrobia) zusammen [25, 26]. Eine neue Studie beschreibt bis zu 3500 verschiedene bakterielle Spezies im intestinalen Mikrobiom, während konservative Studien bislang eher von 500-1000 verschiedenen Spezies ausgingen [27, 28]. Dieses komplexe Ökosystem hat eine enge Beziehung zum Wirt und ist für dessen Überleben essenziell. Es unterstützt den Wirt bei der Gewinnung von Nährstoffen und Energie aus der Nahrung, indem es einzigartige metabolische Enzyme und Signalwege nutzt [23]. Das intestinale Mikrobiom fördert die Aufnahme von Aminosäuren, Lipiden und Vitaminen und produziert bis zu 1000 verschiedene Metabolite, die zahlreiche lokale und systemische Auswirkungen haben können [29, 30]. Beispielsweise fungiert die kurzkettige Fettsäure Butyrat als Hauptenergiequelle von Enterozyten [22, 31]. Das intestinale Mikrobiom schützt den Wirt vor pathogenen Keimen, indem es antimikrobielle Peptide produziert und ökologische Nischen besetzt [18, 25, 32]. Es formt die Integrität der Mucosa und moduliert das Immunsystem [33, 34]. Der Einfluss des intestinalen Mikrobioms geht jedoch weit über den Darm hinaus und reicht bis ins zentrale Nervensystem. Es wird postuliert, dass das Mikrobiom an der Entstehung von Morbus Parkinson beteiligt ist [35]. Die metabolische Kapazität des Mikrobioms übersteigt, die der Leber um das 100-fache [36]. Aufgrund all dieser Effekte wird in der Wissenschaft kontrovers diskutiert, ob das intestinale Mikrobiom nicht als eigene Organentität zu betrachten ist [37-39]. Eine Dysbiose, also ein Ungleichgewicht im intestinalen Mikrobiom, wird mit verschiedenen Erkrankungen wie CED oder dem metabolischen Syndrom assoziiert [23, 40, 41]. Aktuelle Forschungen untersuchen, ob ein „gesundes“ Mikrobiom als Resilienzfaktor gegen diese Erkrankungen wirkt, oder die Dysbiose zu ihrer Entstehung beitragen kann [42]. Das

intestinale Mikrobiom begleitet den Wirt über sein Leben hinweg und wurde im Laufe der Menschheitsgeschichte geformt und beeinflusst. [43]. Insbesondere im letzten Jahrtausend hat das Zeitalter der Industrialisierung zu großen Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung geführt [44]. Das intestinale Mikrobiom wächst mit seinem Wirt und ist ständigen äußeren und inneren Einflüssen wie Erkrankungen, Medikamenten, Ernährung und Umweltfaktoren ausgesetzt. Diese Einflüsse führen zu einem stetigen Wandel des Mikrobioms [13, 16, 45]. Die Komplexität des intestinalen Mikrobioms in Komposition und Variation wirft viele Fragen auf. Ein Beispiel dafür ist die wissenschaftliche Diskussion um die Definition eines gesunden bzw. normalen Mikrobioms [46, 47].

1.2.3 Kurzkettige Fettsäuren: Mikrobielle Metabolite mit vielfältigen Funktionen

Kurzkettige Fettsäuren sind unverzweigte, gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 2 bis 6 Kohlenstoffatomen. In der Wissenschaft werden ihre Ester und Salze synonym verwendet. Zu den wichtigsten Vertretern zählen Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Valerat, Isovalerat und Capronat. Kurzkettige Fettsäuren entstehen im Darm als bakterielle Metabolite, fallen jedoch ebenfalls im humanen zellulären Stoffwechsel an. Dies gilt insbesondere für Acetat und Propionat [48]. Im Colon werden kurzkettige Fettsäuren durch die saccharolytische Fermentation von Ballaststoffen und anderen Kohlenhydraten produziert, die im Dünndarm nicht absorbiert wurden. Hierbei entstehen überwiegend Acetat, Propionat und Butyrat [49, 50]. Diese fallen im Verhältnis 60:20:20 an [51]. Insbesondere die Phyla der Bacillota enthalten viele bekannte Butyrat-Produzenten speziell die *Clostridium*-Gruppen IV und XIV und *Bifidobacteria* aus den Phyla der Actinomycetota [52-54]. Butyrat wird von Enterozyten aufgenommen und dient ihnen als primäre Energiequelle. Anschließend gelangt es in den Pfortaderkreislauf und wird von Hepatozyten verstoffwechselt. Nur ein geringer Teil steht systemisch zur Verfügung [22, 49, 55]. Propionat wird ebenfalls größtenteils von der Leber verstoffwechselt und dient dort insbesondere der Gluconeogenese. Auch hier steht nur ein geringer Teil systemisch zur Verfügung [55, 56]. Acetat hingegen gelangt nach der Leberpassage zu 36 % systemisch in den Blutkreislauf [55]. Kurzkettige Fettsäuren dienen jedoch nicht nur als Substrate und Energielieferanten. Sie können auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verschiedene zelluläre Signalkaskaden auslösen. Bei diesen handelt es sich unter anderem um den *Free fatty acid receptor 2* (FFAR2), den *Free fatty acid receptor 3*

(FFAR3) oder den *Hydroxycarboxylic acid receptor 2* (HCAR2) [57, 58]. Sie werden von verschiedenen Zellen wie Adipozyten, Pankreas-Inselzellen, enteroendokrinen Zellen, intestinalen Epithelzellen und Immunzellen exprimiert [59-64]. Neben zellulären Signalkaskaden können sie zudem intrazellulär durch die Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDACs) [65, 66] wirken. Dies ermöglicht weitere genregulatorische Effekte und erklärt die vielfältigen Effekte von kurzkettigen Fettsäuren auf den Organismus. Zahlreiche Studien befassen sich mit den Auswirkungen von kurzkettigen Fettsäuren auf den Wirt und verschiedene Erkrankungen. Es wird jedoch allgemein ein positiver Effekt auf den Wirt angenommen, insbesondere im Hinblick auf ihre immunregulatorischen Eigenschaften [67]. Dennoch ist ihre Rolle weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen und wissenschaftlicher Diskrepanzen. So zeigen einige Studien beispielsweise eine Reduktion bestimmter Butyrat-produzierender Bakterienarten bei CED [68, 69]. Andere Studien wiederum konnten keine derartigen Reduktionen beobachten [70, 71]. Kurzkettige Fettsäuren sind wichtige Metabolite im Darm mit vielfältigen Funktionen und Auswirkungen auf den Wirt. Ihre genaue Rolle in verschiedenen Erkrankungen bedarf jedoch weiterer Forschung.

1.2.4 Miteinander verbunden: Die Interaktionen zwischen Mensch und Mikrobiom
Zahlreiche Studien belegen eine enge Verbindung zwischen dem Mikrobiom und der Entstehung von Tumoren. Es ist seit langem bekannt, dass bestimmte Viren und Bakterien, wie das Hepatitis-C-Virus oder *Helicobacter pylori*, maligne Neoplasien verursachen und beeinflussen können. Inzwischen wurde aber auch gezeigt, dass Pathobionten mit Karzinogenese [72, 73], Metastasierung [74, 75] und Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika [76] assoziiert sind. Enge Zusammenhänge wurden auch zwischen dem Mikrobiom und verschiedenen metabolischen Erkrankungen wie Diabetes Typ 1 und 2 [77, 78], dem metabolischem Syndrom [23, 79] und chronischen Lebererkrankungen [80] beschrieben. Hier eröffnen sich neue therapeutische Ansätze. So kann beispielsweise eine fäkale Mikrobiom-Transplantation (FMT) von übergewichtigen Mäusen in keimfreie Mäuse eine Zunahme an Körperfett induzieren [23]. Das Mikrobiom spielt vermutlich auch eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie CED [41, 71, 81], rheumatoider Arthritis [82], Lupus [83], atopischer Dermatitis, Psoriasis [84], primär sklerosierender Cholangitis [85] und Asthma [86]. Es ist eng mit dem Immunsystem des Wirts verbunden und hat vielfältige immunregulatorische Funktionen. Unter physiologischen Bedingungen ist die

Immunantwort des Wirts auf die intestinale Mucosa beschränkt [87]. Intestinale Epithelzellen, wie Paneth-Zellen, formen die Komposition des Mikrobioms [88]. Dysfunktionen von Paneth-Zellen können intestinale Entzündungen verursachen [89]. Darüber hinaus gibt es viele weitere Interaktionen zwischen dem Mikrobiom und dem Immunsystem des Wirts. Wichtige Rollen spielen dabei die Interaktionen von Mikrobiom und Toll-like Rezeptoren, *Myeloid differentiation primary response* Protein 88, *Nucleotide-binding oligomerization domain-like* Rezeptoren und die direkte Interaktion mit den verschiedenen Immunzellen. Eine umfassende Analyse der immunregulatorischen Funktion wurde von *Zheng et al.* beschrieben [11].

1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.3.1 Vorwort CED

CED manifestieren sich durch zwei Hauptformen, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Im erweiterten Kontext werden auch seltene Erscheinungsformen wie mikroskopische Colitiden sowie monogene CED und CED-ähnliche Erkrankungen berücksichtigt. Gemeinsam ist allen CED-Formen ihre charakteristische Eigenschaft, chronische und immunmodulierende Entzündungen im Gastrointestinaltrakt hervorzurufen. Trotz intensiver Forschungsbemühungen bleibt die Ätiopathogenese dieses vielschichtigen Krankheitsspektrums nur teilweise verstanden.

1.3.2 Epidemiologie

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa werden oft als seltene Erkrankungen betrachtet. Obwohl dieser Wahrnehmung beträgt die Prävalenz von CED knapp 1 %, was häufiger ist, als gemeinhin angenommen wird. Die höchste Prävalenz findet sich in Europa, insbesondere in Ländern wie Deutschland und Norwegen sowie in Nordamerika. In diesen Regionen bleibt die Inzidenz weitgehend konstant oder zeigt sogar eine leichte Abnahme. Andererseits wurde in den letzten Jahrzehnten eine bemerkenswerte Zunahme der Prävalenz und Inzidenz in einigen afrikanischen, asiatischen und südamerikanischen Ländern beobachtet, in denen es zur einer Zunahme der Industrialisierung kam [90, 91]. Die genaue Rolle der Industrialisierung in Bezug auf die Ätiologie von Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn ist spekulativ. Es bleibt unklar, ob die hohen oder steigenden Inzidenzraten mit der verbesserten medizinischen Versorgung und Diagnostik oder Umweltfaktoren in Verbindung stehen. CED betreffen Menschen aller Altersgruppen, doch es lassen sich zwei deutliche Häufigkeitsgipfel identifizieren. Der erste tritt zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr auf, während der zweite zwischen dem 55. und 80. Lebensjahr zu beobachten ist. In einem Viertel der Fälle wird die Diagnose bereits vor dem 18. Lebensjahr gestellt [92]. In Deutschland wird die Prävalenz von Morbus Crohn auf 100-200 Fälle pro 100.000 Einwohner geschätzt, während für Colitis Ulcerosa eine Prävalenz von 160-250 Fällen pro 100.000 Einwohner angenommen wird [93]. Die Geschlechterverteilung zeigt keine signifikanten Unterschiede und wird für Morbus Crohn mit 53 % weiblich und 47 % männlich, bei Colitis Ulcerosa mit 43 % weiblich und 57 % männlich beschrieben [94].

1.3.3 Ätiologie

Die Ätiologie von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa ist noch nicht abschließend verstanden. Trotz intensiver Forschung und zahlreicher innovativer Technologien im Bereich der Molekularbiologie konnten bisher nur Teilaspekte erklärt werden. Wie bei anderen entzündlichen Erkrankungen wird angenommen, dass ein komplexes Zusammenspiel von Umweltfaktoren wie Ernährung und Mikrobiom, genetischer Prädisposition und einer fehlregulierten Immunantwort ursächlich ist. Dies führt zu einer Störung der intestinalen Barriere und einer pathologischen Entzündung. Dank genomweiter Assoziationsstudien konnten mittlerweile über 200 verschiedene genetische Risiko-Loci beschrieben werden [95]. Zu den codierenden Risiko-Loci zählen beispielsweise Gene wie *Autophagy related 16 like 1* Protein, das mit Prozessen wie Autophagie und der Dysregulation des endoplasmatischen Retikulums assoziiert ist [96], oder *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing Protein 2*, ein Pattern-Recognition Receptor, der für die korrekte Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile verantwortlich ist und somit die mikrobielle Zusammensetzung beeinflusst [97]. Dies kann zu Dysfunktionen der intestinalen Epithelzellen und sekundär zu einer Störung der intestinalen Barriere führen [98, 99]. Darüber hinaus sind verschiedene monogene Formen von CED beschrieben [100]. Wie bereits ausführlich erläutert, ist auch eine Dysbiose des Mikrobioms und seiner Metabolite mit CED assoziiert [41, 81, 101, 102]. Weitere bedeutende Umweltfaktoren sind die Ernährung, wobei insbesondere der Einfluss des "westlichen Ernährungsstils" auf CED in der Wissenschaft diskutiert wird, da immunregulatorische Effekte in diesem Kontext beschrieben werden [103, 104]. Auch die Rolle des Rauchens wird diskutiert, da niedrige Inzidenzen für Colitis Ulcerosa, aber höhere Inzidenzen für Morbus Crohn unter Rauchern beobachtet wurden [105, 106]. Stress kann ebenfalls einen Krankheitsschub induzieren [107]. Verschiedene Veränderungen im Immunsystem sind mit CED assoziiert, wobei T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen neben anderen Immunzellen eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen [108, 109]. In ihrer Gesamtheit führen diese Faktoren zu einer Entzündung und einem Zusammenbruch der intestinalen Barriere, was wiederum zu weiterer Entzündung führt.

1.3.4 Klinische Manifestationen

Beide Formen der CED sind durch einen Befall des Gastrointestinaltrakts und einen chronisch wiederkehrenden Verlauf gekennzeichnet, unterscheiden sich jedoch in ihrem klinischen Erscheinungsbild. Der Morbus Crohn kann den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen und sehr heterogene Symptome verursachen. Die am häufigsten betroffenen Lokalisationen sind das terminale Ileum und das Colon. Klassische Symptome sind Diarrhoe, Gewichtsverlust und abdominelle Schmerzen. Weitere Symptome können Fatigue, Anorexie und Mangelernährung sein. Etwa die Hälfte der Patienten leidet zudem an extraintestinalen Manifestationen, die beispielsweise Haut, Gelenke und Augen betreffen können. Zu den Komplikationen gehören Fistelbildungen, Fissuren, Abszesse und Stenosen. Schwere Verläufe können aufgrund der Symptome und Komplikationen lebensbedrohlich sein [110].

Der gastrointestinale Befall durch Colitis Ulcerosa ist in der Regel auf das Colon beschränkt. In bis zu 10 % der Fälle kann es jedoch zu einer sogenannten *Backwash ileitis* kommen. Normalerweise tritt eine aufsteigende Entzündung auf, die im Rektum beginnt. Klassische Symptome sind Hämatochezie, Tenesmen und Stuhldrang. Weitere Symptome können Fatigue und Anämie sein. Auch hier sind ähnliche extraintestinale Manifestationen wie beim Morbus Crohn vorhanden. Zu den Komplikationen gehören insbesondere Ulzerationen, Perforationen, das toxische Megacolon und ein erhöhtes Risiko für Colonkarzinome. Auch hier sind lebensbedrohliche Verläufe beispielsweise im Rahmen einer perforationsbedingten Sepsis möglich [110-112].

1.3.5 Diagnostik

Die Diagnose von CED erfolgt durch eine Kombination von Anamnese, klinischer Untersuchung und typischen laborchemischen, sonographischen, endoskopischen und histologischen Befunden. In der Anamnese und klinischen Untersuchung sollten insbesondere eine umfassende Erhebung der Symptomatik sowie Familien-, Medikamenten- und Reiseanamnese im Fokus stehen. Dies dient dazu, mögliche Differentialdiagnosen auszuschließen und extraintestinale Manifestationen zu identifizieren. Laborchemisch sollten vor allem Entzündungsparameter und Mangelernährungsparameter im Blut analysiert werden. Zusätzlich ist die Analyse einer Stuhlprobe auf Calprotectin und pathogene Erreger sinnvoll. Sonographisch sollte auf Anzeichen intestinaler Entzündung geachtet werden, wie etwa den Verlust

der Haustrierung, das Kokarden-Phänomen oder Wandverdickungen, sowie auf Komplikationen wie Fisteln, Stenosen oder Abszesse. Eine ergänzende Bildgebung mittels MR-Enterografie ist insbesondere beim Morbus Crohn zur Beurteilung von Fisteln, Stenosen und Abszessen sinnvoll. Endoskopisch sollte eine Ileokoloskopie zur Diagnosestellung zwingend erfolgen und ebenso in regelmäßigen Abständen zur Verlaufskontrolle. Bei Colitis Ulcerosa kann anstelle der Ileokoloskopie auch eine Sigmoidoskopie zur Verlaufskontrolle durchgeführt werden. Beim Morbus Crohn sollte aufgrund des Verteilungsmusters auch eine Ösophagogastrroduodenoskopie erfolgen. Charakteristische endoskopische Zeichen wie Pseudopolypen, das Gartenschlauchphänomen bei Colitis Ulcerosa oder *Skip lesions* beim Morbus Crohn können so identifiziert werden. Eine makroskopische Einschätzung der Krankheitsaktivität und Ausdehnung ist ebenfalls möglich. Zusätzlich können Ulzerationen oder ein Erythem endoskopische Zeichen für eine CED sein. Die Entnahme von Stufenbiopsien zur histologischen Sicherung der Diagnose ist ratsam. Histologisch zeigen sich generelle Entzündungszeichen. Beim Morbus Crohn zeigt sich zusätzlich ein transmuraler Befall, eine diskontinuierliche Ausbreitung und nicht-verkäsende Granulome. Bei Colitis Ulcerosa findet sich eine mucosale Entzündung, ein Verlust der Becherzellen, Kryptenabszesse sowie erosive und ulzerierende Läsionen. Aus endoskopischen und klinischen Befunden können verschiedene Krankheitsaktivitäts-Scores wie der Mayo-Score für Colitis ulcerosa oder der SES-CD Score für Morbus Crohn, erhoben werden. Trotz dieser Diagnostik ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht immer möglich. In solchen Fällen wird die Erkrankung als Colitis indeterminata bezeichnet [113, 114].

1.3.6 Therapie

Die Therapie der CED ist umfangreich und höchst komplex. Sie basiert im Wesentlichen auf drei Aspekten: der operativen Therapie, der supportiven Therapie und der medikamentösen Therapie. Die operative Therapie ist insbesondere bei schweren, therapieresistenten Verläufen und zur Behandlung von Komplikationen indiziert. Supportive Therapie kann beispielsweise die Substitution von Vitaminen und Elektrolyten, eine parenterale Ernährung, die Transplantation von Erythrozyten oder die analgetische Therapie umfassen. Die medikamentöse Therapie der CED zielt auf die Behandlung des akuten Schubes sowie auf die Induktion bzw. den Erhalt einer Remission ab. Die Wahl der Therapie hängt von der Krankheitsaktivität und den

Komorbiditäten ab. Die Therapiemöglichkeiten umfassen Glucocorticoide, Aminosalicylate, Antimetabolite, JAK-Inhibitoren, Calcineurin-Inhibitoren sowie Biologika. Abhängig von dem gewählten Medikament kann die Therapie topisch oder systemisch appliziert werden. Schwere Schübe, die einen stationären Aufenthalt erfordern, müssen in der Regel mit systemischen Glucocorticoiden behandelt werden. Aufgrund der ausgeprägten systemischen Nebenwirkungen einer langanhaltenden systemischen Steroidtherapie sollten diese jedoch nach Möglichkeit rasch reduziert werden, und der Remissionserhalt sollte mit Biologika oder anderweitigen Therapien induziert werden. Vor jeder Biologika-Therapie sollten zudem bestimmte Infektionen mit Erregern wie HIV, TBC oder CMV sicher ausgeschlossen werden. Falls eine dieser Infektionen oder eine andere schwere Infektion vorliegt, sollte diese, wenn möglich, vorab mit einer antiinfektiven Therapie behandelt werden. In Deutschland sind für die Therapie der CED Integrin-Blocker (Vedolizumab), Interleukin 12/23-Blocker (Ustekinumab) und TNF-Blocker (Adalimumab, Infliximab, Certolizumab Pegol und Golimumab) zugelassen. Bei schwersten Verläufen kann jedoch beim Versagen konventioneller Therapien auch eine Off-Label-Therapie mit anderen Substanzen notwendig sein. Diese Indikationen sollten jedoch nur durch interdisziplinäre Fachkonferenzen gestellt werden [113, 114].

1.3.7 Intestinale Homöostase durch intestinale Epithelzellen und ihre Bedeutung für CED

Bei CED kommt es zu einer Störung der intestinalen Homöostase [115]. Homöostase bezeichnet einen Gleichgewichtszustand eines offenen dynamischen Systems, der durch einen internen regulierenden Prozess aufrechterhalten wird. Die intestinale Homöostase entsteht durch die Interaktionen zwischen dem Mikrobiom, den Zellen der Mucosa und dem Immunsystem. Das intestinale Epithel bedeckt eine geschätzte Fläche von 30 m² [116]. Über diese Fläche verteilen sich die Zellen des intestinalen Epithels und interagieren mit dem Mikrobiom sowie den Immunzellen. Das intestinale Epithel dient als gemeinsame Schnittstelle zwischen diesen Bereichen. Es besteht aus fünf verschiedenen Zelllinien: Becherzellen, Paneth-Zellen, M-Zellen, enteroendokrinen Zellen und Enterozyten. Jede dieser Zelllinien trägt zu diesem sensiblen Gleichgewicht bei. Becherzellen produzieren Mucus, einen der wichtigsten Bestandteile der intestinalen Barriere. Mucus dient als Energiequelle für saccharolytische Bakterien und als Mikrohabitat [115, 117]. Der Verlust von

Becherzellen ist eines der histologischen Charakteristika für Colitis Ulcerosa [118]. Die Mucusproduktion kann unter anderem vom Mikrobiom über kurzkettige Fettsäuren moduliert werden [119]. Paneth-Zellen produzieren antimikrobielle Peptide und kontrollieren dadurch das Mikrobiom, um das Zusammenbrechen der intestinalen Barriere zu verhindern. Sie können das Mikrobiom detektieren und die Produktion von antimikrobiellen Peptiden entsprechend anpassen [115, 120]. Dysfunktionen von Paneth-Zellen können intestinale Entzündungen verursachen [89]. M-Zellen sind auf die Transzytose spezialisiert und sind über Lymphfollikeln und Peyer-Plaques lokalisiert. Aufgrund ihrer zellulären Beschaffenheit sind sie besonders durchlässig und dienen als Eintrittspforten für Bestandteile des Mikrobioms [115, 121]. Enteroendokrine Zellen können eine Vielzahl bioaktiver Substanzen produzieren und dadurch unter anderem die Mucusproduktion oder den Stoffwechsel modulieren. Veränderungen in diesen Zellpopulationen sind ebenfalls mit Colitis assoziiert [115, 122]. Enterozyten sind hauptsächlich für ihre Funktion in der Absorption von Nährstoffen bekannt. Mittlerweile ist jedoch klar, dass sie auch wichtige Funktionen in der Steuerung von inflammatorischen und anti-inflammatorischen Einflüssen haben [123]. Störungen in diesem sensiblen System haben zur Folge, dass die Entzündung außer Kontrolle gerät.

1.3.8 Das Mikrobiom bei CED

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, ist eine Dysbiose des intestinalen Mikrobioms mit CED, Inflammation und Infektionen assoziiert [15, 24, 41, 70, 71, 81, 101, 124-126]. Zu den charakteristischen Veränderungen zählen hierbei eine Reduktion der Diversität und gleichmäßigen Verteilung der bakteriellen Gemeinschaften [41], die Depletion bestimmter Butyrat-produzierender Bakterien und die Reduktion anderer Spezies, die mit dem Stoffwechsel von Mineralstoffen, Gallensäurestoffwechsel und dem Harnstoffzyklus assoziiert sind [126]. Andere Spezies, die proinflammatorische Substanzen produzieren können, sind in Patienten mit CED erhöht [126]. Aufgrund der immensen Diversität bleibt es jedoch weiterhin schwierig, charakteristische Mikrobiota in CED zu identifizieren. In der komplexen Ätiopathogenese der CED spielt das Mikrobiom eine wichtige Rolle, ein singulärer Bestandteil des Mikrobioms als krankheitsverursachender Faktor konnte jedoch noch nicht identifiziert werden [16]. Auch im Virom zeigt sich wie im Bakteriom bei Patienten mit CED eine Reduktion der alpha-Diversität. Jedoch gibt es in Bezug auf das Virom

deutlich weniger Studien im Vergleich zum Bakteriom und ein Großteil des Virom kann weiterhin nicht bestimmten Viren zugeordnet werden [127]. Auch über das Mykobiom ist in der Literatur wenig beschrieben. Insbesondere *Candida albicans* dominiert den Darm von CED Patienten und spielt eine wichtige immunregulatorische Rolle [128]. 2017 präsentierten *Sommer et al.* eine Hypothese, in der das Mikrobiom als schützender Faktor in den Fokus rückt. Insbesondere während der ersten Lebensmonate unterliegt das Mikrobiom einem dynamischen Wandel, der sich in der Adoleszenz zu einem stabilen Gleichgewichtszustand entwickelt. Diese Balance bleibt über die gesamte Lebensspanne hinweg erhalten, und selbst bei erheblichen Störungen des Mikrobioms findet es durch seine inhärente Widerstandsfähigkeit zurück zu seinem harmonischen Zustand. Falls die Resilienz des Mikrobioms nicht ausreicht, manifestiert sich eine andauernde Dysbiose, die zu einem anhaltenden Ungleichgewicht zwischen Wirt und Mikrobiom führt. Schwerwiegende Störungen des Mikrobioms bereits in der vulnerablen Phase der ersten Lebensmonate könnten von Anfang an zu einer beständigen Dysbiose führen. Dies könnte wiederum eine Prädisposition für chronische Erkrankungen darstellen, die häufig nach einer Latenzphase auftreten. Durch diese frühzeitige Veränderung des Mikrobioms könnte eine robuste Resistenz der Dysbiose entstehen, die selbst gegenüber therapeutischen Interventionen Bestand hat [42]. Auch wenn weiterhin viel Forschungsbedarf besteht, zeigt sich, dass das intestinale Mikrobiom eine wichtige Rolle für die intestinale Homöostase und dessen Störung bei CED spielt (Abbildung 1-1).

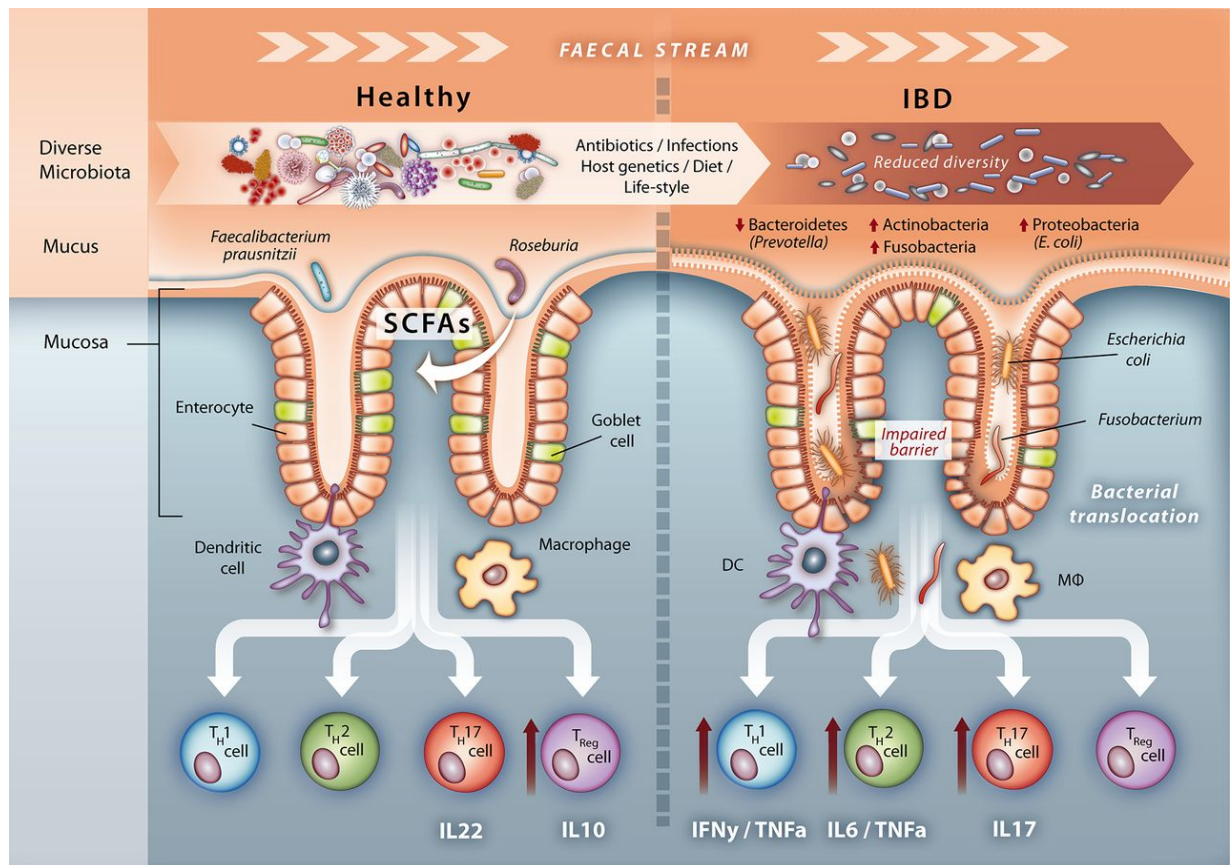


Abbildung 1-1 Intestinale Homöostase unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen.

Aus Sommer et al. Gut 2017 Microbiomarkers in inflammatory bowel diseases: caveats come with caviar. Mit Genehmigung von BMJ Publishing Group Ltd.

1.4 Hexokinase 2

1.4.1 Das Mikrobiom reguliert Hexokinase 2

Ein Beispiel für die wichtige Rolle des intestinalen Mikrobioms in Hinblick auf die intestinale Homöostase zeigt dessen Regulation von Hexokinase 2 (HK2). Innerhalb des Gastrointestinaltraktes gibt es einen Expressionsgradienten, welcher von oral nach aboral zunimmt, mit der höchsten *Hk2*-Expression im Colon [1]. In Epithelzellen des Colons zeigt sich, dass HK2 in den verschiedenen Kompartimenten entlang der Lieberkühn-Krypten unterschiedlich verteilt ist. Dabei ist HK2 insbesondere im apikalen Epithelverband stark erhöht (Abbildung 1-2) [1]. Der Verlust von HK2 im intestinale Epithel führt unter basalen Bedingungen in *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen zu keinen Veränderungen des Mikrobioms. Umgekehrt zeigt sich jedoch eine deutliche Beeinflussung von HK2 durch das Mikrobiom. In keimfreien Mäusen fehlt die Induktion von HK2 in den distalen apikalen intestinalen Epithelzellen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Mäusen. Die *Hk2*-Expression in diesem Kompartiment ist auf einem vergleichbaren Niveau wie dem der Krypten. Die Kolonisation von keimfreien Mäusen mit dem Mikrobiom von konventionell gehaltenen Mäusen steigert jedoch binnen weniger Tage die *Hk2*-Expression auf das Niveau der konventionell gehaltenen Mäuse [1]. Es ist bereits bekannt, dass auch mikrobielle Metabolite Stoffwechselprozesse des Wirts, wie die mitochondriale Funktion, beeinflussen können [129]. Interessanterweise sind bestimmte Metabolite wie die kurzkettigen Fettsäuren in der Lage HK2 zu regulieren [130, 131]. Somit ist die Interaktion zwischen dem Mikrobiom und HK2 ein exzellentes Beispiel für die komplexe Rolle des Mikrobioms in Bezug auf die intestinale Homöostase.

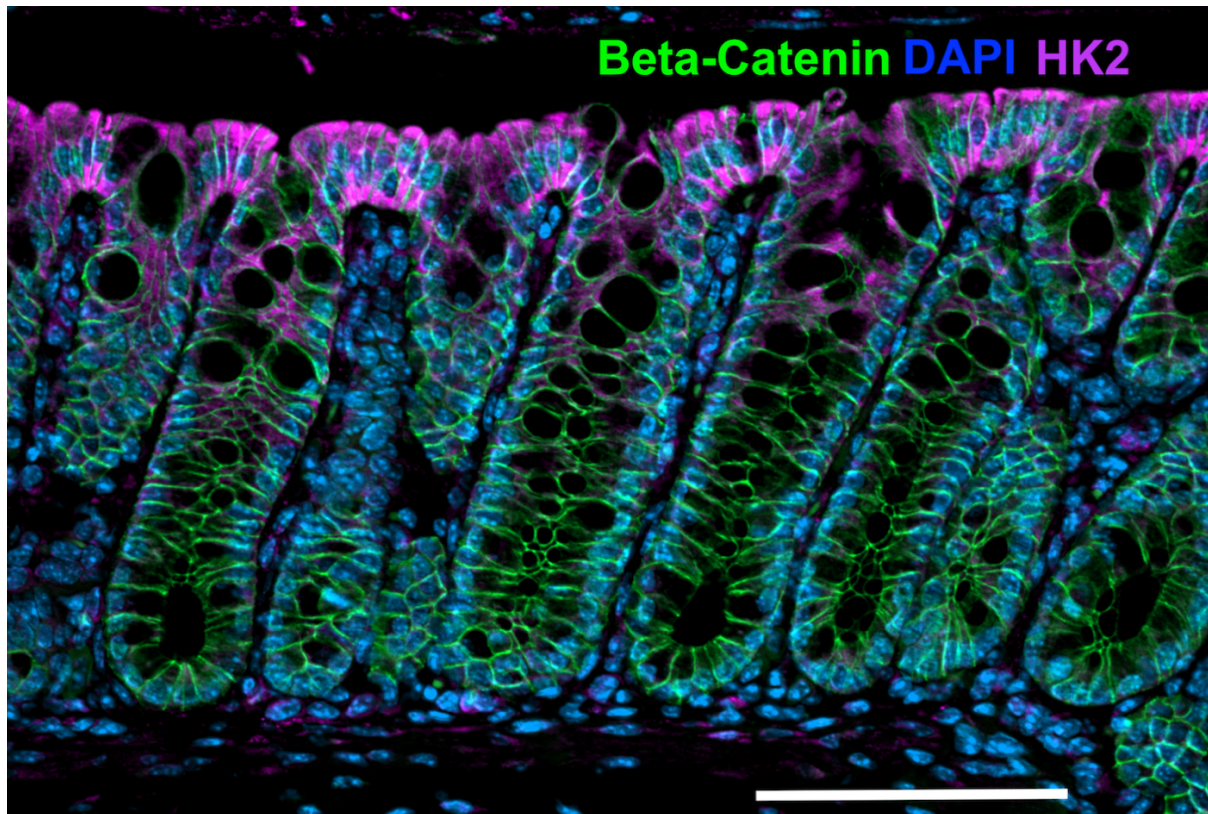


Abbildung 1-2 Immunfluoreszenzfärbung für HK2 im murinen Colon.

Immunfluoreszenzfärbung von HK2 im murinen Colon einer unbehandelten C57BL/6j Maus. HK2 (pink), 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), Beta-Catenin (grün). Maßstableiste (weiß) entspricht 100 µm. Zur Verfügung gestellt von Saskia Weber-Stiehl.

1.4.2 Funktion und Vorkommen der Hexokinasen

Hexokinasen (HK) katalysieren die irreversible Phosphorylierung von Hexosen zu Hexose-Phosphat, beispielsweise Glucose zu Glucose-6-phosphat (G6P). Im Gegensatz zu Glucose kann G6P die Zelle nicht mehr verlassen. Dies ist der erste und gleichzeitig einer der limitierenden Schritte der Glykolyse. Anschließend dient G6P als Substrat für den Pentosephosphatweg, die Glykogensynthese und die Glykolyse. Hexokinasen bestehen aus einer Familie von 5 Isoenzymen: HK1, HK2, HK3, HK4 (Glucokinase) und HK domain containing protein 1 (HKDC1) [132]. Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Gewebespezifität, Lokalisation und enzymatischen Funktion [133, 134]. HK1 wird ubiquitär im Körper exprimiert. HK3 wird im Verhältnis zu den anderen Formen deutlich weniger exprimiert und ist in keinem Gewebe die dominierende HK-Isoform. Glucokinase wird hauptsächlich in der Leber und im Pankreas exprimiert [133, 134], HK2 vorwiegend im Herzen, Fettgewebe, Muskulatur, jedoch auch im Darm [135]. Über HKDC1 ist noch wenig bekannt, es kommt jedoch insbesondere in apikalen intestinalen Epithelzellen, im Pankreas und in alveolären Makrophagen vor [136]. HK2 gilt als Prototyp der regulierbaren Hexokinasen, da es

durch verschiedene Umweltfaktoren und Signalwege induziert werden kann [137, 138]. Innerhalb der Zelle kann HK2 im Zytosol vorkommen und an die äußere mitochondriale Membran gebunden sein [139]. Neuere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass HK2 sich auch an den Zellkern binden und so genregulatorische Proteine rekrutieren kann [140].

1.4.3 HK2 in Tumorerkrankungen

Veränderungen des zellulären Metabolismus zählen zu den *Hallmarks of cancer*. Sie beruhen auf spezifischen Expressionsveränderungen der metabolischen Enzyme und werden als potenzielle therapeutische Angriffspunkte gesehen. Hierunter fällt auch der Warburg-Effekt. Er beschreibt, dass Tumorzellen ihre Energie hauptsächlich über die Glykolyse beziehen und das Endprodukt nicht dem Citratzyklus zuführen [141]. HK2 agiert hierbei nicht nur in seiner Funktion während der Glykolyse, sondern ist auch in der Lage, andere Enzyme zu regulieren und hierüber den Wechsel hin zur anaeroben Glykolyse zu fördern [142]. HK2 ist in verschiedenen Tumorentitäten erhöht. Hierzu zählen unter anderem biliäre Karzinome, kolorektale Karzinome, Mundhöhlenkarzinome, Nierenzellkarzinome, Lungenkarzinome, Prostatakarzinome, Magenkarzinome, Thymome, Endometriumkarzinome, Ösophaguskarzinome, Glioblastome und Zervixkarzinome [143]. Dabei werden HK2 neben metabolischen Einflüssen auch weitere Funktionen zugeschrieben wie die Tumorinitiierung und Instandhaltung [144].

1.4.4 HK2 als Teil des Immunsystems

Die Rolle von HK2 ist bei weitem nicht auf seine glykolytische Funktion beschränkt. 2016 konnten *Wolf et al.* zeigen, dass HK2 als Bestandteil des angeborenen Immunsystems fungiert, indem es in Makrophagen als Pattern-Recognition Receptor agiert. HK2 erkennt N-Acetylglucosamin, einen Bestandteil der Zellwand von grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus*. Diese Bindung führt zur sofortigen Dissoziation von HK2 von der äußeren mitochondrialen Membran, was zur Aktivierung eines Inflammasoms führt [145]. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass HK2 während einer Sepsis inhibiert wird, was neben einer Reduktion der Glykolyse auch zu einer Reduktion der Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt [146]. Weiterhin spielt HK2 eine wichtige Rolle in der mitochondrial vermittelten, antiviralen Antwort [147] und ist mit viralen Infektionen wie SARS-CoV-2 assoziiert [148]. Darüber

hinaus führt die Inhibition von HK2 zu einer veränderten Immunzellaktivierung und fördert die Infektion mit *Listeria monocytogenes* [149].

1.4.5 Die Rolle von HK2 im intestinalen Epithel

Um die Rolle von HK2 im intestinalen Epithel zu untersuchen, kann man das *Villin::Cre+* System nutzen, um HK2 spezifisch im intestinalen Epithel zu deletieren [150]. Im Gegensatz zur ubiquitären Deletion von HK2, sind Mäuse mit epithelialer HK2 Deletion (*Hk2^{fl/fl}-Villin::Cre+*, oder *Hk2^{ΔIEC}*-Mäuse) lebensfähig [151]. Unter basalen Bedingungen zeigen *Hk2^{ΔIEC}*-Mäuse keinen schwerwiegenden metabolischen, immunologischen oder inflammatorischen Phänotyp. Sowohl in jungen Mäusen (12 Wochen), als auch in alten Mäusen (90 Wochen) ergeben sich keine Unterschiede in Körpergewicht, prozentualen Organgewichten von Leber, Milz, Fett oder der Darmlänge, wie sie bei solchen Phänotypen zu erwarten wären. Auch führt die Deletion von HK2 im intestinalen Epithel nicht zu kompensatorischen Expressionsveränderungen der anderen HK Isoformen. Histopathologische Untersuchungen des Colons zeigen keine Veränderung der basalen Inflammation, Zelltod oder Proliferation. Auch besteht keine Veränderung der intestinalen Barriere. Jedoch zeigen *Hk2^{ΔIEC}*-Mäuse reduzierte Blutzuckerwerte im oralen Glukosetoleranztest. Interessanterweise führt der Verlust von HK2 in Caco-2-Zellen (*Caco-2^{ΔHk2}*), entgegen der Erwartung nicht zu einer Veränderung der glykolytischen Aktivität im Vergleich zu *Caco-2^{WT}*-Zellen [1].

1.4.6 Intestinale HK2-Deletion schützt vor Colitis

HK2 kann inflammatorische Reaktionen induzieren [145]. Bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen ist die Expression von *HK2* erhöht. In pädiatrischen CED-Patienten ist *HK2* im intestinalen Epithel hochreguliert, sowohl bei Morbus Crohn als auch in Colitis Ulcerosa. In einer adulten CED-Kohorte, insbesondere im entzündeten Gewebe der Erkrankten, ist die *HK2*-Expression nochmals erhöht. Auch bei infektiösen Colitiden ist die *HK2*-Expression im inflammatorisch veränderten Gewebe gesteigert [1]. Ebenfalls findet sich in CED-assoziierten Erkrankungen wie der primär sklerosierenden Cholangitis eine erhöhte *HK2*-Expression. Um CED im Mausmodell zu untersuchen, gibt es verschiedene Methoden wie chemisch induzierte Colitiden mittels Trinitrobenzolsulfonsäure oder Dextran Sulfat-Natriumsalz (DSS), genetische induzierte Colitiden und immunologisch induzierte Colitiden. Unter diesen Methoden

ist die DSS Colitis ein etabliertes Modell, welches schnell durchführbar, mit transgenen Mäusen kombinierbar, reproduzierbar und Mikrobiom-abhängig ist [152]. In Mäusen wird HK2 mit der Intensivierung der Inflammation vermehrt induziert. Vergleicht man diese Tiere mit *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen, zeigt sich, dass der Verlust von HK2 im intestinalen Epithel in einem solchen Colitis-Modell protektiv ist. *Hk2*^{ΔIEC}-Mäuse verlieren in diesem Modell deutlich weniger Körpergewicht, haben einen höheren prozentualen Körperfettanteil, eine niedrigere Krankheitsaktivität und niedrigere Werte vom proinflammatorischen Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 1 (CXCL1) im Blut. Diese Ergebnisse ließen sich auch histologisch bestätigen, da *Hk2*^{ΔIEC}-Mäuse deutlich weniger entzündet waren. Es lässt sich daraus schließen, dass der Verlust von HK2 im intestinalen Epithel einen starken anti-inflammatorischen Effekt hat [1].

1.4.7 HK2 Schnittstelle zwischen mitochondrialen Metabolismus mit Zelltod

Mechanistisch liegen dem protektiven Phänotyp ein veränderter mitochondrialer Metabolismus und eine geringere Suszeptibilität gegenüber Zelltod zugrunde. Makroskopisch zeigen sich unter inflammatorischen Bedingungen keine Veränderungen der Organgewichte oder Darmlängen. Eine Gene Ontology-Analyse von Genen mit unterschiedlicher Expression zwischen *Hk2*^{ΔIEC}- und WT-Mäusen in dem intestinalen Epithel aus der Colitis zeigt unter anderem eine Repression von Genen, die mit Zelltod, mitochondrial vermitteltem Zelltod und der Regulation der mitochondrialen Membran assoziiert sind sowie eine Induktion von Genen, die mit der Interferonantwort und antiviraler Abwehr assoziiert sind. Die beobachteten Effekte konnten durch histologisch nachgewiesenen verminderten Zelltod im intestinale Epithel validiert werden. Mitochondrien spielen in einem Großteil der Zelltodprozesse eine zentrale Rolle. Ein Gen, das im Rahmen der Colitis in *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen reduziert ist, ist die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (PPIF). Gleichzeitig kommt es mit Intensivierung des Krankheitsverlaufs zu einer erhöhten *Ppif*-Expression im intestinalen Epithel. Unter entzündlichen Bedingungen ist die *PPIF* Expression auch in *Caco-2*^{ΔHk2} erniedrigt [1]. Dieses Gen codiert für Cyclophilin D (CypD), einen Bestandteil der Mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore (MPTP). Sie umspannt die innere und äußere mitochondriale Membran und verbindet diese. Die exakte Zusammensetzung ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Bekannte Proteine sind jedoch spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC), die ATP-Synthase und die ATP-ADP-Translokase [153]. Auch HK2 ist eng mit der MPTP assoziiert und wird in manchen Studien als ein Bestandteil beschrieben [154]. Eine

enge direkte Interaktion besteht insbesondere mit VDAC [155]. Eine vermehrte Öffnung der MPTP erhöht die Permeabilität der inneren mitochondrialen Membran und erhöht den Ausstrom zelltodinduzierender Signalstoffe [153, 156-160]. Dabei wird postuliert, dass CypD und HK2 synergistisch Zelltod reduzieren [1, 161]. Interessanterweise führt auch eine Deletion von CypD zu einem deutlich milderem Krankheitsverlauf im Colitis-Modell und anderen inflammatorischen Krankheitsmodellen [162-164]. Caco-2^{Δ $Hk2$} -Zellen zeigen eine reduzierte mitochondriale Atmung basal und unter maximaler Kapazität [1]. Diese Veränderungen deuten auf ein Ungleichgewicht der mitochondrialen Elektronentransportkette hin, deren Aktivität im zellulären Mechanismus mit der mitochondrialen Permeabilität korreliert [156, 157, 159, 165, 166].

1.4.8 Zusammenfassung zur Rolle von HK2

Im Rahmen unserer gemeinsamen Publikation und in seiner Dissertation konnte Jacob Hamm zeigen, dass *HK2* in CED und anderen inflammatorischen Erkrankungen erhöht ist. Der Verlust von HK2 im intestinalen Epithel führt unter basalen Bedingungen zu keinem relevanten metabolischen, immunologischen oder inflammatorischen Phänotyp. Im murinen Colitis-Modell führt dieser Verlust jedoch zu einem protektiven, anti-inflammatorischen Phänotyp. Mutmaßlich verantwortlich für diesen Phänotyp ist die eingeschränkte mitochondriale Funktion, welche mit einer verminderten mitochondrialen Permeabilität assoziiert ist. Als mögliches Downstream Target konnte CypD, ein Bestandteil der MPTP, identifiziert werden. Darüber hinaus induziert das intestinale Mikrobiom die *Hk2*-Expression im apikalen Epithelverband, woraus sich ein potenzieller therapeutischer Nutzen annehmen lässt.

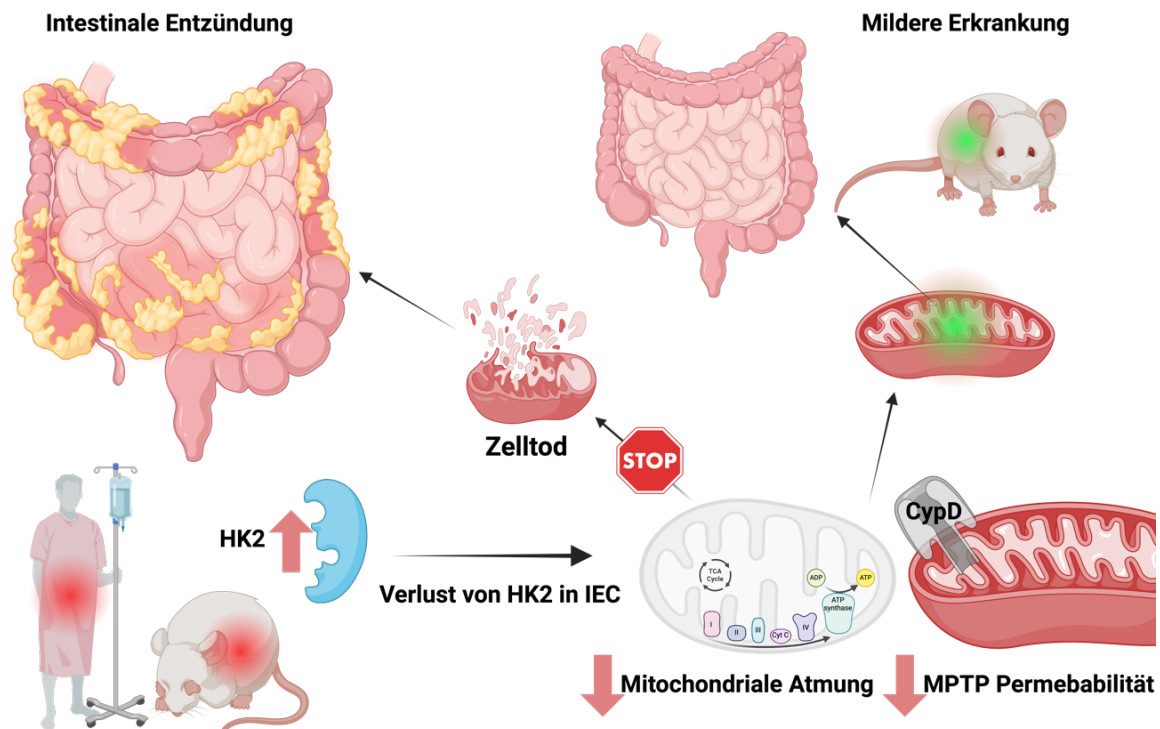


Abbildung 1-3 Graphische Zusammenfassung der Dissertation von Jacob Hamm

Modifiziert von *Hinrichsen et al. 2021 Cell Metabolism*. HK2 ist in CED und im murinen intestinalen Entzündungsmodell erhöht. Der Verlust von HK2 im intestinalen Epithel führt zu einer Reduktion der mitochondrialen Atmung und der Expression von *Ppif* und mutmaßlich zu einer verringerten MPTP Permeabilität. Dies führt zu einer verringerten Suszeptibilität gegenüber Zelltod und damit einhergehend zu einem milderem Krankheitsverlauf von muriner Colitis. Graphik erstellt mit Biorender.

1.5 Ziele und Hypothesen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, wie das Mikrobiom HK2 reguliert und zu evaluieren, ob diese mikrobielle Regulation therapeutisch bei CED eingesetzt werden könnte. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass HK2 unter entzündlichen Bedingungen in murinen intestinalen Epithelzellen vermehrt exprimiert wird. Der Verlust von HK2 unter diesen Bedingungen zeigt keine phänotypischen Veränderungen unter basalen Bedingungen, jedoch eine protektive Wirkung unter entzündlichen Bedingungen. Dieser Mechanismus wird mit Veränderungen in der mitochondrialen Permeabilität und einer daraus resultierenden verminderten Suszeptibilität gegenüber Zelltod in Verbindung gebracht.

Basierend auf den Erkenntnissen der Vorarbeiten und im Verlauf dieser Arbeit wurden drei Haupthypothesen formuliert.

1. HK2 wird durch spezifische mikrobielle Signale reguliert.

Die Identifikation einzelner Mikroben, welche *Hk2* modulierten, erfolgte durch gnotobiotischen Tiermodelle. Mit metabolischen Modellen wurden die Überstände der Bakterien analysiert, um bakterielle Metabolite zu identifizieren, welche in der Lage waren *HK2* zu regulieren. Im Anschluss erfolgte die Validierung der bakteriellen Metabolite *in vitro* (Zellmodell) und *in vivo* (Mausmodell).

2. HK2 und mikrobielle Faktoren interagieren über einen spezifischen Signalweg.

Zur Analyse des Signalwegs zwischen den bakteriellen Metaboliten und HK2 wurden verschiedene chemische Inhibitoren und siRNA-Transfektionsmodelle der bekannten Rezeptoren *in vitro* (Zellmodell) angewandt.

3. HK2 kann als zielgerichtetes therapeutisches Target genutzt werden.

Zunächst wurde *in vitro* (Zellmodell) und *ex vivo* (Organoidmodell) der mitochondriale Metabolismus, sowie die Suszeptibilität gegenüber Zelltod untersucht. Mit und ohne Präsenz der identifizierten bakteriellen Metabolite. Im Anschluss erfolgte *in vitro* (Mausmodell) eine Intervention mit den bakteriellen Metaboliten im Rahmen einer DSS-Colitis.

Als translationaler Ansatz wurden zur Beantwortung dieser Hypothesen Zell-, Maus- und Organoid-Modelle verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels klassischer und moderner molekularbiologischer Methoden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Eine Auflistung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Organismen, Software und Geräte befindet sich im Anhang. Antikörper und Primer sind separat im entsprechenden Abschnitt detailliert aufgeführt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Caco-2 Zellkultur

Die Caco-2-Zellen stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Produktnummer: ACC-169). Diese Zellen wurden aus einem humanen Adenokarzinom des Colons kultiviert. Caco-2^{WT}- und Caco-2^{ΔHk2}-Zellen wurden aus Caco-2-Zellen generiert (2.2.3). Die Zellen wurden unter folgenden Bedingungen kultiviert: bei 37°C mit 5 % atmosphärischem CO₂ im Zellinkubator, in Minimal Essential Medium (MEM) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 31095-052) mit 20 % fötalem Kälberserum (FBS) (Biochrom, Produktnummer: S0115). Das Zellkulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Vor der Aufteilung wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden mit eiskalter, 1x phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 10010023) gewaschen, um Rückstände des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 25300062) dissoziiert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von Zellkulturmedium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und das überschüssige Medium abpipettiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Konzentration auf die jeweilige Zellkulturplatten (Sarstedt, Produktnummer: 83.3920 (6 Well), 83.3922.005 (24 Well) und 83.3925 (96 Well)) ausplattiert (Tabelle 2.1). Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen 24 Stunden vor der Stimulation auf eine Dichte von 70 % ausplattiert. Proben wurden, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, 24 Stunden nach der Stimulation entnommen. Die Konzentrationen der Stimulanzen sind im entsprechenden Ergebnisteil aufgeführt.

Tabelle 2.1 Experimentelles Design, Zellzahl und Nährmedium Caco-2-Zellen

Experiment	Zellkulturplatte	Zellzahl/Well	Medium/Well [ml]
Proteinlysate	6-Well-Platte	2×10^5	2
RNAlysate	24-Well-Platte	0.5×10^5	0.5
CRISPR	96-Well-Platte	1	0.1

2.2.2 HT-29 Zellkultur

Die HT-29 Zellen stammen aus der DSMZ (Produktnummer: ACC-299). Diese Zellen wurden aus einem humanen Adenokarzinom des Colons kultiviert. Sie wurden unter folgenden Bedingungen kultiviert: bei 37°C mit 5 % atmosphärischem CO₂ im Zellinkubator, in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 31095-052) mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS). Das Zellkulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Vor der Aufteilung wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, um Rückstände des Mediums zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA dissoziiert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von Zellkulturmedium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und das überschüssige Medium abpipettiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Konzentration auf die entsprechenden Zellkulturplatten ausplattiert (Tabelle 2.2). Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen 24 Stunden vor der Stimulation auf eine Dichte von 70 % ausplattiert. Proben wurden, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, 24 Stunden nach der Stimulation entnommen. Die Konzentrationen der Stimulanzien sind im entsprechenden Ergebnisteil aufgeführt.

Tabelle 2.2 Experimentelles Design, Zellzahl und Nährmedium HT-29 Zellen

Experiment	Zellkulturplatte	Zellzahl/Well	Medium/Well [ml]
Proteinlysate	6-Well-Platte	2×10^5	2
RNAlysate	24-Well-Platte	$0,5 \times 10^5$	0,5

2.2.3 Herstellung eines Caco-2^{ΔHK2} CRISPR Klons

Um eine HK2-defiziente Caco-2-Zelllinie zu generieren, wurde das GeneArt® Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) Nuclease Vector mit dem CD4 Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: A21175) verwendet. Im Folgenden wird eine prägnante Zusammenfassung der entscheidenden Schritte präsentiert, gegebenenfalls unter Verweis auf das entsprechende Herstellerprotokoll. Ein Konstrukt wurde entworfen, um nicht-kodierende Single-Guide-RNA zur Expression zu bringen, welche die CRISPR-RNA beeinflusst. Trans-activating crRNA und eine Cas9-Endonuklease wurden in der Caco-2-Zelllinie transfiziert, um das Zielgen *HK2* zu spalten. Zu Beginn wurden einsträngige DNA-Oligonukleotide entworfen, die für die CRISPR Ziel-RNA kodieren (Vorwärtsstrang), sowie das komplementäre Pendant (Reverserstrang). Diese wurden basierend auf einer Zielsequenz von 19 bis 20 Nukleotiden konzipiert, die sich in der Nähe des NCG-Protospacer-Nachbarmotivs am 3'-Ende der Zielsequenz befindet. Die Auswahl erfolgte mittels dem GeneArt® CRISPR Search and Design Tool (HK2_CRIS_F, Sequenz (5' zu 3'): TAAGCGGTTCCGCAAGGAGAGTTTT; HK2_CRIS_R, Sequenz (5' zu 3'): TCTCCTTGCGGAACCGCTTACGGTG). Die Oligonukleotide des oberen und unteren Strangs wurden hybridisiert, indem sie bei 95°C für 4 Minuten und bei 25°C für 5-10 Minuten inkubiert wurden, um doppelsträngige Oligonukleotide zu generieren. Die dsDNA wurde in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector kloniert und in One Shot® TOP10 chemisch kompetente *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: C404010) transferiert, welche eine stabile Replikation einer hohen Anzahl an Kopien von Plasmiden mit dem CRISPR Nuclease Konstrukt ermöglichen. Die transformierten Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung (2.7.1) auf die Einhaltung der gewünschten Oligonukleotidsequenz überprüft. Klone mit den gewünschten Sequenzen wurden zur längerfristigen Lagerung in Glycerol konserviert. Die Plasmide wurden mittels des Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent Kits (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: L3000015) in die Caco-2-Zellen transfiziert, wobei das Herstellerprotokoll befolgt wurde. Nach 48 Stunden Transfektion wurden die Zellen mittels des Dynabeads® Cluster of Differentiation 4 Positive Isolation Kits (Invitrogen, Produktnummer: 11331D) selektiert und gereinigt, gemäß dem Herstellerprotokoll. Eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen mechanistischen Schritte wird im Folgenden präsentiert. Bei erfolgreicher Transfektion exprimieren die Caco-2-Zellen

CD4. In die Zellsuspension werden ausschließlich magnetische Perlen (Dynabeads) gegeben, die an das CD4 an der Zelloberfläche der Plasmid-positiven Zellen binden. Die Zellsuspension wird in ein magnetisches Stativ für Eppendorf-Röhrchen platziert. Aufgrund des Magnetismus werden Zellen, die an Dynabeads binden, an den Rand des Eppendorf-Röhrchens bewegt. Der Überstand, der keine Dynabeads enthält, wird verworfen, und die Suspension aus Dynabead-Zellen wird resuspendiert. Dieser Mechanismus wird in mehreren Waschschritten wiederholt, um die Zellen zu reinigen und den prozentualen Anteil der erfolgreich transfizierten Zellen zu erhöhen. Nach der Aufreinigung werden die Dynabeads von den Zellen abgelöst, und die Zellzahl der aufgereinigten Lösung wird mikroskopisch bestimmt. Anschließend werden die Zellen auf einer 96-Well-Platte in 100 μ l MEM ausplattiert. Mikroskopisch wurde überprüft, dass sich in jedem Well nur eine Zelle befand. Falls 2 oder mehr Zellen in einem Well vorhanden waren, wurden diese aussortiert. Die Zellen wurden gemäß den bereits beschriebenen Verfahren kultiviert (2.2.1). Eine Überprüfung der selektierten Klone erfolgte durch Western Blot (2.6.4), wobei der Anti-Hexokinase 2 Antikörper (OTI4C5) (Novus Biologicals, Produktnummer: NBP2-022272) verwendet wurde. Caco-2-Klone, die keine HK2-Bande mehr aufwiesen, wurden als HK2-defiziente Zellen betrachtet und als Caco-2 Δ HK2 bezeichnet. Caco-2-Klone, die eine HK2-Bande aufwiesen, obwohl sie denselben Transfektions- und Selektionsprozess durchlaufen hatten, wurden in Experimenten als Kontrolle genutzt und als Caco-2^{WT}-Zellen betitelt. Die Kultur dieser neu entstandenen Zelllinien erfolgte gemäß den bereits ausführlich beschriebenen Verfahren (2.2.1).

2.3 Intestinale Organoiden

2.3.1 Gewinnung von intestinalen Organoiden

Zur Erzeugung intestinaler Organoiden wurden intestinale Stammzellen mithilfe einer EDTA-basierten Ca²⁺/Mg²⁺-Chelatierungsmethode isoliert, wie sie erstmalig von *Sato et al.* beschrieben wurde [167]. Hierbei erfolgte die Prozedur gemäß der nachfolgenden Übersicht: Das murine Darmsegment wurde abgesetzt und longitudinal aufgeschnitten. Nach der Öffnung wurde der Darm mehrfach mit eiskaltem PBS gereinigt. Anschließend wurde der ausgewählte Darmabschnitt in 5 mm lange Segmente unterteilt und für 40 Minuten auf Eis in eiskaltes 1x PBS mit 15 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Produktnummer: E9884) (Dünndarm-Organoiden) oder 30 Minuten auf Eis in eiskaltes 1x PBS mit 2,5 mM EDTA (Colon-Organoiden) gegeben. Dabei erfolgte

ein intermittierendes Auf- und Abpipettieren, um die Zellen zu dissoziieren. Nach Abnahme des Überstands wurden die Darmabschnitte mit einer neuen PBS-Lösung aufgefüllt. Dieser Waschzyklus wurde insgesamt 4-mal wiederholt. Die resultierende Krypten-Suspension, die die intestinalen Stammzellen enthielt, wurde durch ein 100 µm Zellsieb filtriert und für 5 Minuten bei 400 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Krypten-Pellet wurde in einer 60:40 (v/v) Mischung aus BD Matrigel Growth factor reduced, Phenol red free (BD Bioscience, Produktnummer: 356231) und eiskaltem PBS resuspendiert (Matrigel). Das Verhältnis betrug 5-10 Krypten/µl Matrigel. Für die Aussaat wurden 40-50 µl dieser Suspension pro Well auf eine 24-Well-Platte aufgebracht und bei 37 °C und 5 % (v/v) atmosphärischem CO₂ für 15 Minuten inkubiert, um die Polymerisation des Matrigels zu ermöglichen. Anschließend wurden vorsichtig 500 µl des entsprechenden Nährmediums pro Well hinzugefügt. Durch das polymerisierte Matrigel konnten die Organoide in einer 3D-Matrix wachsen, die der Basalmembran des intestinalen Epithels ähnelt. Aus den Stammzellen innerhalb der isolierten Krypten bildeten sich polarisierte 3D-Organoiden mit einem zentralen Lumen. Die basale Seite des Epithels war nach außen gerichtet, während die apikale Seite dem zentralen Lumen zugewandt war [168].

2.3.2 Noggin-konditioniertes Medium

Human Embryonic Kidney (HEK)-293 Zellen (DSMZ, Produktnummer ACC-305) wurden zur Generierung des Noggin-konditionierten Mediums eingesetzt [169]. Diese wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Zeissig (Center for Regenerative Therapies, Technische Universität Dresden, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Nach Stimulation mit Puromycin (Sigma-Aldrich, Produktnummer: P7255) sekretieren die HEK-293 Zellen das Protein Noggin. Im Anschluss folgt eine Zusammenfassung des Verfahrens zur Gewinnung des Noggin-konditionierten Mediums: Die Zellen wurden in DMEM + 10 % (v/v) FBS aufgetaut. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für drei Zyklen in DMEM + 10 % (v/v) FBS + 10 mg/ml Puromycin kultiviert. Nach Abschluss des dritten Zyklus wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 verdünnt und in DMEM + 10 % (v/v) FBS weiter kultiviert. Nach vier Tagen wurde das Medium gesammelt und zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der resultierende Überstand wurde aufbewahrt. Die Zellen wurden erneut für vier Tage in DMEM + 10 % (v/v) FBS kultiviert. Das Medium der Zellen wurde erneut gesammelt und zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der entstandene Überstand wurde aufbewahrt. Schließlich wurde

der gesammelte Überstand aus beiden Chargen zu einem 50 % (v/v) Gemisch kombiniert und als Noggin-konditioniertes Medium verwendet.

2.3.3 R-Spondin-1-konditioniertes Medium

HEK-293 Zellen dienen der Generierung des R-Spondin-1-konditionierten Mediums [169] und wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Prof. Zeissig zur Verfügung gestellt. Nach Stimulation mit Zeocin (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 46-0509) sezernieren die HEK-293 Zellen das Protein R-Spondin-1. Im Folgenden wird eine Zusammenfassung des Verfahrens zur Gewinnung des R-Spondin-1-konditionierten Mediums präsentiert: Die Zellen wurden in DMEM + 10 % (v/v) FBS aufgetaut. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für drei Zyklen in DMEM + 10 % (v/v) FBS + 300 mg/ml Zeocin kultiviert. Nach Abschluss des dritten Zyklus wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 verdünnt und in DMEM + 10 % (v/v) FBS weiter kultiviert. Nach vier Tagen wurde das Medium gesammelt und zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der resultierende Überstand wurde aufbewahrt. Die Zellen wurden erneut für vier Tage in DMEM + 10 % (v/v) FBS kultiviert. Das Medium der Zellen wurde erneut gesammelt und zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der entstandene Überstand wurde aufbewahrt. Schließlich wurde der gesammelte Überstand aus beiden Chargen zu einem 50 % (v/v) Gemisch kombiniert und als R-Spondin-1-konditioniertes Medium verwendet.

2.3.4 L-WRN-konditioniertes Medium

L-WRN Zellen (ATCC, Produktnummer: CRL-3276) dienen der Generierung des L-WRN-konditionierten Mediums [169] und wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Zeissig zur Verfügung gestellt. Nach Stimulation mit Genectin (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 10131035) und Hygromycin (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 10687010) sezernieren sie Wnt, R-Spondin-1 und Noggin. Im Folgenden wird eine Zusammenfassung des Verfahrens zur Gewinnung des L-WRN-konditionierten Mediums präsentiert: Die Zellen wurden in DMEM + 10 % (v/v) FBS aufgetaut. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für drei Zyklen in DMEM + 10 % (v/v) FBS + 0,4 mg/ml Genectin und Hygromycin 0,5 mg/ml kultiviert. Nach Abschluss des dritten Zyklus wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 verdünnt und in DMEM + 10 % (v/v) FBS weiter kultiviert. Nach vier Tagen wurde das Medium gesammelt und zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der resultierende Überstand

wurde aufbewahrt. Die Zellen wurden erneut für vier Tage in DMEM + 10 % (v/v) FBS kultiviert. Das Medium der Zellen wurde erneut gesammelt und zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der entstandene Überstand wurde aufbewahrt. Schließlich wurde der gesammelte Überstand aus beiden Chargen zu einem 50 % (v/v) Gemisch kombiniert und als L-WRN-konditioniertes Medium verwendet.

2.3.5 Kultur von intestinalen Organoiden

Die in Matrigel-eingebetteten Organoide wurden bei 37 °C unter einer 5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Als Nährmedium für Dünndarmorganoide wurde entweder 500 µl IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse) (STEMCELL Technologies, Produktnummer: 06005) oder 500 µl eines Nährmediums, das mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) (R&D Systems, Produktnummer: 236-EG), Noggin und R-Spondin-1 (ENR-konditioniertes Medium) supplementiert war, verwendet. Als Nährmedium für Colonorganoide wurde 500 µl eines Nährmediums, das mit Wnt, Noggin und R-Spondin-1 (L-WRN-konditioniertes Medium) supplementiert war, verwendet. Die genaue Zusammensetzung des L-WRN und ENR-konditionierten Mediums sowie des hierfür benötigten 2x Basal Mediums ist in den entsprechenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 2.3, Tabelle 2.4, Tabelle **2.5**). Das 2x Basal Medium besteht aus Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 (Advanced DMEM/F12) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 12634028), Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 15140-122), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: H3375), GlutaMAX-1 (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 35050-038) und N-Acetylcystein (NAC) (Sigma-Aldrich, Produktnummer: A9165-25G). Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, und die Organoide wurden wöchentlich geteilt. Zur Teilung der Organoide wurde das Medium entfernt, und anschließend wurden 500 µl eiskaltes PBS pro Well hinzugefügt. Das Matrigel wurde mechanisch mit der Pipettenspitze abgelöst. Die Suspension der Organoide desselben Genotyps wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben und bei 400 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Organoidpellet wurde, wie bereits beschrieben, in Matrigel resuspendiert und in eine 24-Well-Platte ausplattiert. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit zur Polymerisation wurde 500 µl des entsprechenden Nährmediums hinzugefügt. Vor der Durchführung eines Experiments

wurden die Organoide für mindestens 2 Teilungspassagen nach der Isolation bzw. dem Auftauen kultiviert. Stimulationen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Für die Kryokonservierung wurde das Medium abpipettiert, und 500 µl CryoStor® CS10 (STEMCELL Technologies, Produktnummer: 07930) wurden hinzugefügt. Die Suspension wurde in ein Kryoröhrchen (CryoPure 2.0 ml) (Sarstedt, Produktnummer: 72.380.002) überführt und bei -80 °C in einer CoolCell® Box (Biocision, Produktnummer: BCS-405) gelagert, um einen schonenden Gefrierprozess über 24 Stunden zu ermöglichen. Anschließend wurden die Organoide bei -80 °C bis zur weiteren Nutzung aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, und der Inhalt wurde sofort in ein 15 ml Falcon Röhrchen, das 2 ml Advanced DMEM/F12 enthielt, überführt. Das Falcon Röhrchen wurde bei 400 g für 3 Minuten zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Organoidpellet wurde, wie oben beschrieben, in Matrigel resuspendiert und ausplattiert.

Tabelle 2.3 Zusammensetzung 2x Basal Medium

2x Basal Medium	Stammlösung	Finale Konzentration	Volumen (für 25 ml)
Advanced DMEM/F12	-	-	23.4 ml
Pen/Strep	10 000 U/ml	140 U/ml	500 µl
HEPES	1 M	14 mM	500 µl
GlutaMAX-1	200 M	2.8 mM	500 µl
NAC	500 mM	1.4 mM	100 µl

Tabelle 2.4 Zusammensetzung ENR-konditioniertes Medium

ENR-konditioniertes Medium	Stammlösung	% (v/v)
2x Basal Medium		70
Noggin konditioniertes Medium		10
R-Spondin-1 konditioniertes Medium		20
EGF	50 µg/ml	0,1

Tabelle 2.5 Zusammensetzung L-WRN-konditioniertes Medium

L-WRN-konditioniertes Medium	Stammlösung	% (v/v)
2x Basal Medium		35
L-WRN konditioniertes Medium		50
FBS		15

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Zytokinlevel im Mausserum zu bewerten, wurde ein ELISA durchgeführt. Zur Detektion von murinem CXCL1 wurde das CXCL1/KC DuoSet ELISA Quantikine (R&D Systems, Produktnummer: MKC00B) sowie ein Standard ABTS ELISA Development Kit von (Peprotech, Produktnummer: 250-11) gemäß den Herstellerprotokollen verwendet. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit einem antigenspezifischen Capture-Antikörper beschichtet. Anschließend wurden die Platten in PBS + 0,05 % (v/v) Polysorbat 20 (Tween) (Carl Roth, Produktnummer: 9127.2) gewaschen und mit PBS + 1 % (v/v) bovinem Serumalbumin (BSA) (Carl Roth, Produktnummer: 8076.4) blockiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Streptavidin-gebundener Meerrettichperoxidase (HRP) Antikörper gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Die Absorptionsfähigkeit wurde mit dem Infinite M200 Pro Microplate Reader von Tecan und der dazugehörigen Tecan i-control™ Software 1.9 gemessen.

2.4.2 Seahorseanalyse Caco-2

Der Seahorse XFe24 Analyzer ermöglicht die Echtzeitmessung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR). Die OCR von Caco-2-Zellen wurden gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung des Seahorse XF Mito Stress Test Kits (Agilent Technologies, Produktnummer: 103015-100) erfasst. Hierbei fungiert die OCR als Maß für die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Für die basale Messung wurden 4×10^4 Caco-2^{ΔHK2} oder Caco-2^{WT}-Zellen bereits 24 Stunden im Voraus auf die Seahorse XF24 V7 PS Cell Culture Microplate (Agilent Technologies, Produktnummer: 100777-004) ausgesät. Um den Effekt von Butyrat zu untersuchen, wurden die Zellen in derselben Dichte 48 Stunden vorher ausgesät, um eine 24-stündige Stimulation mit Butyrat zu ermöglichen. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Butyrat-Stimulation. Bei der Messung mit Butyrat wurde dem Medium 2 mM Butyrat hinzugefügt. Für das Seahorse XF Mito Stress Test Kit erfolgte zunächst die Messung der OCR unter basalen Bedingungen. Oligomycin wurde verwendet, um die ATP-Synthase zu inhibieren. Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) induzierte einen Kollaps des Protonengradienten entlang der mitochondrialen Membran. Die Reservekapazität der Atmungskette wurde als Differenz zwischen maximaler und basaler Zellatmung berechnet. Zur Unterbindung der mitochondrialen Atmung, die durch Prozesse

außerhalb der Mitochondrien induziert wird, wurden Rotenon und Antimycin A als Negativkontrolle zugesetzt. Für jedes Experiment wurden 9 Replikate aus 3 unabhängigen Versuchen verwendet.

2.4.3 Seahorseanalyse intestinale Organoide

Der Seahorse XFe24 Analyzer misst die OCR in Echtzeit. Die OCR von intestinalen Organoiden wurde gemäß den Herstellerangaben für Zellen, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, mithilfe des Seahorse XF Mito Stress Test Kits gemessen. Die OCR dient hierbei als Indikator für OXPHOS. Für diese Messung wurde die herkömmliche Organoidkultur (2.3.5) modifiziert. Anstelle der Seahorse XF24 V7 PS Cell Culture Microplate wurden Seahorse XF24 V28 PS Cell Culture Microplates (Agilent Technologies, Produktnummer 100882-004) verwendet. Letztere weisen eine Tiefe von 812 µm auf, im Gegensatz zu den erstgenannten mit einer Tiefe von 200 µm. Dies ist von Bedeutung, da bei der Messung der Deckel der Platte durch einen Injektionsport ausgetauscht wird und bei den herkömmlichen Platten der Injektionsport innerhalb der 3D-Matrix der Organoide platziert werden würde. Weiterhin wurde die Ausplattierung auf 20 µl pro Well reduziert, im Gegensatz zu den zuvor verwendeten 50 µl. Hierfür wurde pures Matrigel ohne PBS verwendet. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die Matrix nicht durch die Injektion beschädigt wurde. Die Dichte von 5-10 Krypten/1 µl Matrigel wurde beibehalten. Die Organoide wurden eine Woche vor der Messung ausplattiert, um ausreichendes Wachstum zu gewährleisten. Das Nährmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Für das Seahorse XF Mito Stress Test Kit wurde zunächst die OCR unter basalen Bedingungen gemessen. Mit Oligomycin wurde der ATP-Synthase inhibiert. FCCP induzierte einen Kollaps des Protonengradienten entlang der mitochondrialen Membran. Die Reservekapazität der Atmungskette wurde aus der Differenz zwischen maximaler und basaler Zellatmung berechnet. Rotenon und Antimycin A wurden als Negativkontrolle zugesetzt, um die mitochondriale Atmung, die von Prozessen außerhalb der Mitochondrien induziert wird, zu unterbinden. Für jedes Experiment wurden 8 Replikate aus 2 unabhängigen Versuchen verwendet. Im Gegensatz zum Zellmodell werden die Organoide während der Messung von basolateral, statt apikal stimuliert. Da die Dichte der Organoide trotz all dieser Umstände variieren kann, wurde nach der Messung die mRNA isoliert (2.5.1) und die gemessenen Werte im Verhältnis zum mRNA-Gehalt normalisiert. Aufgrund

des hohen Proteingehalts der Matrigelmatrix und der daraus resultierenden Abweichungen wurde von einer Messung der Proteinkonzentration abgesehen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 mRNA-Isolation

Die mRNA-Extraktion erfolgte unter Anwendung des RNeasy Mini Kits (QiaGen, Produktnummer: 74004) gemäß den Herstellervorgaben. Zur Zersetzung und Homogenisierung von murinem Gewebe kam der TissueLyser II von QiaGen in 600 µl RNeasy Lysis Buffer (RLT) (QiaGen, Produktnummer: 79216) mit 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Produktnummer: 444203) zum Einsatz. Die Lyse von Zellen und Organoiden erfolgte direkt in 350 µl RLT + 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol. Anschließend wurden die Lysate mit 350 µl 70 % EtOH vermischt und in eine RNeasy Spin Column (aus dem RNeasy Mini Kit) überführt. Die mRNA-Isolation erfolgte dann gemäß dem Herstellerprotokoll. Der Verdau mit DNase wurde unter Verwendung des RNase-free DNase Sets (Qiagen, Produktnummer: 79254) durchgeführt. Schließlich wurde die mRNA in 30-50 µl RNase-free Water (QiaGen, Produktnummer: 129112) gelöst, und die Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers gemessen. Die isolierte mRNA wurde entweder zur cDNA-Synthese verwendet oder sofort bei -80 °C gelagert.

2.5.2 cDNA-Synthese

Es wurden 100-1000 ng mRNA pro Probe mit reverser Transkriptase (RT) in die komplementäre cDNA transkribiert. Hierfür kam das Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: K1651) zum Einsatz, wobei das Herstellerprotokoll befolgt wurde. Die verwendeten Materialien stammen, sofern nicht anders angegeben, aus dem zuvor genannten Kit. Zu Beginn wurden 0,125 µl Oligo-(dt)18-Nukleotide mit 0,5 µl Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (jeweils 10 mM) zur isolierten mRNA hinzugefügt. Diese Mischung wurde mit Nuclease-free Water (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: AM9916) auf ein Gesamtvolumen von 3 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Probe für 5 Minuten bei 65 °C in einem 96-well-Thermocycler, um die Sekundärstruktur der mRNA aufzubrechen. Die Proben wurden danach bei 4 °C inkubiert, um die Primer-Hybridisierung zu ermöglichen. Es wurden 2 µl RT-Buffer und 0,5 µl RT-Enzym hinzugefügt. Die Proben wurden daraufhin 10 Minuten bei 25 °C, 15 Minuten bei 50 °C, 5 Minuten bei 85 °C

inkubiert und anschließend bei 4 °C, um die reverse Transkription zu ermöglichen. Die resultierende cDNA wurde mit Nuclease-free Water auf eine Konzentration von 10 ng/µl pro Probe verdünnt. Falls nicht sofort weiterverwendet, wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde unter Verwendung von SYBR Green durchgeführt, einer fluoreszierenden Färbemethode, bei der der Farbstoff in die DNA interkaliert wird. Zur Amplifikation und simultanen Quantifizierung wurden Oligonukleotide eingesetzt, die die kodierende Region des entsprechenden Gens als Zielstruktur hatten. Die Auswahl der Primer wurde anhand gängiger Transkriptionsmodelle getroffen, die in der National Center for Biotechnology Information Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) verfügbar sind. Die ausgewählten Primer wurden bei der Microsynth SeqLab GmbH bestellt und wurden entsprechend vollständiger Exon-Exon-Abdeckung, einer Länge von 20-25 Basen, einer optimalen Hybridisierungstemperatur von 60 °C und einer Amplicon-Länge von 200-400 Basenpaaren gestaltet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Für die qRT-PCR wurde der SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Produktnummer: 4472920) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Dabei wurden 5 µl der cDNA-Probe (1 ng/µl) mit 4,5 µl SYBR® Select Master Mix und 0,5 µl des entsprechenden Primer-Mix, der 5 µM Forward- und Reverse-Primer enthält, vermengt. Die Proben wurden in Duplikaten in eine 384-Well-Platte (Sarstedt, Produktnummer: 72.1984.202) pipettiert. Die qRT-PCR wurde unter Anwendung des ViiA 7 Real-Time PCR Systems durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden unter Normalisierung auf das entsprechende mRNA-Level des Haushaltsgens als relativer Fold-Change dargestellt. Als Haushaltsgen wurden Beta Actin verwendet.

Tabelle 2.6 Primer für qRT-PCR

Primer	Gen	Organismus	Richtung	Sequenz (5' zu 3')
hu_Actin_F	<i>ACTB</i>	Human	Forward	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
hu_Actin_R	<i>ACTB</i>	Human	Reverse	CTCCTTAATGTACGCACGAT
hu_HK2_F	<i>HK2</i>	Human	Forward	AAGGCTTCAAGGCATCTG
hu_HK2_R	<i>HK2</i>	Human	Reverse	CCACAGGTCATCATAGTTCC
hu_PPIF_F	<i>PPIF</i>	Human	Forward	TTCGGCTACAAAGGCTCCAC
hu_PPIF_R	<i>PPIF</i>	Human	Reverse	TGTGCCATTGTGGTTGGTGA
hu_Ffar2_F	<i>FFAR2</i>	Human	Forward	GTAGCTAACACAAGTCCAGTCCT
hu_Ffar2_R	<i>FFAR2</i>	Human	Reverse	CTAGGTGTTGCTTTGAAGCTTGT
hu_Ffar3_F	<i>FFAR3</i>	Human	Forward	CTAAGGGTATGCGCGCTAAAG
hu_Ffar3_R	<i>FFAR3</i>	Human	Reverse	AGCCCAATCCATAGTGTGTGG
hu_Hcar2_F	<i>HCAR2</i>	Human	Forward	ATGTTGGCTATGAACCGCCAG
hu_Hcar2_R	<i>HCAR2</i>	Human	Reverse	GCTGCTGTCCGATTGGAGA
mu_Hk2_F	<i>Hk2</i>	Maus	Forward	CCCTGTGAAGATGTTGCCCACT
mu_Hk2_R	<i>Hk2</i>	Maus	Reverse	CCTTCGCTTGCCATTACGCACG
mu_Actin_F	<i>Actb</i>	Maus	Forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
mu_Actin_R	<i>Actb</i>	Maus	Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

2.5.4 Transfektion von small interfering RNA (siRNA)

Die Proteinbiosynthese von *FFAR3*, *FFAR2* und *HCAR2* wurde mittels RNA-Interferenz unterdrückt, wobei zur RNA-Interferenz siRNA verwendet wurde. Caco-2-Zellen wurden simultan mit einer humanen Smart Pool siRNA für *FFAR3* (Horizon, Produktnummer: M-005572-00-0005), *FFAR2* (Horizon, Produktnummer: M-005574-00-0005) und *HCAR2* (Horizon, Produktnummer: M-006688-03-0005) transfiziert. Als Kontrolle wurden Caco-2-Zellen mit der mitgelieferten Mock-siRNA (ohne RNA-Interferenz) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Viromer Blue Kits for siRNA transfection (Lipocalyx, Produktnummer: VB-01LB-00, Anmerkung: Nicht länger kommerziell verfügbar). Die siRNA wurde 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen mit dem genannten Kit transfiziert. Die Zellzahl wurde gemäß *Tabelle 2.1* festgelegt. Für den Versuch wurde die siRNA gegen *FFAR3*, *FFAR2* und *HCAR2* gleichzeitig eingebracht, wobei jeweils 2,8 µM auf 15 µl gelöst verwendet wurden. Anschließend wurden 3 µl Viromer® BLUE (aus Viromer Blue Kit) mit 270 µl Buffer Blue (aus Viromer Blue Kit) vermischt. Von dieser Mischung wurden 135 µl mit den 15 µl der gelösten siRNA kombiniert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl der vorbereiteten transfektionsfähigen siRNA auf ein Well der 24-Well-Platte pipettiert. Dieser Ansatz wurde entsprechend der Anzahl der Ziel-RNA dreifach wiederholt. Als Kontrolle wurde der dreifache Ansatz an Mock-siRNA verwendet. Um die Interaktion von Butyrat und den genannten Rezeptoren sowie deren Einfluss auf *HK2* zu untersuchen, wurden die Zellen 48 Stunden nach der

siRNA-Transfektion für 24 Stunden mit Butyrat stimuliert. Anschließend wurde die mRNA der Zellen isoliert, die entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C zur Lagerung eingefroren wurde.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Proteinisolation aus Zellen und Organoiden

Zunächst wurde das Medium der Zellen und Organoiden entfernt, und diese wurden zweimal gründlich mit eiskaltem PBS gespült. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen bzw. Organoiden unter Verwendung von eiskaltem Radioimmunpräzipitations (RIPA) Puffer (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 89900) und 1 % (v/v) 100x Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 78452). Die Lysate wurden mittels Ultraschalls denaturiert und kurzzeitig auf 95 °C erhitzt. Nach dieser Behandlung wurden die Lysate für 15 Minuten bei 4 °C mit 16.000 x g zentrifugiert, um das Proteinlysate zu reinigen und überschüssige Zellreste zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, welcher das gereinigte Proteinlysate enthielt, in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß überführt. Diese Proben wurden entweder unmittelbar weiterverarbeitet oder zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

2.6.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde mithilfe des kolorimetrischen detergent compatible Protein Assay (BioRad, Produktnummer: 500011) gemäß der Herstellervorgaben gemessen. Dieser Assay, ein optimierter Lowry Assay, basiert auf der Biuret-Reaktion. Moleküle mit mindestens 2 Peptidkomponenten bilden in einer alkalischen Lösung einen Komplex mit Kupferionen, was zur Bildung von monovalenten Kupferionen führt. Diese interagieren wiederum mit dem Folin-Reagenz des Assays und bewirken durch eine Konformationsänderung einen Farbumschwung der Lösung. Mit zunehmender Proteinmenge wird die Lösung dunkelviolett. Die maximale Absorption tritt bei 750 nm auf [170]. Für die Proteinkonzentrationsmessung wurden 5 µl des Lysats mit 5 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und mit den Reagenzien des Assays vermischt. Die Absorption wurde nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln mit dem Infinite M200 Pro Microplate Reader von Tecan gemessen. Die Resultate wurden anschließend mit der zugehörigen Tecan i-control™

software 1.9 ausgewertet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration diente eine BSA-Standardkurve.

2.6.3 Protein-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele verwendet, bestehend aus einem 12 % oder 15 % Acrylamid-Separationsgel und einem 3 % Stacking-Gel (Tabelle 2.7). Die Lysate wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration mit Probenpuffer nach Lämmli (Sigma-Aldrich, Produktnummer: S3401-10VL) aufgefüllt und auf 95 °C erhitzt. Die gewählte Proteinkonzentration der Lysate betrug 1 µg/µl. Anschließend wurden vorsichtig 10 µl der Probe in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbeurteilung der Proteinbanden kam PageRuler™ Plus Prestained Protein (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer 26619) zum Einsatz, welches einen Zielbereich von 10 bis 250 kDa abdeckt. Es wurden Standard-SDS-PAGE-Bedingungen verwendet. Die Gelelektrophorese wurde für 15 Minuten in 1 x Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)/Glycin/SDS (TGS) (Bio-Rad, Produktnummer: 1610732) bei 75 Volt (Maximale Stromstärke 300 mA) durchgeführt und anschließend für 60 Minuten bei 150 Volt (Maximale Stromstärke 300 mA) im XCell SureLock Mini Cell System (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer EI0001). Mit dieser Methode wurden die Proteine der Lysate entsprechend ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung separiert.

Tabelle 2.7 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Bestandteile	3 % Stacking-Gel	12 % Acrylamid Gel	15 % Acrylamid Gel
Bidestilliertes Wasser	3,5 ml	2,5 ml	1,95 ml
Puffer	2,5 ml (Separation)	2,5 ml (Separation)	0,75 ml (Stacking)
30 % Bisacrylamid	4 ml	5 ml	0,3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	30 µl

2.6.4 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden von den Gelen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Bio-Rad, Produktnummer: 162-0177) übertragen. Zunächst wurden die Membranen gemäß den Herstellervorgaben aktiviert. Dazu wurden die Membranen für 10 Sekunden in Methanol (Merck, Produktnummer: 1.06035.1000) geschwenkt und

anschließend für 5 Minuten in destilliertes Wasser eingetaucht, um überschüssiges Methanol zu entfernen. Nach diesem Schritt wurde die aktivierte PVDF-Membran in den ersten Anodenpuffer gelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte mittels Semi-Dry-Blotting mit dem Trans-Blot Turbo™ Transfer System. Hierbei wurden Puffer aus einem Kathodenpuffer und zwei Anodenpuffern verwendet, deren Zusammensetzung gemäß dem Herstellerprotokoll erfolgte. Die Transferreaktion wurde bei 0,3 A und 25 Volt über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt. Die proteinbeladenen PVDF-Membranen wurden entweder mit 5 % Blotto Non-Fat Dry Milk (Milchpulver) (Santa Cruz, Produktnummer: sc-2325) oder mit FBS für eine Stunde blockiert. Sowohl Milchpulver als auch FBS wurden im Verhältnis 5 % (w/v) mit TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) supplementiert mit 0,1 % (v/v) Tween (TBS-Tween 20) vermischt. Dieser Prozess und die folgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur unter konstanter Bewegung (Falcon-Roller), um unspezifische Reaktionen zu minimieren. Anschließend wurden die geblockten PVDF-Membranen dreimal mit TBS-Tween 20 gewaschen. Die geblockten PVDF-Membranen wurden mit den entsprechenden Primärantikörpern (Tabelle 2.8) und Sekundärantikörpern (Tabelle 2.9) inkubiert. Die Antikörper wurden gemäß den Herstellervorgaben in Milchpulver oder FBS 5 % (w/v) TBS-Tween 20 gelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass die korrespondierenden Primär- und Sekundärantikörper jeweils in Milchpulver oder FBS gelöst wurden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt, und die inkubierte PVDF-Membran wurde dreimal jeweils für 10 Minuten mit TBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, der an HRP gekoppelt war, inkubiert. Für Maus-Primärantikörper wurde Anti-Mouse IgG (TH Geyer, Produktnummer: NA931V) verwendet, für Kaninchen-Primärantikörper wurde Anti-Rabbit (TH Geyer, Produktnummer: NA934V) eingesetzt, und für HRP-gekoppeltes Anti-beta-Actin (Abcam, Produktnummer: ab20271) wurde kein Sekundärantikörper verwendet. Nach Entfernung des Sekundärantikörpers wurde die inkubierte PVDF-Membran erneut dreimal jeweils für 10 Minuten mit TBS-Tween 20 gewaschen. Die durch den Sekundärantikörper gebundenen Proteine wurden mit dem Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 32132X3) oder dem ECL™ Western Blotting Detection Reagents Kit (GE Healthcare UK, Produktnummer: RPN2209)

nachgewiesen, wobei das Herstellerprotokoll befolgt wurde. Die Entwicklung erfolgte mit dem ChemiDoc Imaging System.

Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Primärantikörper*

Antikörper gegen	Klonalität	Wirtspezies	RRID
HK2	Monoklonal	Maus	AB_2892669
HRP β -Actin	Monoklonal	Maus	AB_445482
Caspase 3/cCaspae 3	Polyklonal	Kaninchen	AB_2160739
PARP1/cPARP1	Polyklonal	Kaninchen	AB_331439

**Informationen über Hersteller und Produktnummer (Tabelle 7.1)*

Tabelle 2.9 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper gegen	RRID
Maus IgG	AB_772210
Kaninchen	AB_772206

2.7 In silico Methoden

2.7.1 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die Vollständigkeit der hergestellten Plasmide (2.2.3) zu überprüfen. Die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Produktnummer: 69504) gemäß den Herstellervorgaben isoliert. Anschließend erfolgte die Amplifikation mit dem 96-well-Thermocycler und dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 4337449). Für die Amplifikation wurden die Proben zunächst für eine Minute bei 95 °C erhitzt und anschließend durchliefen sie 29 Zyklen (95 °C für 10 Sekunden, 50 °C für 5 Sekunden und 60 °C für 4 Minuten). Während dieses Prozesses wurden fluoreszierende Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTP) in die PCR-Produkte eingebaut. Eine detaillierte Liste aller verwendeten Materialien ist in Tabelle 2.10 aufgeführt. Die amplifizierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Sanger-Sequenzierung erfolgte gemäß der etablierten Methode [171]. Der 3730xl DNA Analyzer wurde verwendet, um die Fluoreszenz der eingebauten ddNTP zu messen. Zur Analyse der Rohdaten kam die finchTV Software (Version 1.4.0) zum Einsatz, um die Daten von der Binärschnittstelle in das FASTA-Format zu konvertieren. Das Ergebnis wurde anschließend mit der beabsichtigten Oligonukleotid-Sequenz verglichen.

Tabelle 2.10 Reagenzien zur Amplifikation der Plasmid-DNA (pro Well)

Reagenzien	Volumen
DNA (300 ng)	x μ l (Abhängig von Ausgangskonzentration)
5x Sequencing buffer (SB)	1 μ l
Primer (5 μ M)	1 μ l
Big Dye	1.5 μ l
Aqua bidest.	y μ l (Auf insgesamt 10 μ l auffüllen)
Summe:	10 μ l

2.7.2 Quantifizierung von kurzkettigen Fettsäuren

Die Umsetzung dieser Methoden und die Erhebung der Rohdaten wurden von Prof. Philippe Schmitt-Kopplin und seinem Team (Forschungseinheit Analytische BioGeoChemie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Die Interpretation der Daten erfolgte im Rahmen der Dissertation und wird im folgenden Text näher erläutert. Die Bakterien aus der oralen mikrobiellen Gemeinschaft (OMM) wurden gemäß Abschnitt 2.9.1 kultiviert. Zur Homogenisierung wurde 1 ml des bakteriellen Überstandes mit NucleoSpin Bead Tubes Typ A (Macherey-Nagel, Produktnummer: 740786.50) und dem Precellys Evolution Homogenizer behandelt. Der Überstand wurde anschließend für 10 Minuten bei 4 °C mit 21.000 x g zentrifugiert. Zur Erstellung eines Vergleichs wurde eine -Standardreihe für Butyrat, Acetat und Propionat erstellt. Hierzu wurden Butansäure (Sigma-Aldrich, Produktnummer: B103500), Ethansäure (Sigma-Aldrich, Produktnummer: A6283) und Propansäure (Sigma-Aldrich, Produktnummer: P1386) in Methanol gelöst, um eine Konzentration von 100 ppm zu erreichen. Die Derivatisierung der kurzkettigen Fettsäuren erfolgte unter Verwendung von 3-Nitrophenylhydrazin (Sigma-Aldrich, Produktnummer N21804) wie zuvor beschrieben [172]. Die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren in den Proben wurden mittels Ultra-High Performance Liquid Chromatography in Kombination mit dem amaZon ETD IonTrap Massenspektrometer gemessen. Die Proben wurden unter Verwendung einer C8-Säule und einem Lösungsmittelsystem mit 5mM Ammoniumacetat (Sigma-Aldrich, Produktnummer: 9691) in Kombination mit 0,1 % pH 4,2 Essigsäure (Biosolve, Produktnummer: 23234101) in Wasser oder Acetonitril (Sigma-Aldrich, Produktnummer: 1000291000) aufgetrennt. Die Massenspektrometrie-Analyse erfolgte im negativen Elektrospray-Ionisationsmodus. Die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren in den bakteriellen Überständen

wurden unter Verwendung der QuantAnalysis-Software (Bruker Daltonics GmbH, www.bruker.com) berechnet.

2.7.3 Metabolisches Modell der Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch OMM-Bakterien

Die Ausführung dieser Methoden und die resultierenden Rohdaten wurden von Prof. Christoph Kaleta und Dr. rer. nat. Johannes Zimmermann (Institut für Experimentelle Medizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) durchgeführt. Die Interpretation der Daten im Kontext erfolgte im Rahmen der Dissertation und die entsprechenden Details werden im folgenden Text erläutert. Die metabolischen Netzwerke wurden mithilfe von Gapseq (<https://github.com/jotech/gapseq>) rekonstruiert [173]. Diese Rekonstruktionen basierten auf den Genomen der einzelnen Bakterien aus der oralen mikrobiellen Gemeinschaft, die vom NCBI Bioproject PRJNA289613 heruntergeladen wurden, sowie auf dem AMM [174]. Die Bildung der fermentierten Produkte wurde durch erweiterte Flux Balance Analyse bestimmt [175]. Zur Berücksichtigung der Variabilität der Vorhersagen wurde die ACHR-Funktion aus dem R-Paket (SybilcycleFeeFlux, $W = 5000$, $nPoints = 10000$) [176] verwendet, um die Verteilung der fermentierten Produkte für jedes Bakterium zu erhalten. Alle vorhergesagten Fermentationsprodukte wurden dann als erklärende Variablen verwendet, um die *HK2*-Expression mittels linearer Regression abzuschätzen.

2.8 Histologie und Immunfärbungen

2.8.1 Verarbeitung und Fixation von Gewebe

Die Gewebeproben wurden über Nacht bei 4 °C in einer 10 % (v/v) Formalin-Lösung (Sigma-Aldrich, Produktnummer: HT501128-4L) fixiert. Anschließend erfolgte die Dehydratisierung des Gewebes durch eine Serie von Ethanol-Lösungen mit steigenden Konzentrationen, wobei die letzte Konzentration von Ethanol (Merck, Produktnummer: E7148) 100 % betrug. Das Gewebe wurde mit ROTI®Histol (Roth, Produktnummer: 6640.1) entwacht und anschließend in Paraffin (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 416770020) eingebettet. Mithilfe des RM2255 Mikrotoms wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm für die weitere Bearbeitung angefertigt.

2.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Schnitte wurden entparaffiniert und in einer Serie von Ethanol-Lösungen mit absteigenden Konzentrationen rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 3

Minuten in Mayer's Hämalanlösung (Merck, Produktnummer: 109249) getaucht, für 5 Minuten unter fließendem Wasser gespült, für weitere 3 Minuten mit Eosin Y-Lösung (Merck, Produktnummer: HT1102128-4L) behandelt und erneut unter fließendem Wasser gespült. Hämatoxylin reagiert mit negativ geladenen, basophilen Zellkompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum und Nukleinsäuren, die in blauer Farbe erscheinen. Eosin, selbst negativ geladen, reagiert hingegen mit positiv geladenen Zellkompartimenten wie den Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine, die in rosa Farbe erscheinen. Darauf folgte die Dehydratisierung des Gewebes durch eine Serie von Ethanol-Lösungen mit steigenden Konzentrationen, wobei die letzte Konzentration von Ethanol 100 % betrug. Die gefärbten Schnitte wurden dann in Roti®-HistoKit (Roth, Produktnummer: 6638.1) eingelegt. Die Analyse und Fotodokumentation erfolgten mithilfe des Axioimager Z1 Mikroskops und der Zen Pro (Blue edition) Software (<https://www.zeiss.com>).

2.8.3 Histologischer Inflammations-Score

Der durch DSS-induzierte entzündliche Schaden am intestinalen Epithel wurde anhand eines histologischen Scores analysiert, der von *Adolph et al.* [89] adaptiert wurde. Dieser Score basiert auf dem ursprünglichen histologischen Inflammations-Score von *Siegmund et al.* [177]. Für die Analyse wurden Swiss-Rolls des murinen Colons mit HE gefärbt. Es erfolgte eine Untersuchung auf mononukleäre Zellinfiltrate, Hyperplasie der Krypten, epitheliale Zellschäden und Erosionen, Infiltrationen polymorphkerniger Zellen sowie transmurale Entzündungen. Jede dieser Kategorien erhielt willkürliche Einheiten von 0 (keine Ausprägung) bis 3 (schwere Ausprägung). Die einzelnen Werte der Kategorien wurden summiert und mit einem Faktor multipliziert. Der Multiplikationsfaktor entspricht dem Prozentbereich der betroffenen Mucosa (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11 Histologischer Inflammations-Score

Hyperplasie der Krypten	Epitheliale Zellschäden/Erosionen	Infiltrate mononukleärer Zellen	Infiltrate polymorphnukleärer Zellen	Transmurale Entzündung	% Befall
0 Nicht vorhanden	0 Nicht vorhanden	0 Gelegentlich in der Lamina Propria	0 Gelegentlich in der Lamina Propria	0 Nicht vorhanden	1 <10 %
1 Mild	1 Lymphoepitheliale Läsionen	1 Vermehrt in Lamina Propria	1 Vermehrt in Lamina Propria	1 Beschränkt auf Submucosa	2 10-25 %
2 Moderat	2 Erosionen und fokale Ulzerationen	2 Konfluierend bis Submucosa	2 Konfluierend bis Submucosa	2 Fokaler Befall bis hin zur Muscularis/Serosa	3 25-50 %
3 Schwer	3 Schwerer Schaden/ bis in die Tiefe	3 Transmurale Infiltrate	3 Transmurale Infiltrate	3 Schwere Ausdehnung in Muscularis/Serosa	4 >50 %

2.8.4 Immunhistochemie

Um spezifische Proteine und deren Lokalisation im Gewebe nachzuweisen, wurden immunologische Färbungen unter Verwendung des Vectastain ABC Kits (Vector Laboratories, Produktnummer: PK-4000) genutzt. Die Schnitte wurden entparaffiniert und durch eine Serie von Ethanollösungen in absteigender Konzentration rehydriert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation in Citrat-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 005000), um die Antigene zu reaktivieren. Nachfolgend wurden die Schnitte mit 5 % (v/v) Ziegenerum (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 50197Z) in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Zur Deaktivierung der natürlicherweise vorkommenden Peroxidasen wurde 3 % Wasserstoffperoxid (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: 202465000) appliziert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht, wobei die Verdünnung der Antikörper gemäß der in 2.6.4 zur Western Blot Analyse beschriebenen Methode erfolgte. Für die Färbung von Ki67 wurde ein Antikörper gegen Ki67 (BD Biosciences, Produktnummer: 556003), der auf 1:500 verdünnt wurde, verwendet. Bei der Färbung von HK2 wurde der bereits verwendete Antikörper gegen HK2 (verdünnt auf 1:1000) benutzt. Als Sekundärantikörper diente der bereits verwendete Antikörper gegen murines IgG. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte über 45 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) aus dem Vectastain ABC Kit inkubiert. Die DAB-Lösung wurde durch HRP oxidiert, was zu einer braunen Präzipitation führte. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Axioimager Z1 Mikroskop und der Zen Pro (Blue edition) Software. Zur Beurteilung und Quantifizierung der HK2-Färbungsintensität wurde Image J (Version 1.8.0_172; <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) benutzt. Die HK2-

positiven Bereiche wurden automatisch markiert und selektiert. Die Intensität der Färbung wurde gemessen, indem das arithmetische Mittel der Grauwerte der Pixeloberfläche ermittelt wurde. Pro Schnitt wurde der Mittelwert aus 20 separaten Colonabschnitten bestimmt. Das arithmetische Mittel der Grauwerte wurde vom weißen Hintergrund subtrahiert (255 - Mittelwert des Grauwertes der Probe).

Tabelle 2.12 Liste der verwendeten Primärantikörper in der Histologie

Antikörper gegen	Klonalität	Wirtspezies	RRID
Ki67	Monoklonal	Maus	AB_396287
HK2	Monoklonal	Maus	AB_2892669

2.8.5 TUNEL-Färbung

Die Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)-Färbung wurde unter Verwendung des ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kits (Sigma-Aldrich, Produktnummer: S710) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, stammen die im Folgenden genannten Substanzen aus diesem Kit. Während des Apoptoseprozesses kommt es zum Bruch von doppel- und einsträngiger DNA. Diese Brüche wurden *in situ* nachgewiesen, indem freie 3'-OH-Termini mit modifizierten Digoxigenin-Nukleotiden markiert wurden. Dieser Prozess wurde durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase katalysiert. Ein Antikörper gegen Digoxigenin, der mit einem HRP-Reporter gekoppelt war, wurde verwendet, um ein braunes Präzipitat zu erzeugen. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mithilfe des Axioimager Z1 Mikroskops und der Zen Pro (Blue edition) Software. Für jeden Gewebeschnitt wurden die TUNEL-positiven Zellen in 30 Krypten gezählt, sofern möglich. Wegen der teilweise ausgedehnten Befunde und der starken Destruktion durch die Inflammation war dies nicht immer möglich. Aufgrund der HK2-spezifischen Lokalisation mit Beschränkung auf den apikalen Bereich des Colons wurden die TUNEL-positiven Zellen in diesem Bereich gezählt.

2.9 Bakterienkultur

2.9.1 Bestandteile und *in vitro* Kultur von Bakterien

Die Durchführung dieser Methoden, sowie die daraus resultierenden Rohdaten erfolgte extern, weiterführende Experimente, Analysen und die Interpretation der Daten im Kontext erfolgte im Rahmen der Dissertation. Für den Kontext werden sie im

folgenden Text aufgeführt. Die durchführenden Personen sind entsprechend hervorgehoben. *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 [178] und *E. Coli* W3110 [179] wurden durch Dr. Jeffrey Gordon (Edison Family Center for Genome Sciences and Systems Biology, Washington University School of Medicine) bereitgestellt. *B. longum* NC 2705 wurde durch Dr. Stephane Duboux (Nestlé Research Center, Lausanne) zur Verfügung gestellt. Die Kultur dieser Bakterien zur Monokolonialisierung von keimfreien Mäusen erfolgte durch Valentina Tremaroli. In Kürze zusammengefasst: Flüssiges Nährmedium (TYG, LB und MRS-Brühe supplementiert mit 0,05 % (w/v) Cystein) wurde mit Einzelkolonien von *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, *E. coli* W3110 und *B. longum* NC 2705 aus Agarplatten beimpft und über Nacht unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C bis zur stationären Phase bebrütet. Altered Schaedler Flora (ASF) besteht aus 8 verschiedenen Bakterien. ASF beinhaltet *Clostridium* sp. ASF356 und ASF502, *Lactobacillus murinus* ASF361 und spec. ASF360, *Mucispirillum schaedleri* ASF457, *Eubacterium plexicaudatum* ASF492, *Parabacteroides* spec. ASF519 und ein unbekanntes Firmicutes Bakterium ASF500 [180]. Für die später folgenden Versuche (2.10.8) wurden initial ASF-kolonisierte Mäuse erworben (Taconic, Produktnummer: ASF-DONOR). Oligo mouse microbiota (OMM) setzen sich aus 12 verschiedenen Bakterien zusammen. OMM beinhaltet *Bacterioides ceacimuris* I48, *Muribaculum intestinale* YL27, *Akkermansia municipihila* YL44, *Turicimonas muris* YL45, *Limosilactobacillus reuteri* I49, *Enterococcus faecalis* KB1, *Blautia coccoides* YL58, *Clostridium innocuum* I46, *Flavonifractor plautii* YL31, *Enterocloster clostridioforme* YL32, *Acutalibacter muris* KB18 und *Bifidobacterium animalis* YL2 [174]. Das OMM wurde durch Prof. Bärbel Stecher (Max von Pettenkoffer Institut der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München) bereitgestellt. Die Einzelkultur dieser Bakterien erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz-Streit (Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Kurz zusammengefasst wurden die einzelnen Bakterien aus dem OMM unter anaeroben Bedingungen im anaeroben *Akkermansia* Medium kultiviert, wie bereits zuvor beschrieben [174]. Jeder einzelne OMM-Bakterienstamm wurde in Reinkultur gewonnen, zentrifugiert und der gewonnene Überstand, der die Metabolite des jeweiligen Bakteriums enthielt, wurde steril filtriert (0,2 µm Filter) und für Stimulationsexperimente genutzt

2.10 Tierversuche

2.10.1 Etablierung der $Hk2^{\Delta IEC}$ -Mauslinie

Um die $Hk2^{\Delta IEC}$ -Mauslinie zu generieren, wurden kommerziell erhältliche Mäuse verwendet, die floxierte $Hk2$ -Allele trugen (EMMA, Produktnummer: 02074) [145]. Diese Mäuse wurden mit Mäusen gekreuzt, die die CRE-Rekombinase unter der Kontrolle des Villin-Promoters exprimierten (Stamm: B6.Cg-Tg (Vil1-cre)1000Gum/J, Stamm #0:21504). Dies wurden kommerziell vom Jackson Laboratory erworben (Produktnummer: 000664). Als Kontrollmäuse dienten Wurfgeschwister $Hk2^{fl/fl}$ Mäuse, im Folgenden als WT-Mäuse bezeichnet.

2.10.2 Tierhaltung und Tierwohl

Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Ministeriums für Energiewende, Klimaschutz, Umwelt und Natur des Landes Schleswig-Holstein (MEKUN-SH) genehmigt und entsprachen den nationalen sowie internationalen Gesetzen und Richtlinien (V 312-72241.121-33 (95-8/11) und V242-62324/2016 (97-8/16)). Es erfolgte ausschließlich die Verwendung männlicher Tiere, um Geschlechtsspezifische Einflüsse zu eliminieren. Die spezifisch pathogenfreien C57BL/6j-Mäuse sowie die zuvor erwähnten $Hk2^{\Delta IEC}$ - und WT-Tiere wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH, Kiel) untergebracht, jeweils in individuell ventilierten Käfigen mit maximal 5 Tieren pro Käfig. Die Haltungsbedingungen umfassten einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, eine relative Luftfeuchtigkeit von 45 % -65 %, und eine konstante Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Wasser und das mit Gammastrahlen bestrahlte Kontrollfutter (Ssniff special diets GmbH, Produktnummer: V1534) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, und nach dem Feststellen sicherer Todeszeichen wurden Gewebeproben für weitere Analysen entnommen.

2.10.3 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR unter Verwendung von Primern für $Hk2$ und $VillinCre$ von Microsynth (Tabelle 2.13). Die DNA wurde aus Schwanz-Biopsien der Mäuse extrahiert, wobei die Probe für eine Stunde bei 94°C mit $100\ \mu\text{l}$ 50 mM Natriumhydroxid (Merck, Produktnummer: 655104) inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation mit $1.000 \times g$ für eine Minute wurde der Überstand, welcher die DNA enthielt, für zwei unabhängige PCR-Läufe pro Versuchstier verwendet. Die PCR wurde

mithilfe der GoTaq® Master Mixes (Promega, Produktnummer: M7122) und des GeneAmp PCR System 9600 durchgeführt. Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte wurde durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (2.10.4). Alle verwendeten Reagenzien und Mengen sind in

Tabelle 2.14 aufgeführt. Die Proben wurden zu Beginn für vier Minuten bei 95 °C erhitzt, und anschließend wurde der Zyklus 38 Mal durchlaufen (95 °C 30 Sekunden, 59 °C 30 Sekunden und 72 °C 1 Minute). Nach der PCR wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.13 Primer der Genotypisierung

Gen	Spezies	Primer (Vorwärts, Rückwärts)
<i>Hk2</i>	Maus	TGTCTTGGCTCAGATGTGAC, CCCCTTCGCTTGCCATTAC
Interne Kontrolle	Maus	GTCATGCTGGAGAGAATGAGCAAGC, TCATGGAAATCCTACAGCAGGGACC
<i>VillinCre</i>	Maus	GTGTGGGACAGAGAACAAACC, ACATCTTCAGGTTCTGCGGG

Tabelle 2.14 Reagenzien der Genotypisierungs-PCR

LoxP-Site PCR (<i>Hk2</i>)	Volumen	Cre-PCR	Volumen
5x Green GoTaq® Reaction Puffer	5 µl	5x Green GoTaq® Reaction Puffer	4 µl
dNTPs (1mM)	0,5 µl	dNTPs (10mM)	0,5 µl
Vorwärts & Reverser Primer (0,8 µM)	4 µl	Vorwärts & Reverser Primer (10 µM)	0,5 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
DNA (verdünnt auf 1:10)	1 µl	DNA (verdünnt auf 1:10)	3 µl
Aqua bidest	14 µl	Aqua bidest	11,5 µl

2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf ein 1 % (w/v) Agarose-Gel (Biozym, Produktnummer: 840001) in 100 ml 0,5 TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (Sigma-Aldrich, Produktnummer: T6025-1L) mit 10 x SYBR® Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: S33102) geladen. Zur Gelelektrophorese wurde das Bio-Rad Power Pac 300 power supply System verwendet, welches auf eine Spannung von 100 V für 30-60 Minuten eingestellt wurde. Die Visualisierung erfolgte anschließend mittels des ChemiDoc Imaging Systems. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Vergleich mit der SmartLadder MW-1700-10 (Eurogentec, Produktnummer: MW-1700-10) herangezogen.

2.10.5 Basale Phänotypisierung und Organentnahmen

Das Alter der Versuchstiere für die basale Phänotypisierung lag zwischen 9 und 11 Wochen. Nach der Tötung zur Organentnahme durch zervikale Dislokation erfolgte zunächst die Blutentnahme aus der Vena cava inferior. Das entnommene Blut wurde in Lithium-Heparin-Mikrogefäße (Sarstedt, Produktnummer: 41.1503.005) pipettiert und direkt bei 10.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen, in Eppendorf-Gefäße überführt und bis zu weiterer Verwendung bei – 80 °C gelagert. Als nächstes erfolgte die Entnahme von Leber, Milz und epididymalem weißem, Fettgewebe (EWAT). Die Organe wurden makroskopisch begutachtet, gewogen und zur späteren histologischen, proteinbiochemischen und molekularbiologischen Analyse asserviert. Proben für die Histologie wurden in 10 % (v/v) Formalin asserviert. Proben zur späteren Protein- und RNA-Analyse wurden direkt in Flüssigstickstoff eingefroren. Der Darm wurde als komplettes Paket entnommen, und die Länge von Dünndarm und Dickdarm gemessen. Das Zökum wurde abgesetzt und gewogen. Jeweils eine Stuhlprobe aus Dünndarm, Zökum und Dickdarm wurde entnommen. Proben zur Protein- und RNA-Analyse wurden von distalem Colon, proximalem Colon, Zökum, Ileum und Jejunum entnommen. Der restliche Dünndarm und Dickdarm wurde mit eiskaltem PBS gespült, um überschüssige Stuhlreste zu entfernen und die Mucosa nicht zu schädigen. Dann wurde der Darm vorsichtig aufgeschnitten und aufgerollt (Swiss Roll). Diese Technik wurde von *Moolenbeek et al.*[181] beschrieben und ermöglicht eine histologische Beurteilung des gesamten entnommenen Darmabschnittes. Zuletzt wurde zur Qualitätskontrolle eine Probe der Schwanzspitze zur erneuten Genotypisierung entnommen.

2.10.6 DSS-induzierte Colitis

Das DSS-Modell zur Induktion einer murinen Colitis ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung von CED. Hierbei wird eine akute chemische Colitis durch DSS (Sigma-Aldrich, Produktnummer: D8906) induziert, die zu intestinaler Entzündung und Diskontinuität der epithelialen Barriere führt [182]. Für dieses Modell wurden männliche *Hk2^{ΔIEC}*- und WT-Mäuse im Alter von 10 bis 14 Wochen verwendet. Diese wurden über den gesamten Verlauf des Experiments in den ursprünglich zugeteilten gemeinsamen Behausungen untergebracht. Zur Induktion der Colitis wurde das Trinkwasser der Mäuse für 7 Tage mit 1,5 % (w/v) DSS in autoklaviertem Leitungswasser gelöst, ausgetauscht. Dabei bestand eine Verfügbarkeit *ad libitum*.

Nach der Induktion erhielten die Versuchstiere Trinkwasser für 3 weitere Tage, bevor die Tiere für die Organentnahme getötet wurden. Während des Experiments wurden die Mäuse täglich gewogen, und der *Disease activity index* (DAI) wurde kontinuierlich erhoben. Der DAI setzt sich aus dem prozentualen Gewichtsverlust, der Stuhlkonsistenz und dem Auftreten von fäkalem Blut zusammen. Er wurde gemäß der Beschreibung von *Aden et al.* angewandt [96] und ist im Detail in (Tabelle 2.15) aufgeführt. Zur Detektion vom fäkalem Blut wurde der Hämocult-Test (Beckman Coulter, Produktnummer: Nicht länger kommerziell verfügbar) verwendet. Am Tag der Tötung zur Organentnahme wurden die Proben, wie in 2.10.5 beschrieben, entnommen. Während des gesamten Versuchszeitraums erfolgte die tägliche Bestimmung der vom MEKUN-SH vorgegebenen Abbruchkriterien.

Tabelle 2.15 *Disease activity index*

Punktzahl	Prozentualer Gewichtsverlust	Stuhlkonsistenz	Rektale Blutung
0	0-5 %	Geformt	Negativer Haemocult
1	5-10 %	Geformt aber weich	Leicht positiver Haemocult
2	10-15 %	Ungeformt	Stark positiver Haemocult
3	15-20 %	-	Sichtbares Blut am Stuhl
4	>20 %	Diarrhoe	Rektale Blutung

2.10.7 Interventionen mit kurzkettigen Fettsäuren

Um die Modulation von *Hk2* durch kurzkettige Fettsäuren zu untersuchen, wurden Interventionsversuche durchgeführt. Im initialen Versuchsaufbau erhielten C57BL/6 Mäuse entweder eine Intervention mit einzelnen kurzkettigen Fettsäuren oder eine konventionelle Diät *ad libitum* für 10 Tage. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um einen ausreichenden Einfluss der kurzkettigen Fettsäuren auf die Genexpression zu gewährleisten. Die Supplementation mit Butyrat erfolgte mit einer Kontrolldiät, die mit 10 % (w/w) Tributansäureglycerolester (Tributyryn) (Sigma-Aldrich, Produktnummer: W222305) supplementiert wurde. Tributyryn ist ein Polymer von Butyrat, das sich im distalen Gastrointestinaltrakt in Butyrat spaltet und eine vorzeitige Absorption verhindert, wie es bei direkter oraler Substitution von Butyrat der Fall wäre [183, 184]. Die mit Supplementation mit Acetat bestand aus der Kontrolldiät. Jedoch wurde das Trinkwasser durch autoklaviertes Leitungswasser ersetzt, das mit 150 mM Natriumacetat (Sigma-Aldrich, Produktnummer: S2889) supplementiert wurde. Dies entsprach der gängigen Konzentration, die bereits in früheren Studien erfolgreich angewendet wurde [185, 186]. Nach Abschluss der Intervention wurden die Tiere zur

Organentnahme getötet, und die Proben wurden gemäß der bereits beschriebenen Methode aufgearbeitet (2.10.5). In einem weiteren Versuch wurde die Intervention im Zusammenhang mit Inflammation untersucht. Hierfür wurde eine DSS-Colitis bei *Hk2^{ΔIEC}*- und WT-Mäusen induziert (2.10.6). Bereits 10 Tage vorab wurde, wie zuvor beschrieben, die Intervention mit Butyrat und Acetat gestartet. Die Kontinuität der Intervention mit Butyrat- und Acetat wurde während der DSS-Gabe aufrechterhalten und dauerte bis zur Tötung zur Organentnahme an. Während der DSS-Gabe wurde dem DSS-haltigen Trinkwasser zusätzlich Acetat beigefügt [186]. Nach Abschluss der Intervention mit DSS-Colitis wurden die Tiere zur Organentnahme getötet. Die Proben wurden gemäß der bereits beschriebenen Methode aufgearbeitet (2.10.5) und anschließend gemäß der Fragestellung nach den beschriebenen Methoden analysiert.

2.10.8 Gnotobiotische Tierversuche

Gnotobiotische Tiere werden unter aseptischen Bedingungen geboren und anschließend kontinuierlich axenisch gehalten oder mit einem definierten Mikrobiom beimpft. Dies ermöglicht die gezielte Untersuchung des Einflusses bestimmter, definierter Bestandteile des Mikrobioms im Zusammenwirken mit dem Wirt. Die Durchführung dieser Methoden sowie die daraus resultierenden Rohdaten erfolgten extern. Weiterführende Experimente, Analysen und die Interpretation der Daten im Kontext wurden im Rahmen der Dissertation durchgeführt. Die für den Kontext relevanten Details sind im folgenden Text aufgeführt, wobei die durchführenden Personen entsprechend hervorgehoben sind. Alle gnotobiotischen Experimente wurden in den Tierhaltungen der Experimental Biomedicine of Gothenburg (EBM) oder der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) durchgeführt. Die für diese Studie verwendeten gnotobiotischen Experimente aus dem EBM wurden von Prof. Fredrik Bäckhed und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Die gnotobiotischen Experimente aus der MHH wurden von Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Marijana Basic durchgeführt und bereitgestellt. Alle Tierversuche wurden von den zuständigen Ethikkomitees, dem Gothenburg Animal Ethics Committee und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, genehmigt. Die Tierhaltung erfolgte unter etablierten Bedingungen, die bereits ausführlich beschrieben wurden [187, 188]. Als Haltungsbedingungen wurden ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, eine relative Luftfeuchtigkeit von 45 % bis 65 % und eine durchgängige Raumtemperatur von 22 °C ± 2 °C gewählt. Wasser und autoklaviertes Kontrollfutter (Labdiet, Produktnummer: 5001) standen *ad libitum* zur

Verfügung. Zur Generierung von Mäusen mit einem definierten Mikrobiom wurden 12 Wochen alte keimfreie Mäuse mit 200 µl Übernachtskulturen (stationäre Phase) von *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, *Escherichia Coli* W3110 oder *Bifidobacterium longum* NC 2705 beimpft. Die Beimpfung erfolgte mittels Schlundsonde, und die Mäuse wurden 14 Tage nach Kolonisation für die Organentnahme getötet. ASF- und OMM-assoziierte Mäuse wurden durch gemeinsame Haltung entwöhnter keimfreier Mäuse mit gnotobiotischen Spendertieren (entweder mit ASF oder OMM besiedelt) für 4 Wochen generiert. Diese Tiere wurden im Alter von 12 Wochen für die Organentnahme getötet.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mithilfe der GraphPad Prism Software (Version 9.2) von GraphPad Inc (<https://www.graphpad.com>), MacQIIME v1.9.2 (<http://qiime.org/index-qiime1.html>) oder R Version 3.2.5 (<https://www.r-project.org>) durchgeführt. Für die Auswertung von Daten aus zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet, während Daten aus mehreren Gruppen mittels one-way ANOVA oder two-way ANOVA analysiert wurden. Die präsentierten Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanzniveaus wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ als (*) signifikant betrachtet, bei p-Werten von $<0,01$ (**) und $<0,001$ (***). Die spezifischen Analysen und Vergleiche sind in der Legende der korrespondierenden Abbildungen zu finden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Mikrobiota auf die *Hk2*-Expression: Nicht alle Bakterien sind gleich
Wie bereits in 1.4.5 beschrieben, zeigt sich eine reduzierte Expression von *Hk2* im apikalen Darmepithel von keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Mäusen. Durch die Besiedlung mit dem Mikrobiom konventionell gehaltener Mäuse in keimfreien Mäusen konnte ein Anstieg der apikalen *Hk2*-Expression beobachtet werden. Interessanterweise führte der Verlust von HK2 im intestinalen Epithel unter basalen Bedingungen nicht zu einer veränderten Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms [1]. Diese Erkenntnis legt nahe, dass die Expression von *Hk2* durch das intestinale Mikrobiom moduliert wird, HK2 aber nicht die Zusammensetzung des Mikrobioms moduliert. Es stellt sich die Frage, ob spezifische Bakterien für diesen Effekt verantwortlich sind oder ob eine universelle Modulation durch das Mikrobiom stattfindet. Zu diesem Zweck kolonisierten die Arbeitsgruppen von Prof. Fredrik Bäckhed und Dr. rer. nat. Marijana Basic keimfreie C57BL6/J Mäuse mit einzelnen Bakterienspezies oder den minimalen Mikrobiomen ASF [189] und OMM [174]. Eine qPCR-Analyse der Epithelzellen des Colons am Institut für klinische Molekularbiologie aus diesen gnotobiotischen Tierversuchen ergab, dass sowohl die Kolonisation mit ASF als auch mit OMM die Expression von *Hk2* im intestinalen Epithel induzierte (Abbildung 3-1). Die Monokolonisation mit dem gramnegativen Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 führte ebenfalls zu einer Induktion der *Hk2*-Expression. Kennzeichnend für *Bacteroides thetaiotaomicron* ist die besonders hohe fermentierende Aktivität im Vergleich zu den anderen gezeigten Spezies [190]. Im Gegensatz dazu zeigte die Monokolonisation mit dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* W3110 oder dem grampositiven Bakterium *Bifidobacterium longum* NC 2705 keine signifikante Erhöhung der *Hk2*-Expression (Abbildung 3-1). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Regulation von *Hk2* unabhängig von der Zellwandbeschaffenheit und der Erkennung von Lipopolysacchariden oder Peptidoglykanen erfolgt. Der Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer spezifischen Interaktion zwischen den intestinalen Epithelzellen und bestimmten Eigenschaften der Bakterien. Aufgrund der Induktion durch *Bacteroides thetaiotaomicron* liegt die Vermutung nahe, dass mikrobielle Metabolite wie beispielsweise kurzkettige Fettsäuren ursächlich für die Regulation sind.

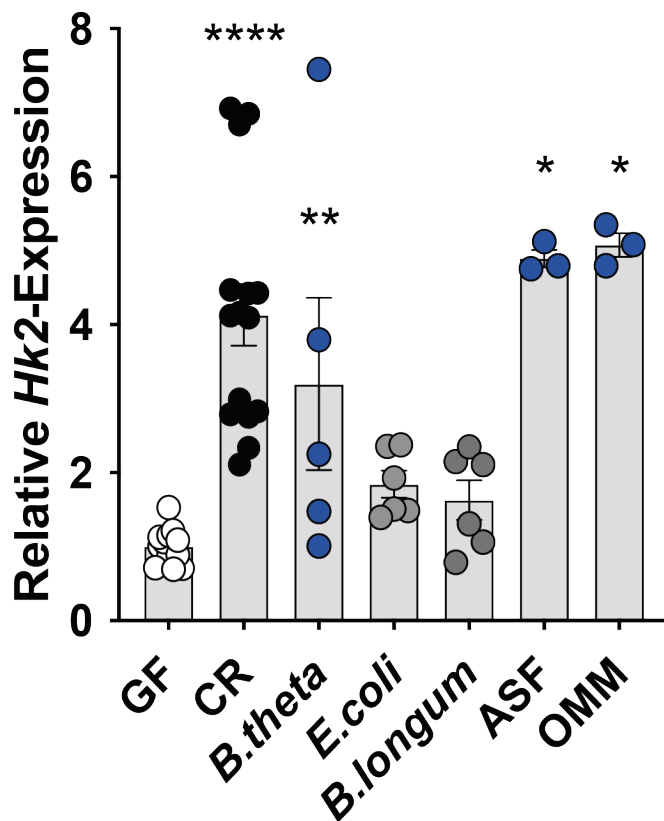


Abbildung 3-1 *Hk2*-Expression ist abhängig von der Zusammensetzung des Mikrobioms

Relative *Hk2*-Expression in keimfreien (GF), konventionell gehaltenen (CR) und monokolonisierten Mäusen mit einzelnen Bakterien (*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 - Gramnegativ, *Escherichia coli* W3110 - Gramnegativ, oder *Bifidobacterium longum* NC 2705 - Grampositiv) sowie den minimalen Mikrobiomen ASF und OMM. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM präsentiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA (im Vergleich zu GF Mäusen).

3.2 Die mikrobielle Modulation von *Hk2* ist speziesabhängig

Aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen wurde beschlossen, den Effekt der einzelnen OMM-Bakterien auf die *HK2*-Expression genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Caco-2-Zellen mit dem steriltriften Überstand der einzelnen OMM-Spezies stimuliert. Die *in-vitro*-Kultur der OMM-Bakterien wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz-Streit durchgeführt. Der Überstand von 8 Bakterien (*Acutalibacter muris* KB18, *Akkermansia municipihila* YL44, *Bacterioides ceacimuris* I48, *Bifidobacterium animalis* YL2, *Blautia coccoides* YL58, *Enterocloster clostridioforme* YL32, *Limosilactobacillus reuteri* I49 und *Muribaculum intestinale* YL27) führte zu keiner signifikanten Veränderung der *HK2*-Expression. Die beiden Letzteren sind bekannte Produzenten kurzkettiger Fettsäuren [191]. Die Anzucht von *Turicimonas muris* YL45 gelang nicht, und somit konnte der Effekt auf die *HK2*-

Expression nicht untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die *HK2*-Expression im Gastrointestinaltrakt von oral nach aboral ansteigt [1]. Gleichzeitig steigt auch die bakterielle Masse an, wobei die höchsten gemessenen Werte im Colon auftreten [192], wo auch die meisten Fermentationen stattfinden [124]. Da bereits beschrieben wurde, dass Fettsäuren wie Palmitinsäure die Aktivität von HK inhibieren können [193, 194], ergab sich aus den neuen Erkenntnissen aus diesem Experiment die Hypothese, dass kurzkettige Fettsäuren die Expression von *HK2* modulieren könnten.

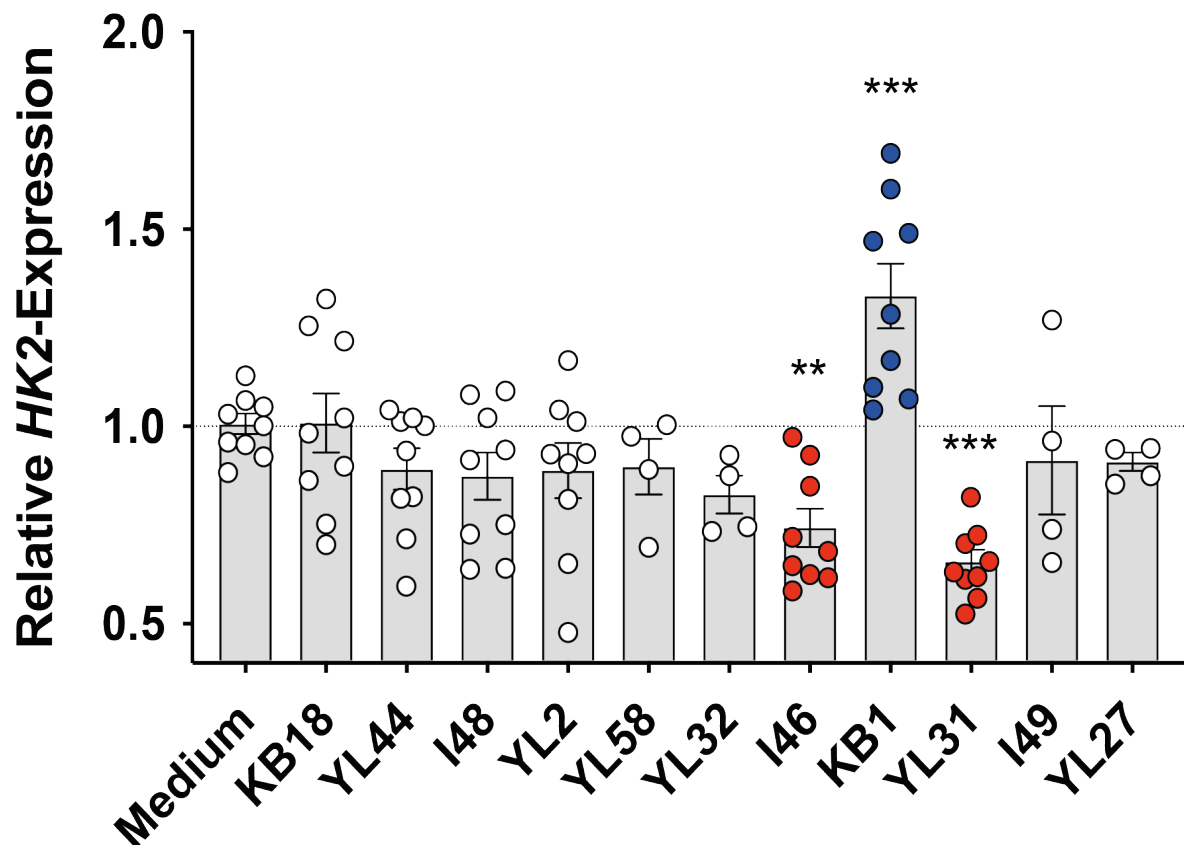


Abbildung 3-2 *Clostridium innocuum* I46 und *Flavonifractor plautii* YL31 reprimieren die *HK2*-Expression in Caco-2-Zellen

Relative *HK2*-Expression in Caco-2-Zellen, stimuliert mit sterilfiltriertem Kulturüberstand von OMM-Spezies (*in vitro* kultiviert). Die verwendeten Spezies waren: *Acutalibacter muris* KB18, *Akkermansia muciniphila* YL44, *Bacteroides caecimuris* I48, *Bifidobacterium animalis* YL2, *Blautia coccoides* YL58, *Enterocloster clostridioforme* YL32, *Clostridium innocuum* I46, *Enterococcus faecalis* KB1, *Flavonifractor plautii* YL31, *Limosilactobacillus reuteri* I49 und *Muribaculum intestinale* YL27. Als Kontrolle wurde die *HK2*-Expression nach Stimulation mit dem sterilen anaeroben *Akkermansia* Medium bestimmt. Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA (vs. Medium).

3.3 Metabolisches Modeling der Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch OMM

Zur Überprüfung der Hypothese, erstellten Prof. Christoph Kaleta und Dr. rer. nat. Johannes Zimmermann basierend auf den erhobenen Daten individuelle metabolische

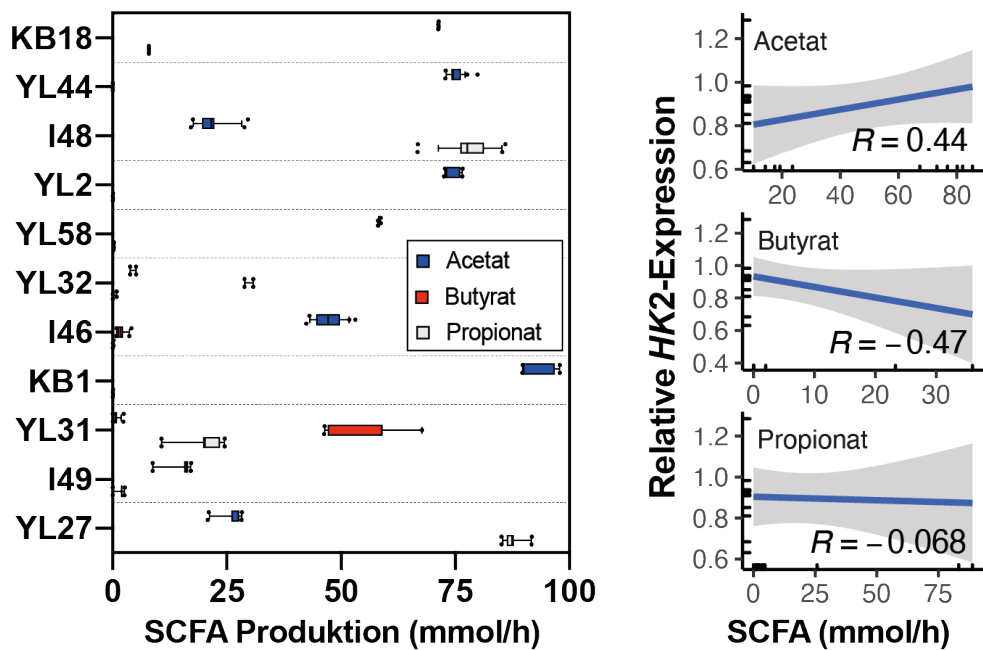
Modelle, die die potenzielle Synthese kurzkettiger Fettsäuren für die einzelnen OMM-Spezies vorhersagten (Abbildung 3-3). Ein lineares Modell der erwarteten *HK2*-Expression, basierend auf den gemessenen Werten von Butyrat und Acetat, korrelierte signifikant mit den per qPCR erhobenen *HK2*-Expressionen aus den OMM-Überständen (p-Wert = 0,008, Pearson R = 0,75, R^2 = 0,56, AIC = -8,0) (Abbildung 3-3) (Tabelle 3.1). Die vorhergesagten Level an kurzkettigen Fettsäuren der einzelnen Bakterien aus dem OMM wurden durch Targeted Metabolomics validiert (Abbildung 3-3), welche durch Prof. Philippe Schmitt-Kopplin und seine Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Daraus ließ sich die Hypothese formulieren, dass die Regulation von *HK2* mutmaßlich durch die Metabolite des Mikrobioms, insbesondere durch die Acetat und Butyrat, bedingt wird.

Tabelle 3.1 Statistik des linearen Models der *HK2*-Expression bedingt durch die Induktion der Metabolite, durch die einzelnen OMM Bakterien

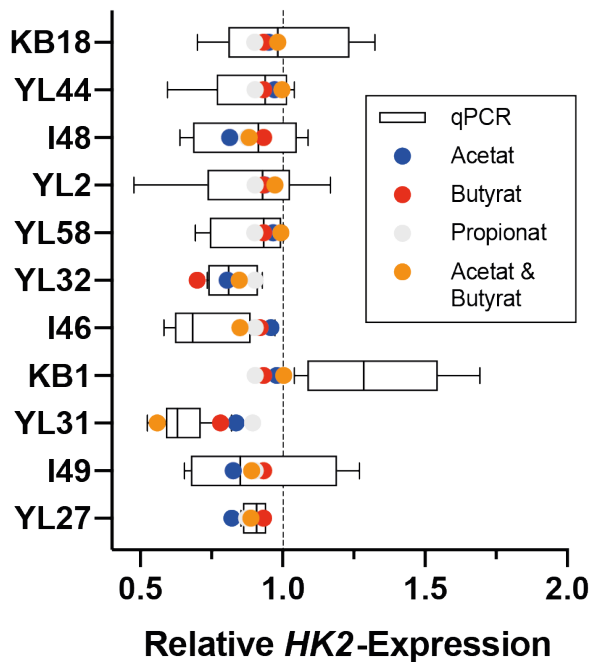
Formel	AIC	sigma	R2	R	p-Wert
Acetat	-5,1809804	0,16092295	0,19156729	0,43768401	0,17820082
Butyrat	-5,5801726	0,15802932	0,22037951	0,46944596	0,14517284
Propionat	-2,8925022	0,17856407	0,00460373	0,06785081	0,84287465
Acetat & Butyrat	-8,0040261	0,13381316	0,56522852	0,75181681	0,00762065

AIC steht für Akaike Information Criteria. Sigma ist die Standardabweichung der Residuen, R^2 ist der Koeffizient der Determination, bezogen auf den Anteil der Varianz in der abhängigen Variable, der von den unabhängigen Variablen vorhergesagt wurde. R steht für den Pearson-Korrelationskoeffizienten der vorhergesagten Metabolitproduktion mit den *HK2*-Expressionsdaten

A



B



C

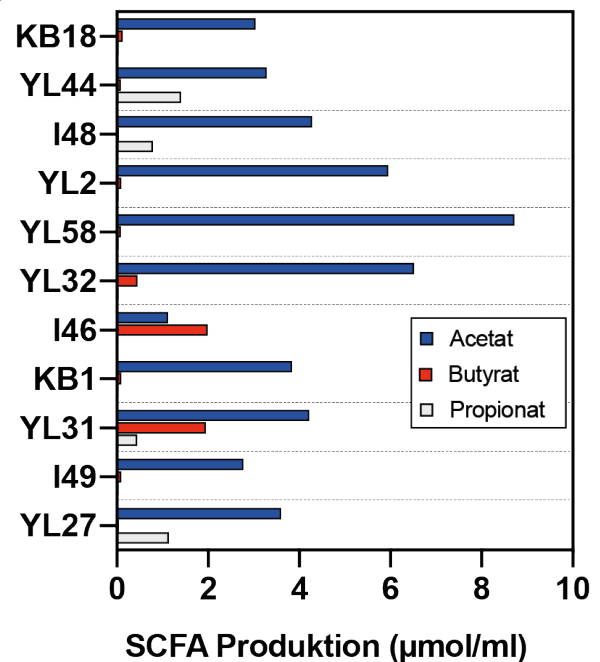


Abbildung 3-3 *HK2*-Expression korreliert mit der Acetat- und Butyratproduktion der einzelnen OMM-Bakterien

(A) Metabolisches Modell der Produktion von Acetat, Butyrat und Propionat durch die einzelnen OMM-Bakterien, basierend auf ihrer veröffentlichten Genominformation und den *in vitro*-Wachstumsbedingungen, sowie ihre Korrelation mit den Metaboliten zur *HK2*-Expression. R bezeichnet den Pearson-Korrelationskoeffizienten. (B) Vorhersage des linearen Modells, das die Level von Acetat, Butyrat und Propionat beinhaltet, um die beobachteten Veränderungen der *HK2*-Expression in Caco-2-Zellen durch die Stimulation mit den Überständen der bakteriellen Kulturen (Abbildung 3-2) zu erklären. (C) Quantifizierte Level an kurzkettigen Fettsäuren (*Short chain fatty acids* (SCFA)) in Überständen der bakteriellen Kulturen der einzelnen OMM-Bakterien, die in Abbildung 3-2 zur Stimulation genutzt wurden.

3.4 Kurzkettige Fettsäuren verändern die Expression von HK2 *in vitro* und *in vivo*

Um die Hypothese, dass kurzkettige Fettsäuren für die Modulation von *HK2* verantwortlich sind, *in vitro* zu überprüfen, wurden Caco-2-Zellen zunächst mit Butyrat (Sigma-Aldrich, Produktnummer B5887) und Acetat stimuliert. Wie erwartet führte Acetat zu einer Steigerung der *HK2*-Expression. Ebenso führte die Stimulation mit Butyrat zu einer Repression der *HK2*-Expression (Abbildung 3-4). Aufgrund des protektiven Effekts durch den selektiven Verlust von HK2 im intestinalen Epithel [1] lag der Fokus im Folgenden insbesondere auf Butyrat. Um einen zelltypspezifischen Effekt auszuschließen, wurden HT-29-Zellen mit Butyrat stimuliert. Auch in diesem Modell führte Butyrat zu einer Repression der *HK2*-Expression (Abbildung 3-4). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese *in vivo* getestet. WT-Mäuse erhielten für 10 Tage eine Supplementation mit Butyrat. Im Anschluss wurden die HK2-Level im Colon dieser Tiere immunhistochemisch quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der HK2-Level im apikalen Colongewebe (Abbildung 3-4). Somit wurde nachgewiesen, dass Butyrat die Expression von Hexokinase *in vitro* und *in vivo* moduliert.

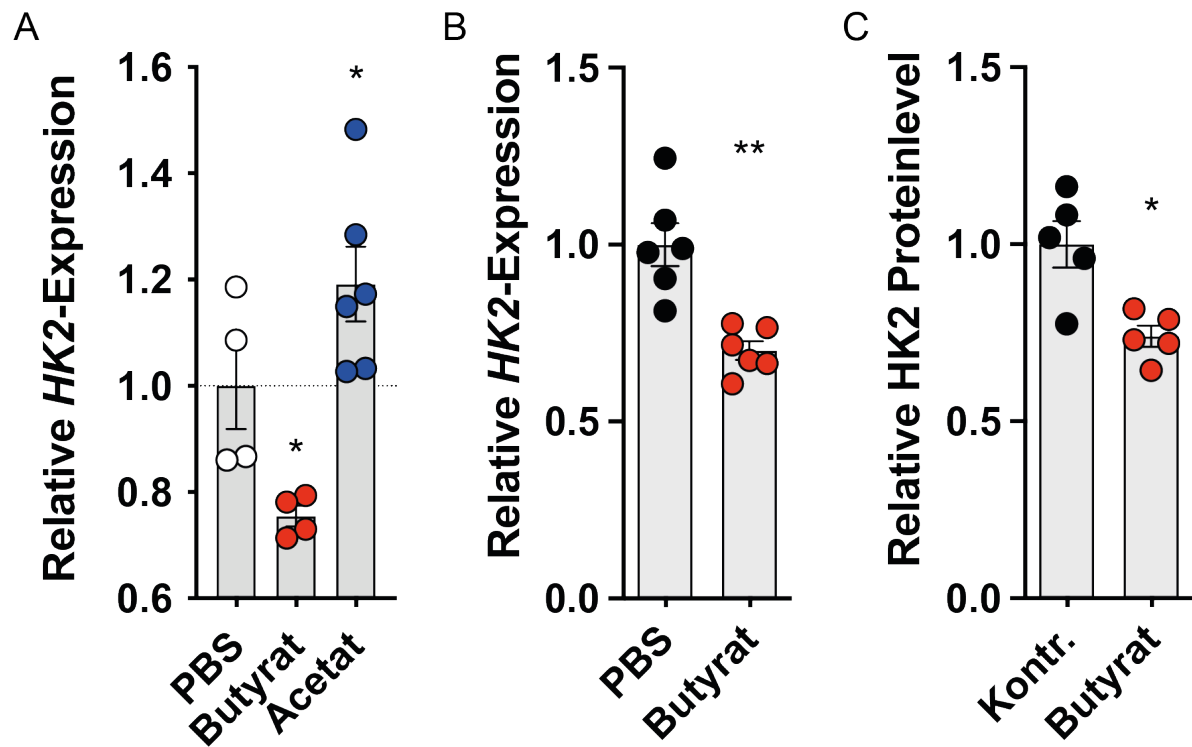


Abbildung 3-4 Kurzkettige Fettsäuren modulieren HK2 *in vitro* und *in vivo*

(A) Relative HK2-Expression in Caco-2-Zellen nach Stimulation mit Acetat (10 mM über 24 Stunden) und Butyrat (2 mM über 24 Stunden). Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA (vs. PBS). (B) Relative HK2-Expression in HT-29-Zellen nach Stimulation mit Butyrat (2 mM über 24 Stunden). Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test gewählt. (C) Fütterungsversuch von WT-Mäusen mit einer Supplementation mit Butyrat, die zu einer Reduzierung der HK2-Proteinexpression im Colonepithel führte. Die Messung der HK2-Expression erfolgte immunhistochemisch. Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test gewählt.

3.5 Butyrat induzierte Modulation von *HK2* verläuft nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die metabolische Aktivität der Darmmikroorganismen führt zur Produktion von Butyrat durch die Fermentation von Ballaststoffen [195]. Butyrat wird durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren GPR4 (FFAR3) [57, 196], GPR43 (FFAR2) [57, 58, 197, 198] und GPR109a (HCAR2) [186, 199] registriert. Die folgenden Untersuchungen zielten darauf ab, festzustellen, ob die Modulation von *HK2* durch Butyrat über die zuvor beschriebenen Signalwege erfolgt. Mit siRNA für *FFAR2*, *FFAR3* und *HCAR2* wurde die Expression dieser Rezeptoren minimiert. Trotz einer signifikanten Reduktion ihrer Expression, blieb die Repression von *HK2* durch Butyrat unbeeinflusst (Abbildung 3-5). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Modulation von *HK2* nicht über die bekannte Interaktion von Butyrat mit den genannten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt.

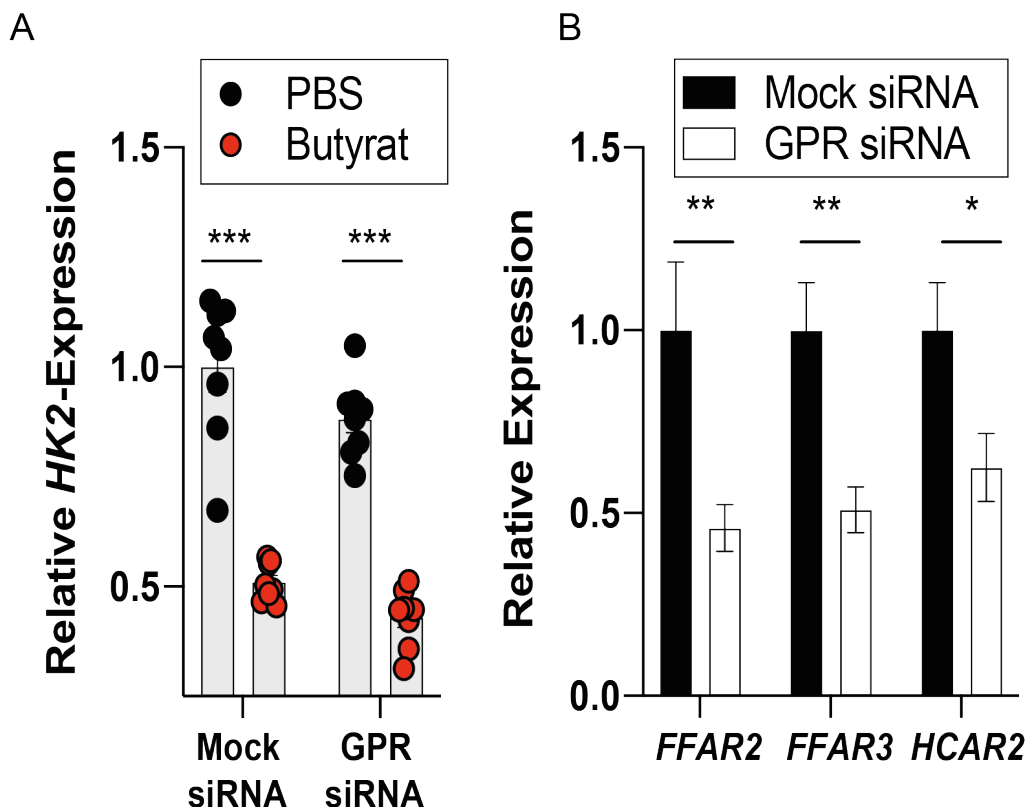


Abbildung 3-5 Butyrat moduliert *HK2* nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

(A) Relative *HK2*-Expression in Caco-2-Zellen nach Transfektion mit einem Mix aus siRNA, welcher die drei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren *FFAR2*, *FFAR3* und *HCAR2* als Zielstruktur hat, und nachfolgender Stimulation mit Butyrat (2 mM über 24 Stunden). (B) Expression von *FFAR2*, *FFAR3* und *HCAR2* in Caco-2-Zellen (n=8 pro Gruppe) nach Transfektion mit der entsprechenden siRNA, um den erfolgreichen Knockdown zu überprüfen. Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA (vs. PBS-Kontrolle der jeweiligen siRNA Gruppe(A); vs. Mock siRNA (B)).

3.6 Butyrat vermindert die Expression von *HK2* über HDAC8

Butyrat interagiert nicht nur mit G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sondern auch direkt mit HDACs [200], die als epigenetische Regulatoren fungieren und somit potenziell auch die Regulation von *HK2* beeinflussen könnten. Um dies zu untersuchen, wurden HDACs mit einem Pan-HDAC-Inhibitor gehemmt. Es zeigte sich, dass diese Inhibition die durch Butyrat vermittelte Repression von *HK2* aufhob. HDACs sind in vier Klassen unterteilt: Klasse 1 umfasst HDAC 1, 2, 3 und 8; Klasse 2a umfasst HDAC 4, 5, 7 und 9; Klasse 2b beinhaltet HDAC 6 und 10; Klasse 3 enthält die Sirtuine und Klasse 4 umfasst HDAC 11. Durch die Verwendung von Vorinostat (SAHA) (Sigma-Aldrich, Produktnummer: SML0061-25MG) wurden die Klassen 1, 2 und 4 gehemmt. Dabei wurde die Regulation von *HK2* durch Butyrat aufgehoben. Die spezifischen Inhibitoren Pimelin-Diphenylamin 106 (TCH) (MedChemExpress, Produktnummer: HY-19348) und PCI-34051 (PCI) (MedChemExpress, Produktnummer: HY-15224) blockierten Klasse 1, TMP 269 Klasse 2, β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate (NAM) (Sigma-Aldrich, Produktnummer N0505-1G) Klasse 3 und SIS17 (MedChemExpress, Produktnummer: HY-128918) Klasse 4. Dabei zeigte sich, dass nur die gemeinsame Hemmung der Klassen 1, 2 und 4 mit SAHA sowie die alleinige Hemmung von Klasse 1 mit TCH und PCI zu einem Verlust der Repression von *HK2* durch Butyrat führten. Die alleinige Hemmung der Klassen 2, 3 und 4 verhinderte diese Repression nicht. Daher ließ sich schließen, dass die Regulation über HDACs der Klasse 1 vermittelt wird. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen HDAC der Klasse 1 inhibiert. Valproinsäure (Sigma-Aldrich, Produktnummer: PHR1061-1G) wurde eingesetzt, um HDAC1, Santacruzamate A/CAY-10683 (MedChemExpress, Produktnummer HY-N0931) um HDAC2, RGFP966 (MedChemExpress, Produktnummer HY-13909) um HDAC3 und PCI um HDAC 8 zu inhibieren. Dabei zeigte sich, dass allein die Inhibition von HDAC8 zu einem Verlust der Repression von *HK2* durch Butyrat führte. Die Inhibition der anderen Mitglieder der HDAC Klasse 1 hingegen hatte keinen Einfluss auf die Repression. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Regulation von *HK2* durch Butyrat von HDAC8 der HDAC Klasse 1 abhängig ist.

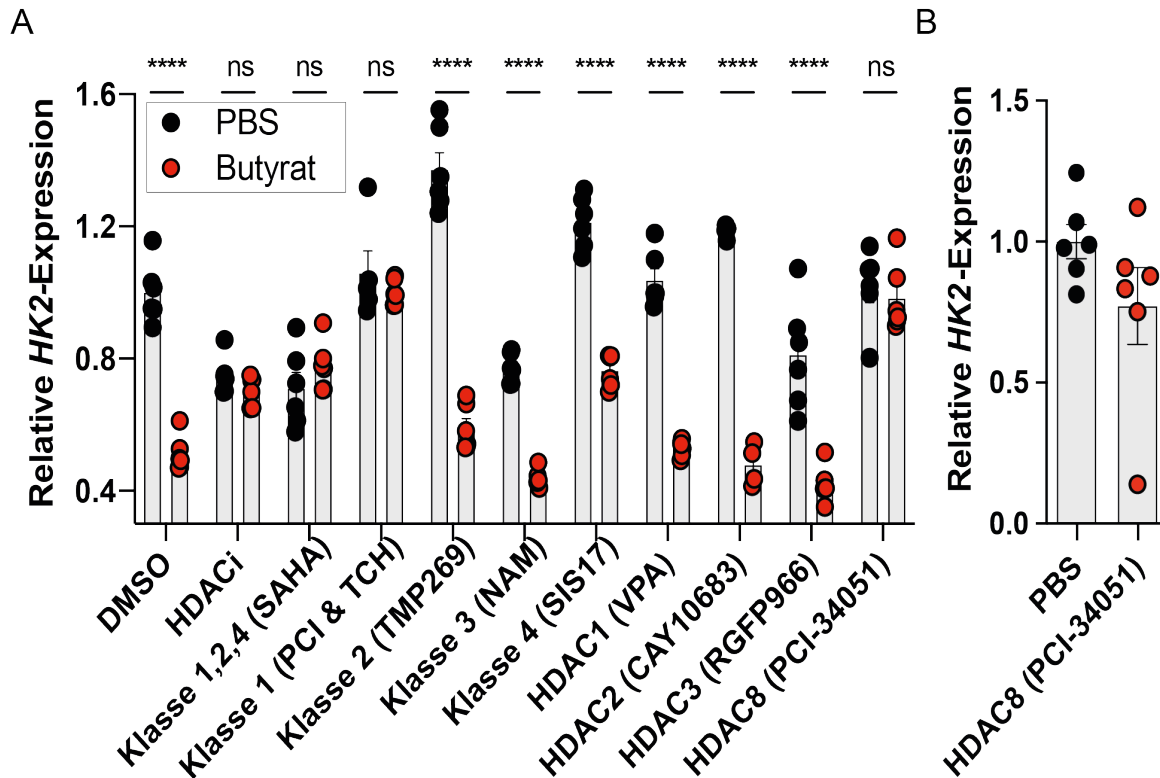


Abbildung 3-6 HDAC8 reguliert *HK2*

A) Relative *HK2*-Expression in Caco-2-Zellen, die zuerst für 24 Stunden mit allgemeinen oder spezifischen HDAC-Inhibitoren behandelt und anschließend mit Butyrat inkubiert wurden. HDACi bezieht sich auf eine Mischung aus SAHA (10 mM) und NAM (10 mM), die verwendet wurde, um alle HDAC-Klassen zu hemmen. Eine Mischung aus PCI (10 mM) und TCH (5 mM) wurde verwendet, um nur Klasse I HDACs zu hemmen. TMP269 (5 mM), NAM (10 mM) und SIS17 (50 mM) wurden verwendet, um jeweils Klasse II, III und IV zu hemmen. VPA (1 mM), CAY10682 (10 mM), RGFP966 (5 mM) und PCI-34051 (10 mM) wurden verwendet, um nur HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 zu hemmen. Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA (vs. DMSO). (B) Relative *HK2*-Expression in HT-29 Zellen welche zuerst für 24 Stunden mit PCI-34051 (10 mM) stimuliert wurden und im Anschluss mit Butyrat (2 mM) für 24 Stunden stimuliert wurden, um HDAC8 zu inhibieren. Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test gewählt.

3.7 Der Verlust von HK2 mindert die Anfälligkeit für Zelltod ex vivo

Der Verlust von HK2 führte im Mausmodell zu einer Verringerung des Zelltods unter entzündlichen Bedingungen (1.4.6). Um die molekularen Prozesse weiter zu erforschen, die bei der durch HK2 vermittelten Schutzfunktion vor Entzündungen beteiligt sind, wurden intestinale Organoide aus *Hk2* ^{Δ IEC}- und WT-Tieren generiert (2.3.1,2.3.5) und ihre Reaktion auf die Stimulation mit murinem TNF (Thermo Fisher Scientific, Produktnummer: PMC3016) untersucht. Die Western-Blot-Analyse (2.6.4) zeigte höhere HK2-Spiegel nach der TNF-Stimulation in WT-Organoiden. *Hk2* ^{Δ IEC}-Organoide zeigten im Vergleich zu WT-Organoiden niedrigere Spiegel von gespaltener Caspase 3 und gespaltener Poly (ADP-Ribose) -Polymerase 1 (PARP1)

nach Stimulation mit TNF (Abbildung 3-7). Das vermehrte Auftreten dieser beiden gespaltenen Enzyme deutet auf eine verstärkte Aktivierung von Zelltod hin [158, 160, 201, 202]. Diese Daten unterstützen daher die Hypothese von einem reduziertem Zelltod in Abwesenheit von HK2 unter entzündlichen Bedingungen.

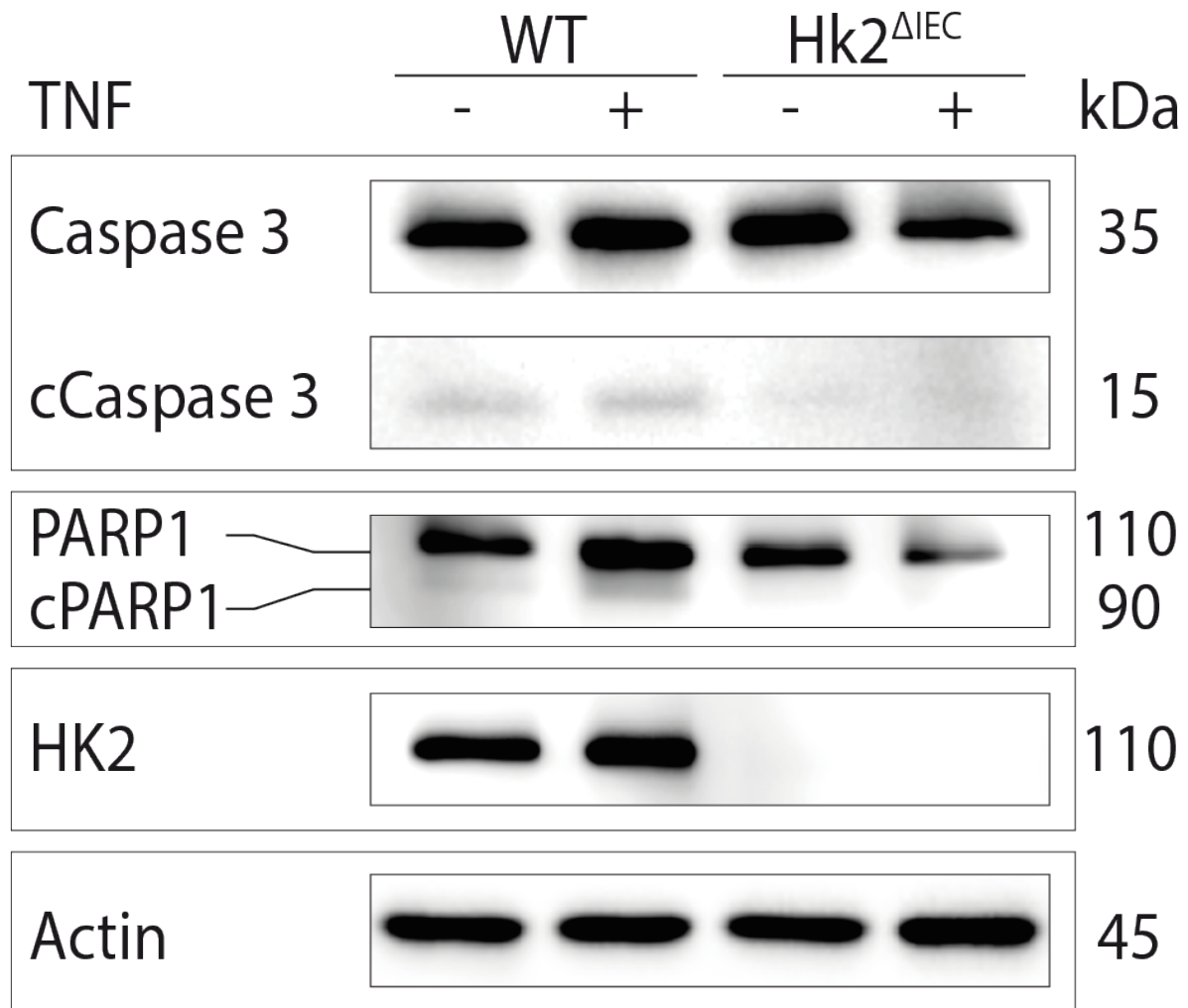


Abbildung 3-7 Verlust von HK2 reduziert Anfälligkeit gegenüber Zelltod nach TNF-Stimulation

Western-Blot-Analyse der Proteinlysate aus WT- und Hk2 Δ IEC-Organoiden nach Stimulation mit 100 ng/mL TNF für 24 Stunden. Die mit TNF stimulierten Lysate (+) und die unstimulierten Lysate (-) wurden entsprechend gekennzeichnet. Es wurde der Nachweis von Caspase 3 und gespaltenen Caspase 3, PARP1 und gespaltenen PARP1 sowie HK2 durchgeführt. Beta-Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet, mit entsprechenden Größenangaben in kDa in der rechten Spalte.

3.8 Keine signifikante Veränderung der mitochondrialen Atmung durch den Verlust von HK2 in einem biologischen Replikat intestinaler Organoiden

Der Verlust von HK2 im verwendeten Zellmodell (Caco-2) manifestierte sich durch eine substantielle Verringerung der basalen mitochondrialen Atmung und einer deutlichen Einschränkung der maximalen mitochondrialen Atmung im Vergleich zu den WT-

Zellen. Interessanterweise blieb die glykolytische Aktivität der Zellen unbeeinflusst (1.4.7). Diese beobachteten Veränderungen deuten auf eine Auswirkung des HK2-Verlustes auf die mitochondriale Elektronentransportkette hin. Es ist bekannt, dass Veränderungen in diesem Bereich, insbesondere am Komplex I, mit der Regulation der mitochondrialen Membranpermeabilität in Verbindung stehen [156, 157, 159, 165, 166]. Die Erkenntnisse aus den Caco-2-Zellen trugen maßgeblich zur Erstellung der Hypothese bei, die bereits in der Einleitung skizziert wurde. Diese besagt, dass der durch HK2 vermittelte mechanistische Schutz vor intestinaler Inflammation möglicherweise auf eine niedrigere *PPIF*-Expression zurückzuführen ist, die wiederum zu einer Verringerung der MPTP-Öffnung und der mitochondrialen Membranpermeabilität führen (1.4.7). Die Entscheidung, Caco-2-Zellen zu verwenden, basierte auf dem Fehlen eines etablierten Modells für die Nutzung von Organoiden. In enger Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Kensuke Shima (Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) wurde eine Methode zur Anwendung von Organoiden für die Seahorse-Analyse entwickelt, wobei die 3D-Struktur beibehalten wurde (2.4.3). Die Messung der mitochondrialen Aktivität erfolgte aus einem biologischen Replikat jedes Genotyps aus unterschiedlichen Passagezeitpunkten. In diesen Organoiden, die aus dem Colon gewonnen wurden, zeigte sich ein Trend ähnlich dem Phänotyp der Caco-2-Zellen, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 3-8).

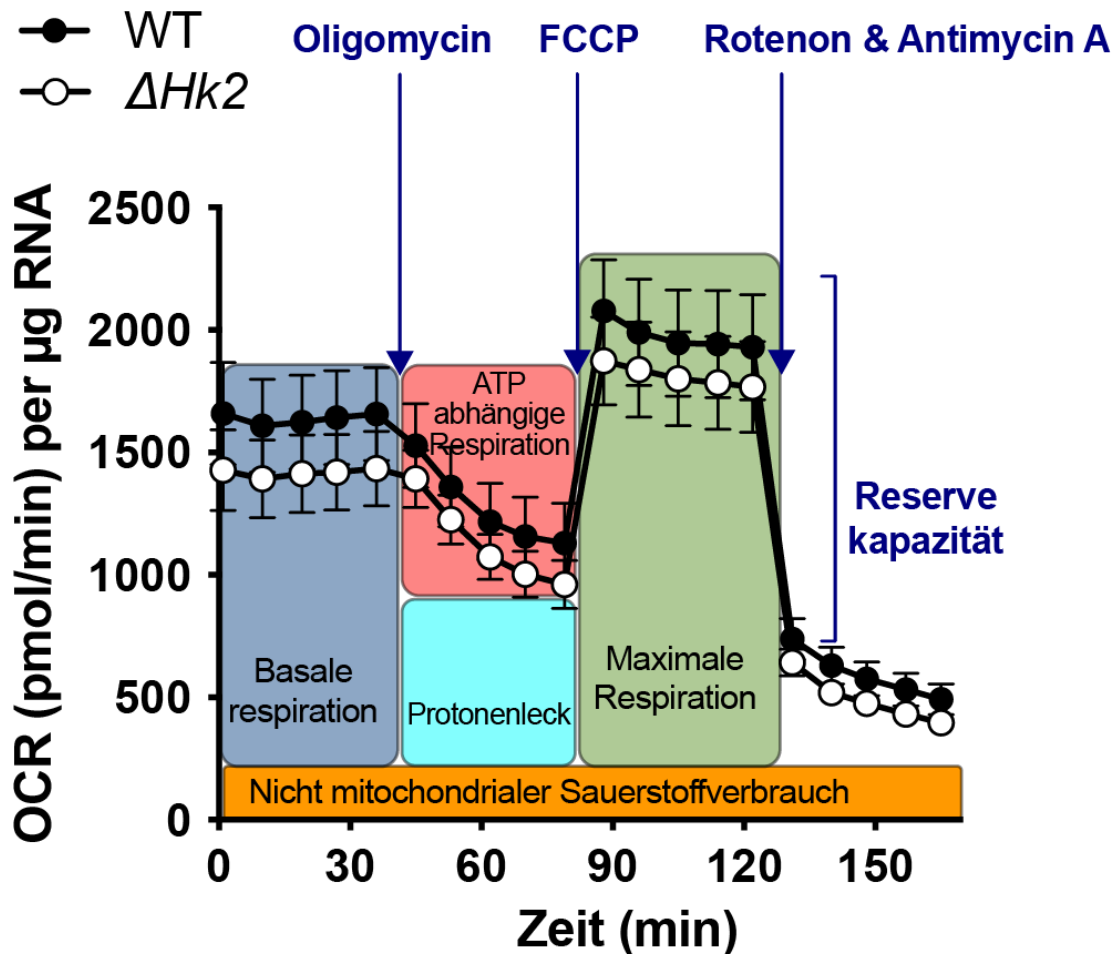


Abbildung 3-8 Seahorse-Analyse von Colon-Organoiden zeigen keine signifikante Änderung der mitochondrialen Atmung.

Bestimmung der relativen OCR als Maß für die mitochondriale Atmung von WT- und $Hk2^{\Delta IEC}$ -Organoiden aus dem Colon. Die relative OCR wurde im Verhältnis zum absoluten RNA-Gehalt des jeweils gemessenen Wells berechnet. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM präsentiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA.

3.9 Butyrat reduziert die mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von HK2

Die bisherigen Untersuchungen verdeutlichen, dass Butyrat die Regulation von $HK2$ durch HDAC8 beeinflusst. In Caco-2-Zellen führte der Verlust von $HK2$ zu einer Beeinträchtigung sowohl der basalen als auch der maximalen mitochondrialen Atmung im Vergleich zu den WT-Zellen (1.4.7). Um den Einfluss von Butyrat auf die mitochondriale Atmung zu analysieren, wurden Caco-2^{WT}-Zellen 24 Stunden vorab mit Butyrat stimuliert. Diese zeitliche Vorbehandlung wurde bewusst gewählt, um eine ausreichende Reduktion der $HK2$ -Expression zu ermöglichen, was wiederum zu einer verminderten Translation von $HK2$ führt. Die Vorbehandlung mit Butyrat führte, ähnlich wie der Verlust von $HK2$, zu einer Reduktion der basalen mitochondrialen Atmung

sowie einer drastischen Verringerung der maximalen mitochondrialen Atmung. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt nicht auf einem HK2-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist, wurde das Experiment in *Caco-2* ^{Δ HK2}-Zellen wiederholt. In diesem Setting ergaben sich keine signifikanten Veränderungen in der mitochondrialen Atmung. Weiterhin zeigte sich, dass eine Stimulation mit Butyrat zu einer Reduktion der *PPIF* Expression führte, wie sie *in vivo* durch den Verlust von HK2 beobachtet wurde (Abbildung 3-9). Diese Ergebnisse belegen, dass Butyrat, analog zum Verlust von HK2 in *Caco-2*-Zellen, zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung führt. Zudem ist diese Regulation abhängig von der Präsenz von HK2, was auf eine proteinspezifische Rolle in diesem Prozess hinweist.

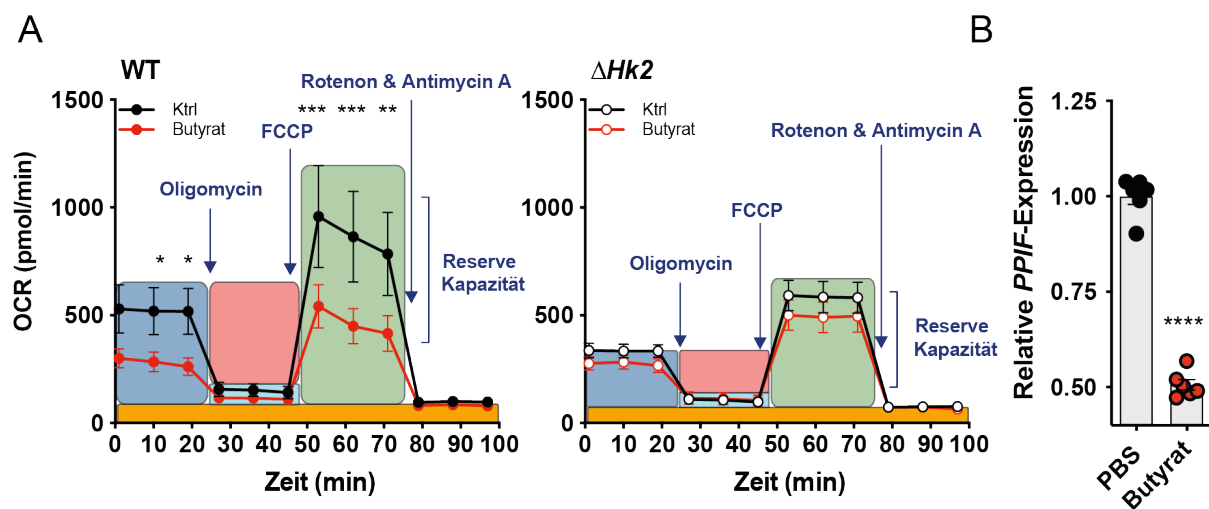


Abbildung 3-9 Butyrat reduziert die mitochondriale Atmung

(A) *Caco-2*^{WT}- und *Caco-2* ^{Δ HK2}-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 2 mM Butyrat stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Messung der OCR mit dem Seahorse XF Analyser. Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA. B) Relative *PPIF*-Expression von *Caco-2*-Zellen die 24 Stunden lang mit 2mM Butyrat stimuliert wurden. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test gewählt.

3.10 Kurzkettige Fettsäuren modulieren den Verlauf einer murinen Colitis

Nachdem erfolgreich nachweisen wurde, dass kurzkettige Fettsäuren HK2 modulieren und insbesondere Butyrat die mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von HK2 reduziert, wurde der Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf eine DSS-Colitis im Mausmodell untersucht. WT-Mäuse wurden mit drei verschiedenen Interventionen behandelt: einer Kontrolldiät, einer Supplementation mit Butyrat oder einer Supplementation mit Acetat (2.10.7). Nach einer 10-tägigen Aufsättigungsphase mit der entsprechenden kurzkettigen Fettsäure wurde unter fortgesetzter Intervention die DSS-Colitis durchgeführt (2.10.6). Die Aufsättigung mit Butyrat führte bei den WT-

Mäusen zu einem milderem Krankheitsverlauf. Im Detail zeigte sich in dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Gewichtsverlustes, ein niedrigerer DAI, niedrigere Serumlevel von KC/CXCL1 und weniger TUNEL-positive Epithelzellen im Colon. Der histologische Entzündungsscore war im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß (Abbildung 3-10). Die Supplementation mit Acetat führte zu einer deutlichen klinischen Verschlechterung des Krankheitsverlaufes mit signifikanter Zunahme des Gewichtsverlustes und des DAI. Diese Verschlechterung war so drastisch, dass die Versuchsgruppe aus ethischen Gründen vorzeitig am Tag 8 der Colitis terminiert wurde. Der histologische Entzündungsscore zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß. Ebenso waren die Serumlevel von KC/CXCL1 und die Anzahl der TUNEL-positiven Epithelzellen im Colon im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Dabei ist zu beachten, dass eine vergleichende Beurteilung zur Kontrollgruppe aufgrund der vorzeitigen Terminierung nur bedingt möglich ist (Abbildung 3-10). Immunhistochemisch zeigte sich eine Reduktion von HK2 im Colonepithel durch die Butyrat-Aufsättigung. Bei der Zugabe von Acetat zeigte sich keine signifikante Veränderung, wobei auch hier die oben erwähnten Vorbehalte gelten (Abbildung 3-10). Mit Ausnahme einer reduzierten Colonlänge in der Acetat-Gruppe, was auf eine erhöhte Entzündungsaktivität hinweisen könnte, zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im prozentualen Zökum-, Leber-, Milz- und EWAT-Gewicht oder der Länge von Colon und Dünndarm. Ebenso gab es keinen Anhalt für eine erhöhte Zellproliferation bestimmt durch Ki67-positive Zellen in der Darmmucosa (Abbildung 3-10). Insgesamt ließ sich erfolgreich zeigen, dass die Behandlung mit Butyrat bei WT-Mäusen zu einem deutlich milderem Krankheitsverlauf führte, während die Behandlung mit Acetat zu einem signifikant schwereren klinischen Verlauf führte.

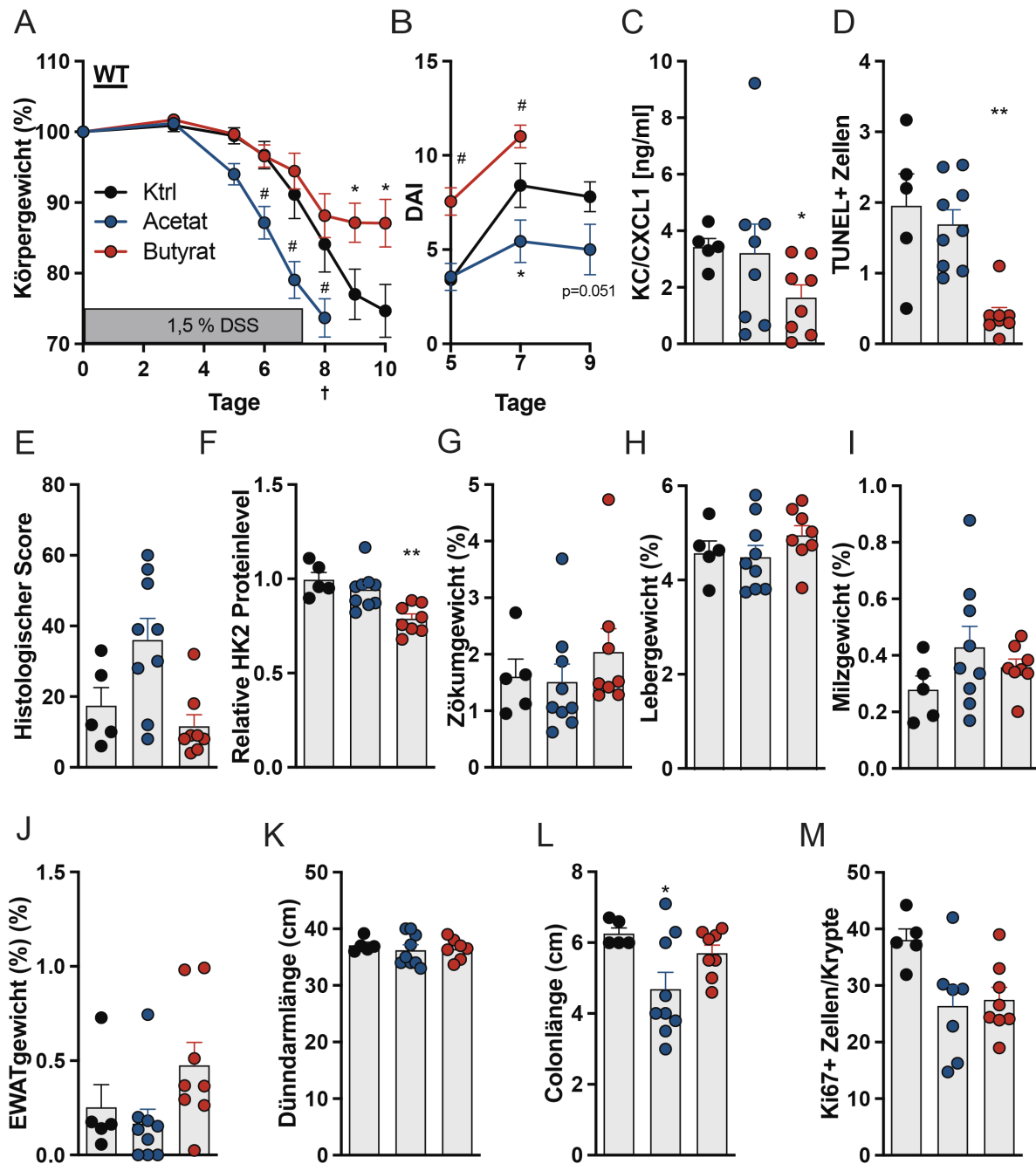


Abbildung 3-10 Veränderte Krankheitsaktivität in WT-Mäusen durch kurzkettige Fettsäuren

(A-M) WT-Mäuse erhielten entweder eine Kontrolldiät oder eine Supplementation mit Butyrat oder Acetat und wurden oral mit DSS behandelt, um eine Colitis zu induzieren. Bei den verschiedenen erhobenen Parametern handelt es sich um: (A) Körpergewichtsverlauf, (B) DAI, (C) Serum KC/CXCL1 Level, (D) TUNEL-positive Zellen pro Colonkrypte, (E) Histologischer Inflammation Score, (F) Immunhistochemisch HK2-Protein-Level im Colonepithel, prozentuales Organgewicht bezogen auf das Körpergewicht von (G) Zökum, (H) Leber, (I) Milz und (J) EWAT, absolute Länge von (K) Dünndarm und (L) Dickdarm sowie (M) Ki67-positive Zellen pro Colonkrypte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA (A,B) und one-way ANOVA (C-M). Die Symbole * bzw. # indizieren statistische Signifikanz in Butyrat (*) oder Acetat (#) versus Kontrolldiät. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt.

3.11 Die epitheliale Deletion von HK2 verhindert Butyrateffekt auf Colitis

In vorangegangenen Experimenten konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass Butyrat die Expression von *HK2* reduziert. Zudem zeigte sich, dass die Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus aufgrund des Butyrat-Verlusts in Abhängigkeit von *HK2* stattfinden (3.9). Die Daten deuten darauf hin, dass der Einfluss von Butyrat auf den Krankheitsverlauf im murinen Colitis-Modell ebenfalls von der Präsenz von *HK2* abhängig ist. Das experimentelle Setup aus Abschnitt 3.10 wurde parallel auch mit *Hk2^{ΔIEC}*-Mäusen durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich durch die Behandlung mit Butyrat keine Veränderung der Krankheitsaktivität im Colitis-Modell im Vergleich zur Kontrolldiät. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht, im DAI, in den Serumwerten von KC/CXCL1, im histologischen Inflammation Score oder in der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen. Auch die prozentualen Organgewichte von Zökum, Leber, Milz, EWAT sowie die Längen von Colon und Dünndarm zeigten keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 3-11). Die Behandlung mit Acetat zeigte lediglich einmalig eine signifikante Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich zeigten sich ein Trend für erhöhte Werte im DAI, KC/CXCL1 im Serum, histologischem Inflammationsscore und TUNEL-positiven Zellen in den Colonekrypten, welche jedoch nicht signifikant waren. Auch im EWAT-Gewicht zeigte sich ein Trend zur Reduktion, der jedoch nicht signifikant war. In keiner der beiden Gruppen gab es Anzeichen für eine erhöhte oder erniedrigte Zellproliferation (Abbildung 3-11). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Acetat in *Hk2^{ΔIEC}*-Mäusen eine weniger ausgeprägte klinische Verschlechterung verursacht, was zumindest auf eine partielle Abhängigkeit von *HK2* hindeutet. Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Supplementation des bakteriellen Metaboliten Butyrat zu einer Reduktion von *HK2* führte, was zu einem deutlich milderem Krankheitsverlauf im murinen Colitis-Modell führte.

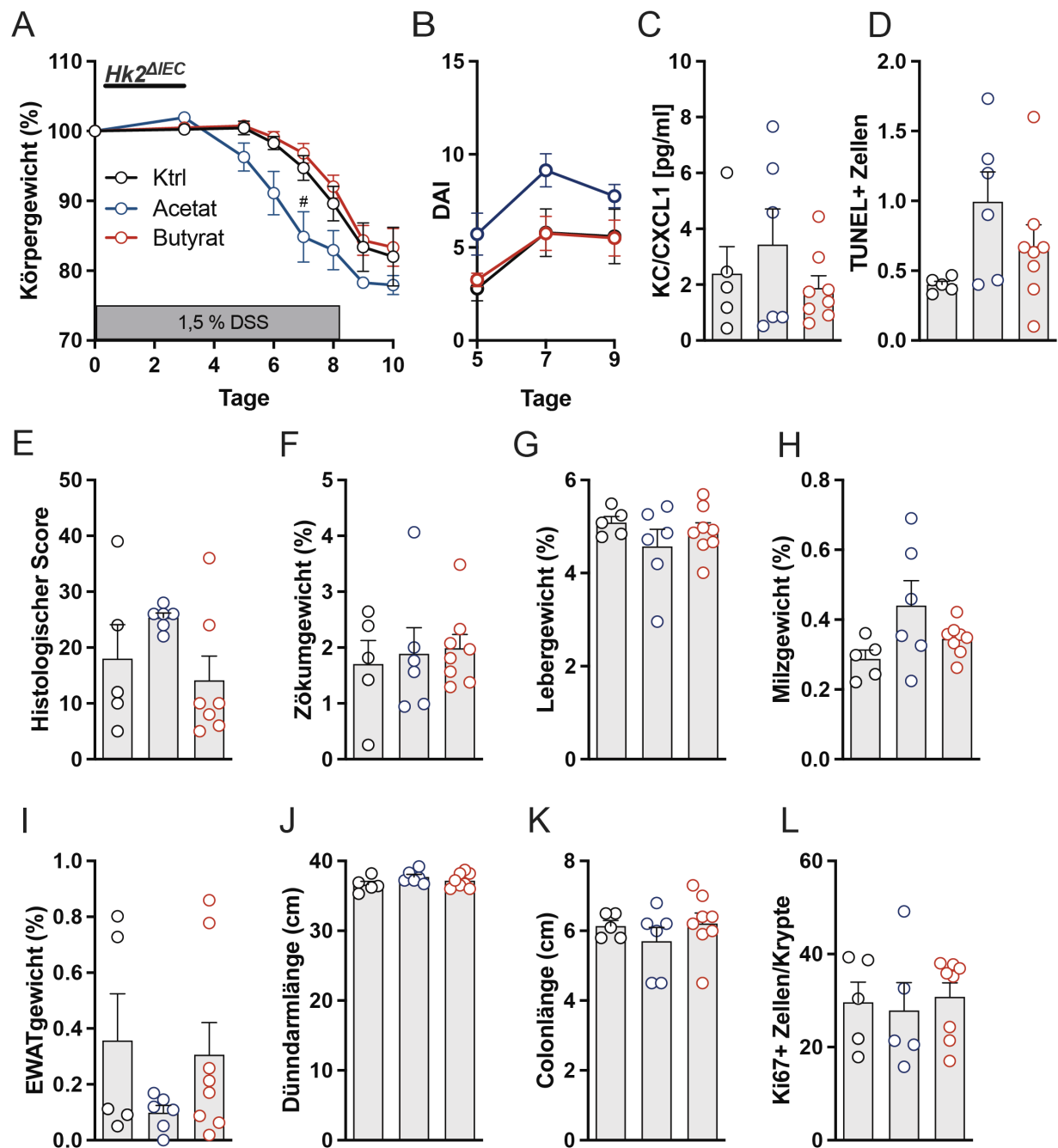


Abbildung 3-11 Kurzkettige Fettsäuren verlieren ihren Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei *Hk2^{ΔIEC}*-Mäusen

(A-L) *Hk2^{ΔIEC}*-Mäuse erhielten entweder eine Kontrolldiät oder eine Supplementation mit Butyrat oder Acetat und wurden oral mit DSS behandelt, um eine Colitis zu induzieren. Bei den verschiedenen erhobenen Parametern handelt es sich um: (A) Körpergewichtsverlauf, (B) DAI, (C) Serum KC/CXCL1 Level, (D) TUNEL-positive Zellen pro Colonkrypte, (E) Histologischer Inflammation Score, Prozentuales Organgewicht bezogen auf das Körpergewicht von (F) Zökum, (G) Leber, (H) Milz und (I) EWAT, absolute Länge von (J) Dünndarm und (K) Dickdarm sowie (L) Ki67-positive Zellen pro Colonkrypte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA (A,B) und one-way ANOVA (C-L). Die Symbole * bzw. # indizieren statistische Signifikanz in Butyrat (*) oder Acetat (#) versus Kontrolldiät. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt.

4 Diskussion

HK2 ist nicht nur eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse, sondern auch maßgeblich an immunregulatorischen Prozessen des intestinalen Epithels beteiligt [1]. Im Rahmen der Vorarbeiten konnte belegt werden, dass *HK2* im intestinalen Epithel durch inflammatorische Prozesse hochreguliert wird. Die entzündliche Signatur wurde sowohl *in vitro* an Caco-2-Zellen als auch *in vivo* im Mausmodell und bei Patienten mit CED repliziert. Der Entzug von HK2 aus diesen Modellen führte zu einem milderen inflammatorischen Verlauf. Konkret konnte gezeigt werden, dass der Verlust von HK2 in intestinalen Epithelzellen zu einem milderen Krankheitsverlauf im murinen Colitis-Modell führte. Unter physiologischen Bedingungen zeigten sich durch den Verlust von HK2 in intestinalen Epithelzellen keine relevanten makroskopischen Unterschiede zwischen WT- und *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen, weder im Glukosestoffwechsel noch in der Vitalität der Epithelzellen. Daraus lässt sich schließen, dass HK2 in intestinalen Epithelzellen ein sicheres therapeutisches Ziel darstellen könnte. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass der protektive Phänotyp in *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen mit einer Repression von *PPIF* einherging. Als Bestandteil der MPTP führt eine solche Repression zu einer verringerten mitochondrialen Permeabilität und verhindert somit mitochondrial vermitteltes Zellsterben.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte darauf aufbauend gezeigt werden, dass *HK2* durch das intestinale Mikrobiom reguliert wird. Dabei stellte sich heraus, dass diese Regulation nicht auf die ubiquitäre Präsenz des Mikrobioms zurückzuführen ist, sondern auf die spezifische Komposition und Aktivität desselben. Verantwortlich für die regulatorischen Effekte sind die Metabolite des Mikrobioms, insbesondere kurzkettige Fettsäuren. Die richtige Komposition dieser kurzkettigen Fettsäuren dient dabei als „Lichtschalter“, der HK2 an- und ausschalten kann. Butyrat zeigte dabei einen protektiven Effekt durch die Reduktion von HK2, während Acetat einen schädlichen Effekt durch eine Erhöhung von *Hk2* hervorrief. Interessanterweise führte Butyrat zu denselben Veränderungen wie der Verlust von HK2, zeigte jedoch keine zusätzlichen Veränderungen in HK2-deletierten Zellen. Darüber hinaus konnten die beobachtete verminderte Suszeptibilität gegenüber Zelltod auch *ex vivo* validiert werden.

Bislang wurde eine Erhöhung von *HK2* hauptsächlich mit der Aktivierung von Immunzellen verbunden [137, 138, 203] und nicht für das intestinale Epithel. Die Tatsache, dass auch Patienten mit einer infektiösen Colitis eine Erhöhung im Epithel

zeigen, spricht dafür, dass HK2 nicht ausschließlich in die Ätiologie von CED involviert ist. Eine solche Rolle im Rahmen der generellen intestinalen Entzündung, würde gleichzeitig bedeuten, dass HK2 auch abseits von CED in Erkrankungen wie viralen, bakteriellen, parasitären, ischämischen und Therapie-assoziierten Colitiden ein therapeutisches Ziel bieten könnte. Im Folgenden werden die essenziellen Erkenntnisse der Arbeit zusammengefasst und die Limitationen dieser aufgelistet. Im Anschluss werden diese vor dem Hintergrund der aktuellen Kenntnisse interpretiert und diskutiert.

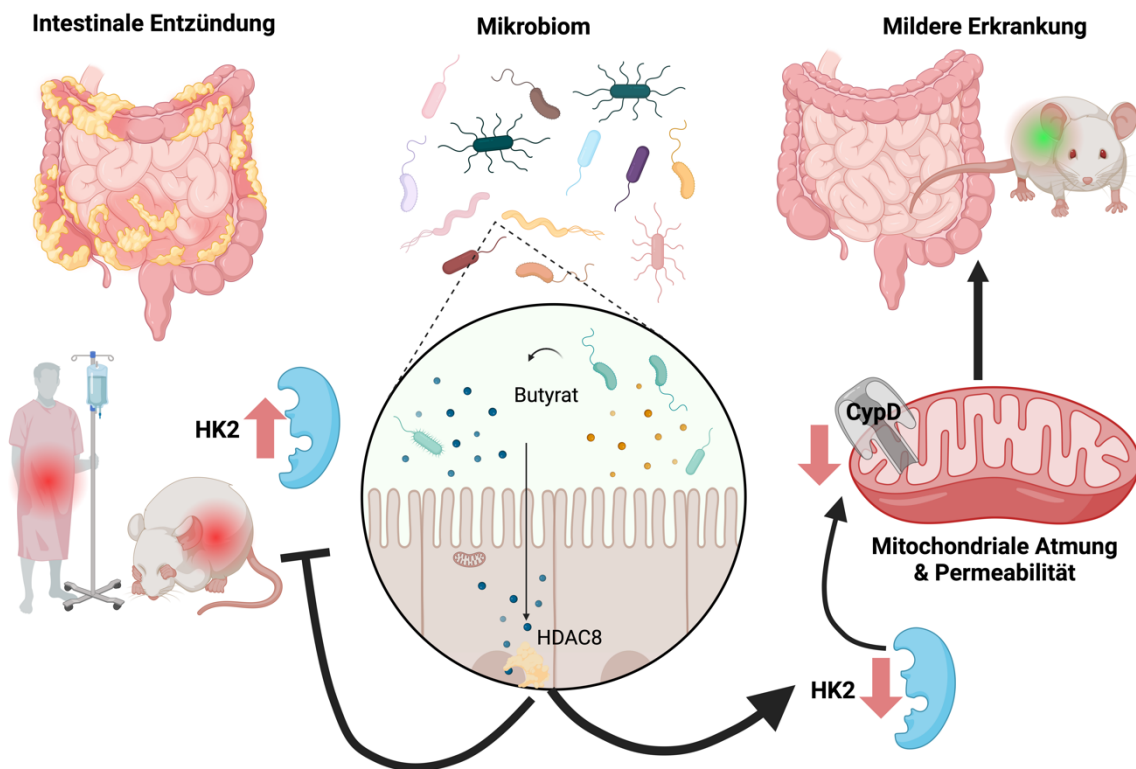


Abbildung 4-1 Graphische Zusammenfassung der Erkenntnisse dieser Arbeit

HK2 ist in humaner und muriner intestinaler Entzündung erhöht. Das Mikrobiom produziert den Metabolit Butyrat. Butyrat interagiert in intestinalen Epithelzellen mit HDAC8. Diese Interaktion führt zu einer Reduktion von HK2 und dadurch einer reduzierten mitochondrialen Funktion sowie Permeabilität, was im murinen Krankheitsmodell schlussendlich in einer reduzierten Krankheitsaktivität mündet. Graphik erstellt mit Biorender.

4.1 Identifikation der mikrobiellen Regulation von HK2

Hk2 wird vor allem im apikalen Darmepithel des Colons stark exprimiert, während es in den Krypten des Dickdarms kaum vorkommt (Abbildung 1-2). Dies resultiert in einer engen räumlichen Nähe zum intestinalen Mikrobiom und seinen Metaboliten [204]. Dieser beobachtete Effekt bleibt in keimfreien Tieren aus. Wenn jedoch keimfreie Tiere mit Mikroben besiedelt werden, kommt es innerhalb weniger Tage zu einem Anstieg

der *Hk2*-Expression auf das Niveau von konventionell gehaltenen Tieren [1]. Die erhöhte Expression im apikalen Epithelverband ist also abhängig von der Präsenz des intestinalen Mikrobioms.

Basierend darauf ergab sich die Frage, inwieweit die ubiquitäre Präsenz des Mikrobioms oder bestimmter Mikroben innerhalb des Mikrobioms für die Regulation verantwortlich ist. Keimfreie Mäuse, die mit ASF- und OMM Bakterienkonsortien kolonisiert wurden, zeigten eine Induktion der *Hk2*-Expression und bestätigten somit die vorangegangenen Ergebnisse. Zur weiteren Differenzierung wurde die *Hk2*-Expression in monokolonisierten gnotobiotischen Mäusen untersucht. Lipopolysaccharide, Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien und bekannte Induktoren von Inflammation im intestinalen Epithel [205], haben die Fähigkeit, dessen Genexpression zu beeinflussen [206]. Im gnotobiotischen Mausmodell führte das gramnegative Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 zu einer Induktion der *Hk2*-Expression. Jedoch führte die Monokolonisation mit dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* W3110 nicht zu einer erhöhten Expression, sodass Lipopolysaccharide nicht als Ursache für die Expressionsänderung in Frage kommen. Auch Peptidoglykane, Bestandteile der Zellwand beispielsweise von *Escherichia coli* W3110 oder *Bifidobacterium longum* NC 2705, deren Bestandteile HK2-vermittelte Immunreaktionen hervorrufen können [145, 155], führten nicht zu einer Induktion von HK2 (Abbildung 3-1). Die bakterielle Zellwandbeschaffenheit kommt daher nicht für die Induktion von HK2 infrage. Daraus lässt sich schließen, dass die erhöhte Expression im apikalen Epithelverband kein panmikrobieller Effekt ist, sondern durch spezifische Bakterien induziert wird.

Innerhalb des intestinalen Epithels zeigen sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der metabolischen Enzyme entlang der Krypt-Villus-Achse [207]. Gleichzeitig zeigen sich zwischen keimfreien und konventionell gehaltenen Tieren bedeutende Unterschiede im Metabolom [208]. Basierend auf den vorigen Ergebnissen wurde die Hypothese erarbeitet, dass die regulatorischen Effekte des Mikrobioms auf HK2 indirekt durch dessen Metabolite und nicht durch die Mikroben selbst zustande kommen. Hierfür wurden zunächst die einzelnen Spezies der OMM isoliert und kultiviert, und anschließend wurde deren Überstand mit seinen Metaboliten asserviert. Die Wahl von OMM für diese Experimente beruhte auf der Tatsache, dass deren Stämme genauestens klassifiziert und sequenziert sind und natürlicherweise im Mausmikrobiom vorkommen [209, 210]. Interessanterweise war lediglich der

Überstand von drei Stämmen aus diesem Konsortium, welches im Mausmodell die *Hk2*-Expression erhöhte, in der Lage, *in vitro* in Caco-2-Zellen die *HK2*-Expression zu verändern (Abbildung 3-3). Bei diesen drei Spezies handelt es sich um *Enterococcus faecalis* KB1 als Hauptinduktor sowie *Clostridium innocuum* I46 und *Flavonifractor plautii* YL31 als Repressoren von *HK2*. Daraus wurde geschlossen, dass die Regulation über die Metabolite der Mikroben vermittelt wird.

Die beiden Repressoren *Clostridium innocuum* I46 und *Flavonifractor plautii* YL31 sind bekannte Produzenten kurzkettiger Fettsäuren [191]. Die Expression von *Hk2* nimmt entlang des Gastrointestinaltrakts von oral nach aboral zu [1], wobei die höchste Expression im Colon vorliegt. Dort befindet sich auch die höchste Bakterienlast [192]. Das Colon ist zusätzlich die Lokalisation der meisten bakteriellen Fermentation [124]. Es war bereits bekannt, dass die Aktivität von HK1 durch Fettsäuren inhibiert werden kann [193, 194]. Basierend auf diesem Wissen wurde die Hypothese generiert, dass kurzkettige Fettsäuren für die Regulation verantwortlich sein könnten. Daraufhin wurde ein Vorhersagemodell für das Synthesepotenzial kurzkettiger Fettsäuren der einzelnen OMM-Spezies entwickelt. Hier zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der gemessenen Veränderung der *HK2*-Expression *in vitro* und dem vorhergesagten Synthesepotenzial von Butyrat und Acetat. Propionat hingegen zeigte in diesem Modell keinen Einfluss auf die *HK2*-Regulation. Anschließend wurden die kurzkettigen Fettsäuren aus dem Überstand mittels Targeted Metabolomics zur Bestätigung der Hypothese quantifiziert (Abbildung 3-3). Im nächsten Schritt wurden diese Ergebnisse validiert. *In vitro* zeigte sich in Caco-2-Zellen durch Stimulation mit Butyrat eine Repression der *HK2*-Expression, während Acetat zu einer Induktion führte. Um die Hypothese auch *in vivo* und auf Proteinebene zu validieren, erfolgte in C57BL/6j Mäuse über 10 Tage eine Intervention mit Butyrat. In den gewonnenen Proben zeigten sich immunhistochemisch reduzierte *HK2*-Level im apikalen Epithelverband. Zusammenfassend zeigte sich, dass die mikrobiellen Metabolite (Kurzketten Fettsäuren) ursächlich für die Expressionsänderungen von *Hk2* im apikalen Darmepithel sind.

4.2 Analyse des Signalwegs zwischen Butyrat und HK2

Butyrat, Propionat und Acetat entstehen hauptsächlich durch die Fermentation der Mikroben im Dickdarm [49, 50]. Im Colon, dem Hauptort der Verarbeitung kurzkettiger Fettsäuren, dienen sie als bevorzugte Energiequelle für Enterozyten [22, 31]. Es gibt

bereits umfangreiche Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Darmepithel und kurzkettigen Fettsäuren sowie potenzielle Signalwege. Sie interagieren mit den Wirtszellen über verschiedene Signalwege, wobei zwei besonders relevant sind. Einerseits können kurzkettige Fettsäuren direkt an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche binden, andererseits können sie von den Zellen aufgenommen werden und intrazellulär HDACs inhibieren [211]. Die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren FFAR2(GPR43), FFAR3(GPR41) und HCAR2(GPR109A) stehen im Fokus der Forschung. Kurzkettige Fettsäuren steuern über FFAR2 immunregulatorische Effekte wie Chemotaxis [212] und die Funktion von T_{reg}-Zellen [63]. Dieser Signalweg hat auch im zentral Nervensystem eine hohe Bedeutung, da kurzkettige Fettsäuren über diesen Rezeptor die Reifung und Funktion von Mikroglia beeinflussen [213]. Die Aktivierung von HCAR2 durch kurzkettige Fettsäuren führt zu einer verminderten intestinalen Entzündung im Colitis-Modell und reduziert die Colonkarzinogenese [199]. Die Interaktion zwischen kurzkettigen Fettsäuren und HCAR2 sowie FFAR2 im intestinalen Epithel kann zu einer Aktivierung von Inflammasomen und erhöhten Produktion von IL18 führen [186]. Interessanterweise führt der Verlust von Inflammasomen und damit einhergehende niedrigere Spiegel an IL18 im Colitis-Modell zu einer erhöhten Krankheitsaktivität [214]. Auch das Zusammenspiel von kurzkettigen Fettsäuren und FFAR3 spielt eine wichtige Rolle für die Immunfunktion, da darüber beispielsweise die Ausreifung dendritischer Zellen blockiert werden kann und allergische Atemwegsentzündungen gehemmt werden [215]. Kurzkettige Fettsäuren sind also in der Lage, über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Entzündung, Infektion, Karzinogenese und Immunfunktion zu modulieren. Um zu untersuchen, ob FFAR für die Interaktion zwischen Butyrat und HK2 relevant sind, wurde siRNA für die jeweiligen Rezeptoren verwendet. Die Transfektion mit der siRNA führte *in vitro* in Caco-2-Zellen zu einer adäquaten Unterdrückung der RNA des entsprechenden Rezeptors. Trotz dieser adäquaten Unterdrückung kam es jedoch weiterhin zu einer unveränderten Reduktion der HK2-Expression durch Butyrat. Das zeigt, dass der Signalweg zwischen Butyrat und HK2 nicht über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verläuft.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob HDACs an der Regulation von HK2 beteiligt sind. Wie bereits erwähnt, können kurzkettige Fettsäuren direkt in intestinalen Epithelzellen HDACs inhibieren. Es ist bekannt, dass diese Inhibition in Zellen des blutbildenden Systems zu toleranterer und anti-inflammatorischer Zelldifferenzierung

führt. Kurzkettige Fettsäuren führen in mononukleären Zellen und Neutrophilen, genauso wie globale HDAC-Inhibitoren, zu einer Inaktivierung von NF- κ B und einer Reduktion von TNF [212, 216]. Dieser anti-entzündliche Effekt von kurzkettigen Fettsäuren über HDACs wurde auch in weiteren Zelltypen wie Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben [65, 215, 217, 218]. Butyrat ist dafür bekannt, mit den HDAC-Klassen 1 und 2a zu interagieren [219]. In Caco-2-Zellen zeigte sich, dass SAHA, ein Pan-HDAC-Inhibitor (mit Ausnahme von Klasse 3), die Regulation der *HK2*-Expression durch Butyrat aufhob. In weiteren Versuchen mit Inhibitionen der spezifischen HDAC-Klassen zeigte sich, dass allein die Inhibition von HDACs der Klasse 1 die Regulation verhinderte. Schlussendlich konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb der HDAC Klasse 1 nur HDAC8 diesen Effekt verhinderte; die Inhibition aller anderen HDACs dieser Klasse führte zu keiner Änderung der Regulation durch Butyrat (Abbildung 3-6). Die Spezifität chemischer Inhibitoren kann jedoch nicht zu 100 % garantiert werden und unspezifische Effekte bspw. durch Verunreinigung, können niemals sicher ausgeschlossen werden [220]. In zukünftigen Arbeiten sollten daher genetische Modelle zur Analyse der vermuteten Interaktion zwischen Butyrat, HK2 und HDAC8 verwendet werden. Basierend auf den Erkenntnissen der chemischen Inhibition verläuft die Regulation der HK2 Depletion vermutlich spezifisch über HDAC8. Dieser Signalweg ließ sich mit den verwendeten Inhibitoren auch in anderen intestinalen Epithelzellmodellen (HT-29) bestätigen.

4.3 Kurzkettige Fettsäuren: HK2-abhängige mikrobielle Therapeutika

Aufgrund des Warburg-Effektes und der induzierten Überexpression von *HK2* in verschiedenen Tumorgeweben [143] wird bereits in der Onkologie ein möglicher therapeutischer Ansatz für Tumorerkrankungen über HK2 erforscht [221, 222]. Darüber hinaus gab es jedoch nur begrenzte Untersuchungen zur Rolle von HK2 bei inflammatorischen Erkrankungen. Angesichts des protektiven Phänotyps, der durch den Verlust von HK2 im intestinalen Epithel entsteht, sowie der starken Regulation durch die Metabolite des Mikrobioms, wurde die Idee eines potenziellen therapeutischen Ansatzes weiterverfolgt. Besonderes Augenmerk lag auf der Interaktion zwischen Butyrat und HK2, da dessen Repression einen therapeutischen Effekt hervorrufen sollte.

Um eine direkte Supplementation von Butyrat zu umgehen, die aufgrund der vorzeitigen Metabolisierung vor Erreichen des Colons nicht effektiv wäre, erfolgte die

Supplementation durch Tributyrin, einem Butyrat-Polymer. Dieses wird erst im Colon freigesetzt, nachdem es durch das Mikrobiom metabolisiert wurde und wird von den dortigen Zellen des Epithels aufgenommen [183, 184]. Acetat wurde hingegen im Trinkwasser der Tiere gelöst, wie zuvor mehrfach beschrieben [185, 186]. Die entsprechende Intervention wurde bereits 10 Tage vor Beginn der DSS-Colitis eingeführt, um den Tieren Zeit zu geben, sich an die Umstellung der Supplementation zu gewöhnen und genregulatorische Effekte durch die kurzkettigen Fettsäuren zu ermöglichen.

In WT-Mäusen zeigte sich, dass die Behandlung mit Acetat einen so gravierenden Effekt hatte, dass die Versuchsgruppe bereits 2 Tage vor dem geplanten Versuchsende aus ethischen Gründen terminiert wurde. Die Verschlechterung manifestierte sich sowohl im Verlauf des Körpergewichts als auch in der Krankheitsaktivität und der Länge des Colons (Abbildung 3-10). Inflammatorische Zytokine, TUNEL-positive Zellen sowie weitere Organveränderungen waren nicht signifikant verändert. Möglicherweise erklärt der vorzeitige Abbruch der Acetat-behandelten Gruppe von Mäusen mit einem WT-Genotyp zwei Tage vor dem Versuchsende das Ausbleiben dieser signifikanten Effekte, einschließlich der fehlenden HK2-Induktion. Hier ist jedoch zusätzlich zu beachten, dass *Hk2* im Colon insbesondere dem Lumen zugewandten apikalen Epithel exprimiert wird. Im Verlauf einer DSS-Colitis kommt es aufgrund der chemisch-toxischen Wirkung zu erheblichen Epithelschäden einschließlich Ulzerationen und Erosionen [223]. Diese Schäden gehen gleichzeitig mit dem Verlust der Epithelzellen einher, die die höchsten HK2-Level aufweisen und könnten somit eine weitere mögliche Ursache für den ausbleibenden Anstieg sein. Es ist zudem zu bedenken, dass bereits die WT-Mäuse im Rahmen der DSS-Colitis schwer betroffen waren mit einem Gewichtsverlust von knapp unter 25 % des Ausgangsgewichts zum Versuchsende. Infolgedessen stellt sich die Frage, inwieweit eine klinische Verschlechterung und eine Abnahme der erhobenen Parameter überhaupt mit dem Überleben vereinbar wären oder ob in dieser Gruppe bereits die maximalen Endpunkte erreicht wurden. Letztendlich zeigte sich jedoch anhand der erhobenen Parameter, dass Supplementierung von Acetat zu einem schwerwiegenderen und lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf führte.

Die Supplementierung mit Butyrat führte zu einer erheblichen Linderung der Colitis. Es zeigten sich nicht nur signifikante Unterschiede im Verlauf des Körpergewichts, sondern auch in der Krankheitsaktivität, den proinflammatorischen Zytokinen und den

TUNEL-positiven Zellen. Somit offenbarte Butyrat einen ähnlichen Mechanismus wie der Verlust von HK2. Der HK2-Verlust führte zu einer Veränderung des mitochondrialen Metabolismus und der mitochondrialen Permeabilität, was in einer verringerten Anfälligkeit des intestinalen Epithels für Zelltod resultierte [1]. Interessanterweise bewirkte auch Butyrat eine Reduktion des Zelltods. Makroskopisch ließen sich keine Anzeichen für eine Beteiligung anderer Organsysteme oder eine kompensatorisch verstärkte Zellproliferation feststellen (Abbildung 3-10). Die Supplementation von Butyrat erwies sich als protektiv und führte zu einem mildereren Krankheitsverlauf.

Parallel dazu wurde auch bei *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen eine Intervention mit kurzkettigen Fettsäuren durchgeführt. Dieses experimentelle Setting war von besonderer Relevanz, da für Butyrat bereits beschrieben wurde, dass es protektive Effekte in murinen intestinalen Infektions- [224] und Entzündungsmodellen aufweist [225]. Dies wirft die Frage auf, ob die in WT-Mäusen beschriebenen protektiven Effekte tatsächlich über HK2 im intestinale Epithel vermittelt werden oder ob diese Effekte unabhängig davon signalisiert werden. Es zeigte sich, dass Butyrat in *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen zu keiner Veränderung des Krankheitsverlaufs führte. Weder im Verlauf des Körpergewichts noch in der Krankheitsaktivität, den proinflammatorischen Zytokinen, dem Zelltod oder histologisch gab es, im Gegensatz zu den WT-Mäusen, Unterschiede (Abbildung 3-11). Es wird somit deutlich, dass der protektive Effekt von Butyrat in der murinen intestinalen Entzündung durch eine Reduktion von HK2 vermittelt wird.

Des weiteren konnte *in vitro* in Caco-2-Zellen gezeigt werden, dass Butyrat zu einer deutlichen Reduktion von *PPIF* führt. Dieses Gen kodiert für Cyclophilin D, einen Bestandteil der mitochondrialen Permeabilitätspore, und fungiert als mögliches Downstream-Target von HK2 [1]. Die mitochondriale Funktionsbeeinträchtigung, die durch den Verlust von HK2 *in vitro* in Caco-2-Zellen hervorgerufen wird, konnte ebenso durch eine Stimulation mit Butyrat reproduziert werden. Zudem wies die Stimulation mit Butyrat keine additiven Effekte auf die mitochondriale Atmung in Caco-2^{ΔHk2}-Zellen auf. Somit führt Butyrat zu einer vergleichbaren Reduktion der mitochondrialen Atmung wie der Verlust von HK2, was zu einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit gegenüber mitochondrialem Zelltod führt.

Die Behandlung mit Acetat führte hingegen zu einer leichten Verschlechterung des Krankheitsverlaufs, was sich durch einen einmaligen signifikanten Unterschied im Körpergewicht am siebten Tag im Vergleich zu unbehandelten *Hk2*^{ΔIEC}-Mäusen

manifestierte. Trotzdem zeigten sich Trends, wenn auch statistisch nicht signifikant, für eine gesteigerte Krankheitsaktivität, vermehrte proinflammatorische Zytokine, sowie erhöhten Zelltod und verstärkte histologische Krankheitsaktivität. Daraus ergibt sich, dass der schädliche Effekt von Acetat in *Hk2^{ΔIEC}*-Mäusen zwar im Vergleich zum Effekt in WT-Mäusen erheblich abgeschwächt ist, jedoch nach wie vor vorhanden ist. Daraus kann geschlossen werden, dass der schädliche Effekt von Acetat nur teilweise über HK2 vermittelt wird.

4.4 Limitationen der Studie

Im Folgenden werden die Limitationen der angewandten Modelle diskutiert. Ein Großteil der Experimente wurde in Caco-2-Zellen durchgeführt. Ein Vorteil dieser Zelllinie liegt darin, dass sie bereits umfassend beschrieben und analysiert wurde [226]. Im Vergleich zu intestinalen Organoiden sind Caco-2-Zellen deutlich kostengünstiger in der Kultur, da sie weniger aufwendige Medien, extrazelluläre Matrizen und Zusätze wie Wachstumsfaktoren benötigen. Darüber hinaus sind Caco-2-Zellen technisch einfacher zu kultivieren und daher in ihrer Handhabung unabhängiger von der Erfahrung des Untersuchers im Vergleich zur Kultur von Primärzellen [168, 227]. Ein Nachteil dieser Methode liegt jedoch in der Herkunft der Zelllinie. Diese wurde aus humanen Darmkrebszellen abgeleitet und zeigt daher charakteristische Eigenschaften wie Veränderungen im Metabolismus oder der Differenzierung [226]. Zudem haben Stimulanzien unterschiedliche Auswirkungen auf verschiedene Zellen. Beispielsweise kann Butyrat die Proliferation von normalen Enterozyten induzieren, unterdrückt jedoch die Proliferation von karzinogenen Enterozyten. Im Gegensatz zu den normalen Enterozyten, die Butyrat als Hauptenergiequelle nutzen, akkumuliert Butyrat in kanzerogenen Enterozyten, da diese ihre Energie hauptsächlich aus Glucose beziehen. Dies resultiert in einer starken Regulation der HDACs, was zu einer Inhibition der Proliferation von kanzerogenen Enterozyten führt. [228]. Die Wirkung und der Effekt von Butyrat unterscheiden sich je nach Differenzierungsgrad der Caco-2-Zellen [229]. Obwohl sich Caco-2-Zellen für Experimente eignen, wäre es ideal, die Ergebnisse in anderen Zelllinien, wie HT29 Zellen, Primärzellen oder *in vivo* zu reproduzieren, um zell- oder krebszellspezifische Effekte auszuschließen.

Organoide revolutionierten die wissenschaftliche Forschung, seit *Sato et al. 2009* erstmals beschrieben, dass sich Organoide aus adulten Stammzellen kultivieren

lassen [167]. Wie bereits erwähnt, sind ihre Isolation und Kultur sowohl kostenintensiv als auch technisch anspruchsvoll. Zu den Vorteilen zählen unter anderem die Kultur von Primärzellen anstelle von karzinogenen Zelllinien, die Möglichkeit der Gewinnung biologischer Replikate aus verschiedenen Organismen, die Kultivierung sowohl humaner als auch muriner Organoide, die simultane Kultur verschiedener Zelltypen in einer Zusammensetzung, die der physiologischen Umgebung nahek kommt, sowie die Gewinnung von Organoiden aus erkrankten Organismen oder erkranktem Gewebe. Dennoch spiegeln auch Organoide nicht die *in vivo* Bedingungen wider, die im Darm durch ein komplexes Zusammenspiel von Mikrobiom, Epithel- und Immunzellen geprägt sind [11, 230, 231]. Die Rolle von Organoiden und ihre Limitationen werden derzeit intensiv in der wissenschaftlichen Gemeinschaft diskutiert [232, 233]. Viele dieser Limitationen werden bereits angegangen, beispielsweise durch die Kokultur verschiedener Zellarten [234] und anaerober Mikroorganismen [235], sowie durch die gezielte Differenzierung in spezifische Zelltypen [236], was auch die Erforschung seltener Zellpopulationen ermöglicht. Die aktuelle Beliebtheit der Organoid-Kultur könnte zu einer übereilten Verwendung in der Wissenschaft führen und sollte aufgrund der hohen Kosten sowie weiteren Limitierungen eher in Validierungsexperimenten und nicht als initiales Modell verwendet werden. Ein Beispiel für Diskrepanzen zwischen *in vitro*- und *ex vivo*-Modellen zeigt sich auch in dieser Arbeit [237]. In Caco-2^{ΔHK2} und in mit Butyrat stimulierte Caco-2^{WT}-Zellen zeigte sich eine starke Reduktion der mitochondrialen Funktion. Passend dazu war in intestinalen Epithelzellen von Hk2^{ΔIEC}-Mäusen unter Entzündung ein verminderter mitochondrialer Metabolismus und verminderte mitochondriale Permeabilität im Transkriptom festzustellen. Im Gegensatz dazu blieb die mitochondriale Funktion in Hk2^{ΔIEC}-Organoiden aus dem Colon unverändert. Diese Diskrepanz könnte aus einer unterschiedlichen Exposition gegenüber den Stimulanzen resultieren. Bei Caco-2-Zellen interagieren die Stimulanzen mit der apikalen Seite, während die Zellen aus Organoiden basal stimuliert wurden. Aufgrund der Kultur von Matrigel wird weiterhin die Diffusion der genutzten Stimulanzen beeinflusst. Eine weitere mögliche Erklärung könnte der Mangel an mikrobieller Präsenz sein, welche HK2 massiv induziert (1.4.1). Bei dem *ex vivo* Modell der Organoide handelt es sich um eine sterile Kultur von intestinalem Epithel, welches vergleichbar mit keimfreien Mäusen ist. Weitere Experimente mit mikrobieller Kokultur oder differenzierten Enterozyten-Organoiden sollten in Zukunft Aufschluss über dieses Phänomen geben können. Eine weitere Erklärung für das

Ausbleiben einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen Atmung könnte die Tatsache sein, dass nur ein biologisches Replikat für diesen Versuch verwendet wurden. Dies ist von besonderer Bedeutung für das Modell der Organoide, da epigenetisches Imprinting auch nach Isolation und mehreren Passagen erhalten bleibt und so Faktoren wie das Alter eine immense Rolle spielen können [238].

Tiermodelle wie das verwendete Mausmodell bieten sowohl verschiedene Vor- als auch Nachteile. Ein bedeutender Vorteil liegt darin, dass es möglich ist, einen kompletten Organismus inklusive all seiner Organsysteme und Wechselwirkungen zu untersuchen. Es ermöglicht gezielte lokale Veränderungen, wie die Deletion von HK2 spezifisch im intestinalen Epithel zu induzieren. Dadurch lassen sich die Auswirkungen auf das gesamte Körpersystem unter verschiedenen Einflüssen, wie entzündlichen Erkrankungen oder mikrobieller Regulationen, untersuchen. Obwohl Mausexperimente unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, gibt es bedeutsame Unterschiede. Selbst in unterschiedlichen Tierhaltungen Deutschlands variiert das Mikrobiom der C57BL/6J Mauslinie [239], was die Reproduzierbarkeit erhobener Daten erschwert [240]. Zudem stellt sich die Frage, inwieweit die in dieser Arbeit gewählten Krankheitsmodelle, wie die DSS-Colitis, vergleichbar sind, da der Verlauf von verschiedenen Faktoren wie dem Molekulargewicht und der Charge abhängig ist und selbst Mauslinien, die aus demselben C57BL6/J-Mausstamm generiert wurden, eine unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber DSS zeigen [1, 96, 241]. Obwohl nahezu alle neuen Medikamente auf präklinischen Tierversuchen beruhen, muss erwähnt werden, dass viele Erkenntnisse aus Tierversuchen nicht immer direkt auf den Menschen übertragbar sind. Selbstverständlich spiegeln auch Tiermodelle von CED nicht vollständig die humane Pathophysiologie wider und können daher nicht direkt auf den Menschen übertragen werden [152]. Darüber hinaus ist das Tierwohl ein wichtiger ethischer Aspekt, den es als entscheidenden Nachteil gegen Tierversuche zu beachten gilt. Die Alternative präklinische Studien direkt in Menschen durchzuführen, wird jedoch allgemein hin als nicht ethisch vertretbar betrachtet. Mausexperimente ermöglichen das Studium komplexer Mechanismen, die *in vitro* und *ex vivo* nicht möglich wären. Es ist jedoch wichtig zu bedenken, dass auch dieses Modell Limitationen hat und Fragestellungen im Sinne des Tierwohls sorgfältig abgewogen werden müssen. Aufgrund der Komplexität der Mechanismen und der verschiedenen

regulatorischen Kreisläufe dieser Studie, war jedoch der Einsatz von Tierversuchen unabdinglich.

4.5 Infektion, Entzündung, Tumor – One Size fits all?

Gene und Proteine können abhängig vom Organ und der Erkrankung pleiotrope Effekte entfalten. Ein Beispiel hierfür ist TNF, das als einer der treibenden Faktoren entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen bekannt ist [242]. Gleichzeitig ist TNF jedoch essenziell für die körpereigene antiinfektive Abwehr gegen Tuberkulose und andere Erreger [243, 244]. Des weiteren spielt TNF eine Rolle bei der Induktion von Tumornekrose und hemmt dadurch unter anderem Tumorerkrankungen [245, 246]. Eine systemische Therapie mit Antikörpern gegen TNF ist für verschiedene inflammatorische Erkrankungen zugelassen, darunter CED, verschiedene rheumatische und entzündliche dermatologische Erkrankungen [113, 114, 247]. Obwohl sie in diesen Erkrankungen oft eine Remission induzieren und aufrechterhalten können, kann sie auch schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen, wie beispielsweise die Reaktivierung einer Tuberkulose [248]. Der anfängliche Verdacht eines erhöhten Risikos für maligne Erkrankungen durch eine solche Therapie konnte bisher nicht bestätigt werden [249, 250].

Auch für HK2 sind pleiotrope Effekte beschrieben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust von HK2 im intestinalen Epithel zu einer verminderten Anfälligkeit für Zelltod unter Entzündung führt. Im Gegensatz dazu führt der Verlust von HK2 in hepatozellulären Tumor-Zelllinien zu einer Induktion von Zelltod [251]. Antiapoptotische Effekte durch HK2 konnten auch in anderen *in vitro* Modellen nachgewiesen werden [252, 253]. In *in vivo* Modellen für Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome und Brustkrebs führte die Depletion von HK2 zu keiner Veränderung des Zelltods. Hier zeigte sich jedoch ein Einfluss auf die Tumorentstehung und -erhaltung [144]. Die Induktion oder Inhibition apoptotischer Prozesse durch HK2 ist sehr heterogen verteilt je nach Zelltyp und pathologischer Veränderung. Dieses Phänomen kann auf eine Vielzahl potenzieller Gründe zurückzuführen sein. HK2 ist für viele maligne entartete Zellen essenziell für den Energiehaushalt, um über den Warburg-Effekt ausreichend Energie für den hochregulierten Stoffwechsel bereitzustellen [254, 255]. Gleichzeitig ist es in vielen Tumorentitäten höher exprimiert [143]. Für die pro- oder anti-apoptotischen Effekte von HK2 ist insbesondere die Bindung an die mitochondriale Membran von Bedeutung. Die Dissoziation von HK2

von der mitochondrialen Membran führt im *in-vitro*-Leukämie-Modell zu einer massiven Induktion von Zelltod [256]. Eine solche Ablösung von der mitochondrialen Membran resultiert wiederum in einer Destabilisierung des MPTP, was mit einem verstärkten Ausstrom proapoptotischer Signalstoffe aus der mitochondrialen Matrix einhergeht [257]. Diese Dissoziation kann durch bakterielle Zellwandbestandteile, mutmaßlich mikrobielle Metabolite, bestimmte Arzneimittel und andere Moleküle induziert werden [1, 145, 257]. Eine Depletion von HK2 in Zelllinien oder Mausmodellen oder eine langanhaltende Reduktion von HK2, wie sie durch Butyrat induziert wird, kann daher nicht bzw. nur in deutlich vermindertem Maße zu einer Ablösung von HK2 führen. Im Umkehrschluss kann es in Zellen, die besonders viel *HK2* exprimieren, zu einer erheblich größeren Dissoziation kommen. Dieser Effekt könnte zu einer starken Depolarisation der mitochondrialen Membran und MPTP-Öffnung führen, was wiederum zu vermehrtem Zelltod führen könnte. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die MPTP-Öffnung und die Zelltod-Suszeptibilität durch die Dissoziation von HK2 im gleichen Modell bei vermehrter und verminderter Expression zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Einfluss der anderen HK-Isoformen (HK1, HK3, HK4, HKDC1) auf die Stabilisation der mitochondrialen Membran/MPTP in Abwesenheit von HK2 untersucht werden, um mögliche kompensatorische oder additive Mechanismen aufzudecken.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass HK2 im intestinale Epithel durch das intestinale Mikrobiom und seine Metabolite reguliert wird. Zudem gibt es weitere Studien, die eine Korrelation zwischen HK2 und infektiösen Erregern beschreiben. Die Expression von *HK2* in Hepatozyten steigt beispielsweise durch das Hepatitis C Virus an [258]. Auch wurden enge Interaktionen mit anderen Erregern beschrieben [145, 259-261]. Die Arbeitsgruppe um *Wolf et al.* konnte nachweisen, dass HK2 in der Lage ist, in Makrophagen bakterielle Zellwandbestandteile zu erkennen und durch eine Dissoziation das Inflammasom zu aktivieren, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird [145]. Im Vergleich zur Dissoziation im Zusammenhang mit Zelltod deutet sich hier eine andere Funktion an [155]. Es gibt vermehrte Hinweise darauf, dass HK2 eine bedeutende Rolle in Infektionen spielen könnte. Die Präsenz von HK2 scheint dabei von Relevanz zu sein, da sie eine Immunabwehr induzieren kann. Daher sollte der Einfluss von HK2, einschließlich seiner Depletion und Überexpression, in Infektionsmodellen näher untersucht werden. Das *Citrobacter rodentium* Modell könnte sich beispielsweise hierfür eignen, da es eine intestinale Entzündung in Form

einer Colitis induziert [262]. In diesem Modell ließe sich direkt die Rolle von HK2 im intestinalen Epithel durch die Verwendung von *Hk2^{ΔIEC}*-Mäusen untersuchen.

Im Vergleich zur Rolle von HK2 in Infektionen gibt es bereits umfassendere Daten bezüglich der Verbindung von HK2 und Entzündung. HK2 ist in CED, infektiöser Colitis und darüber hinaus auch in anderen entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis [263, 264], entzündlichen neurologischen Prozessen [265, 266] und Psoriasis [267] erhöht. Eine wichtige Frage ist hierbei, ob HK2 spezifisch an diesen Krankheitsprozessen beteiligt ist oder im Rahmen der Entzündung als solche vermehrt exprimiert wird. Dies ist insbesondere entscheidend, um zu verstehen, ob HK2 als Ziel einer spezifischen Therapie in diesen Erkrankungen erforscht werden kann oder eher als breites anti-inflammatorisches Ziel betrachtet werden sollte. In diesen Erkrankungen wird der Verlust von HK2 als positiv für den Krankheitsverlauf bewertet [1, 264, 267].

Zudem liegt in der Entzündung ein besonderer Fokus auf der mitochondrialen Bindung von HK2 [1, 264]. Zusammenfassend zeigt sich, dass HK2 sowohl in Tumorerkrankungen, Infektionen als auch in Entzündungen eine bedeutende Rolle spielt. In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien durchgeführt, die sich mit der Rolle von HK2 in diesem Themengebiet auseinandersetzen. Es zeigen sich pleiotrope Funktionen von HK2 in den genannten Pathologien. Eine pauschale Inhibition oder Induktion von HK2 lässt sich daher weder als positiv noch negativ bewerten. Allerdings ist tendenziell eine prokanzeröse und proinflammatorische Genese beschrieben.

Ein übergreifendes Thema dieser Studien ist, dass insbesondere die Lokalisation von HK2 eine entscheidende Rolle für dessen Funktion spielt. Wenn HK2 an der äußeren mitochondrialen Membran sitzt, stabilisiert es diese. Im Gegensatz dazu führt eine Dissoziation von HK2 zu einer Destabilisierung der mitochondrialen Membran und infolgedessen zur Schädigung der Zelle. In diesem Zusammenhang sollte die Rolle der anderen Hexokinasen auf das Membranpotenzial untersucht werden, um zu unterscheiden, ob es sich um einen HK2-spezifischen Effekt handelt oder um einen Effekt, der für alle Hexokinasen gilt. Obwohl Gemeinsamkeiten über verschiedene Pathologien hinweg zu finden sind, sollte beachtet werden, dass diese nicht pauschal für jedes Gewebe und jede Pathologie gelten. Letztendlich lässt sich jedoch zeigen, dass die Funktion von HK2 weit über seine glykolytische Funktion hinausgeht.

4.6 Zeitalter der gezielten Mikrobiom-Therapie ?

Die Gruppe der biologischen Therapeutika hat die Medizin des 21. Jahrhunderts revolutioniert. Seit 1994 wurden insgesamt 198 solcher Therapeutika von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen, allein 17 davon im Jahr 2023 [268]. Im Gegensatz dazu gibt es bisher nur wenige genehmigte mikrobielle Therapeutika von der FDA. Bis einschließlich des Jahres 2019 gab es kein einziges zugelassenes lebendiges mikrobielles Therapeutikum [269]. Erst im Jahr 2022 und 2023 wurden die ersten beiden Medikamente, die das Mikrobiom behandeln, von der FDA genehmigt [270-272]. Damit wurde die Ära einer gezielten Mikrobiom-Therapie eingeleitet. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass für nahezu alle Erkrankungen eine enge Korrelation zum Mikrobiom beschrieben ist und zahlreiche Studien gezeigt haben, dass eine mikrobielle Therapie wirksam sein kann [21]. Beispielsweise wurde eine Korrelation zwischen Bluthochdruck und dem Mikrobiom beschrieben [273]. Weitere Analysen dieser Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Salzaufnahme die Zusammensetzung des Mikrobioms verändert und dadurch immunregulatorische Veränderungen induziert, die wiederum den Bluthochdruck beeinflussen [274]. Auch für die in dieser Arbeit verwendeten mikrobiellen Metabolite (Kurzkettenige Fettsäuren) sind blutdruckregulierende Eigenschaften beschrieben [275]. Ähnliche Ansätze finden neben CED Anwendung in vielen weiteren Erkrankungen, darunter Morbus Parkinson [276, 277] Morbus Alzheimer [278], Depression [279], *Clostridioides difficile* Infektionen [224, 280], Leberzirrhose [281], Asthma [282], Typ 1 Diabetes [77] und Typ 2 Diabetes [78]. In den letzten Jahren hat sich das Wissen über die Rolle des Mikrobioms in verschiedenen Erkrankungen beträchtlich erweitert und es wurden therapeutische Ansätze zur gezielten Beeinflussung des Mikrobioms entwickelt. Eine Möglichkeit der mikrobiellen Therapie ist die sogenannte fäkale Mikrobiom-Transplantation (FMT). Bis zum Jahr 2022 wurden bereits über 100 Fallberichte über FMT veröffentlicht [21]. Jedoch ist zu beachten, dass FMT auch schwerwiegende Nebenwirkungen bis hin zu einem tödlichen Ausgang haben kann. Die meisten der wenigen letalen Ausgänge sind auf Komplikationen im Zusammenhang mit dem Applikationsverfahren von FMT zurückzuführen [283]. Es gibt auch Berichte über Fälle, bei denen Patienten durch die Transplantation von multiresistenten Erregern innerhalb der FMT schwer erkrankten oder verstarben [284]. Daher sollte die Anwendung von FMT kritisch betrachtet werden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die exakte Zusammensetzung der transplantierten Mikrobiota

nicht bekannt ist und somit potenzielle nichtbeabsichtigte Wechselwirkungen zwischen Wirt und Mikroben verursacht werden. Dies gewinnt noch mehr an Bedeutung, wenn man die Auswirkungen von Mikroben auf die mögliche Ätiologie verschiedenster Erkrankungen berücksichtigt, wie bereits zuvor beschrieben. Insbesondere, da durch FMT langanhaltende Veränderungen des Mikrobioms induziert werden [285]. Gleichzeitig erfolgt nicht nur die Übertragung von Bakterien, sondern auch von Pilzen, Viren und Bakteriophagen. Über deren Einfluss auf den Wirt und Erkrankungen sowie darüber, inwieweit sich Krankheiten auf diese Weise übertragen können, ist nur wenig bekannt [286, 287]. Gleichzeitig hat sich FMT als wirksame Therapieoption erwiesen und könnte zur einer verringerten Suszeptibilität des Mikrobioms gegenüber intestinale Erkrankungen führen [288]. Es sind aber noch viele Aspekte nicht gänzlich verstanden. Es ist wichtig zu betonen, dass eine FMT nicht zwangsläufig erforderlich ist, um die gewünschten Effekte zu erzielen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zwar das Mikrobiom HK2 induziert, die Effekte jedoch auf spezifischen Bestandteilen des Mikrobioms beruhen. Daher ist eine FMT nicht unbedingt erforderlich, um HK2 zu regulieren. Ein alternativer Ansatz besteht in der direkten Supplementation einzelner Mikroben oder weniger, kontrollierter Mikroben. Dies ermöglicht eine genauere Abschätzung bestimmter Interaktionen, da es sich in der Regel um klar definierte Spezies handelt. In diesem Bereich haben bereits die ersten Therapeutika die Zulassung erhalten [270-272]. Interessante Arbeiten zeigen beispielsweise, dass sich durch die Supplementation von Bakterien, die kurzkettige Fettsäuren produzieren, die Level an kurzkettigen Fettsäuren erhöhen lassen [101] und sich durch die Transplantation bestimmter *Clostridiales* Spezies sogar Tumore behandeln lassen [289]. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Supplementation bestimmter Butyrat-produzierender Bakterien die Effektivität von Immuntherapeutika wie Nivolumab erhöhen kann [290]. Im Gegensatz zur direkten Supplementierung von kurzkettigen Fettsäuren bieten FMT und die Transplantation bestimmter definierter Mikroben den Vorteil, langanhaltende Veränderungen im Mikrobiom und somit auch langfristige Auswirkungen auf Erkrankungen zu induzieren [291]. Dadurch entfällt die Notwendigkeit einer regelmäßigen Gabe, wie sie beispielsweise im Rahmen dieser Arbeit durch kurzkettige Fettsäuren erfolgte. In weiterführenden Arbeiten sollte daher untersucht werden, inwiefern Bakterien, die kurzkettige Fettsäuren produzieren, in der Lage sind, HK2 zu regulieren, wie langanhaltend diese Veränderungen sind, in welchen Intervallen mögliche Auffrischungsbeimpfungen erfolgen müssten und ob

eine Supplementation ausreichend für einen therapeutischen Effekt ist. In der Regel handelt es sich dabei um semipermanente Veränderungen des Wirt-Mikrobioms, bei denen zumindest bei Patienten ohne Komplikationen ein Großteil der Spender-Mikrobenspezies noch mehrere Jahre nachweisbar ist [292, 293]. Verschiedene Faktoren beeinflussen den Erfolg von FMT, darunter die Behandlung mit Antiinfektiva. Sowohl eine antiinfektive Therapie vor als auch nach der Transplantation verschlechtert die Effektivität der FMT [294, 295]. Daher stellt sich die Frage, inwieweit eine FMT oder spezifische Spenderspezies im klinischen Alltag in der Lage wären, langfristige Therapieerfolge zu gewährleisten. Obwohl Erfolge zu verzeichnen sind, bedarf es definitiv weiterer klinischer Studien, insbesondere zur Standardisierung und Patientensicherheit. Um HK2 gezielt zu modulieren und dadurch intestinale Entzündungen zu beeinflussen, scheint die direkte Supplementation von Butyrat-produzierenden Spezies eher geeignet zu sein. Dennoch sollte aufgrund der proinflammatorischen Effekte von Acetat eine genaue Differenzierung in Bezug auf die Produktion verschiedener kurzkettiger Fettsäuren dieser Bakterien erfolgen. Besonders interessant wäre eine mikrobielle Therapie, die die Butyratproduktion induziert und gleichzeitig die Acetatproduktion hemmt.

Eine noch spezifischere Herangehensweise bietet die direkte Therapie mit kurzkettigen Fettsäuren. Diese Form der Intervention wird auch als Postbiotika bezeichnet, und in vorangegangenen Studien konnten bereits protektive Effekte nachgewiesen werden [125, 275, 296-300]. Wie zuvor erläutert, erscheint eine direkte Supplementierung von Butyrat im Modell der Colitis wenig sinnvoll, da lediglich systemische Effekte induziert werden können. Dies resultiert aus der nahezu vollständigen Resorption von Butyrat noch vor Erreichen des Colons [183, 212, 216]. Daher ist es nicht überraschend, dass eine direkte Zugabe von Butyrat keinen Einfluss auf eine DSS-Colitis ausübt [301]. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten gezeigt werden, dass durch die orale Supplementation von Tributyrin im Colon eine erfolgreiche Modulation von HK2 erreicht werden kann, die für einen therapeutischen Effekt ausreicht. Es wäre sicherlich sinnvoll, mittels Targeted Metabolomics die lokale Butyrat-Konzentration zu bestimmen, um einen präzisen Zielbereich zu berechnen und somit die Tributyrin-Dosis auf das erforderliche Minimum zu reduzieren. Die direkte Therapie mit Butyrat könnte zudem aufgrund möglicher geringer Patienten-Compliance problematisch sein, da dieser Stoff einen starken Geruch und Geschmack aufweist [302]. Hier hingegen zeigt sich eine erheblich mildere olfaktorische Belastung

durch Tributyrin [303]. Alternativ könnte eine wirksame Anwendung durch die direkte rektale Applikation von Butyrat mittels Klistier erfolgen, welches eine gute Wirksamkeit zeigt [304, 305]. Allerdings geht die rektale Applikation von Medikamenten in der Regel mit einer schlechten Therapieeinhaltung durch die Patienten einher [306], weshalb eine orale Applikation, beispielsweise durch eine geruchsneutrale Medikamentenkapsel, bevorzugt werden sollte. Die Freisetzung von Butyrat im Colon birgt den Vorteil eines größtenteils lokalen Effekts, da Butyrat als vorrangige Energiequelle der Enterozyten bereits in erheblichem Maße metabolisiert wird und zu 98 % einer splanchnischen Extraktion unterliegt, während lediglich 2 % im Serum nachweisbar sind [55].

Eine weitere Interventionsmöglichkeit ist der Einsatz von Präbiotika wie resistente Stärke. Diese kann im Gegensatz zu normaler Stärke nicht durch die Verdauungsenzyme des oberen Gastrointestinaltraktes verstoffwechselt werden und wird erst durch das Mikrobiom des Colons metabolisiert. Die Bereitstellung von mehr Substrat führt konsekutiv zu einer Erhöhung der Synthese von kurzkettigen Fettsäuren durch das Mikrobiom. Dabei fällt insbesondere Butyrat an. Die Endprodukte der supplementierten resistenten Stärke sind jedoch abhängig von deren Ursprungsquelle. [307]. In Metastudien zeigt sich ein potenzieller protektiver Effekt in CED. Es sind dennoch weitere Studien notwendig, um die Effekte von resistenter Stärke auf intestinale Entzündung näher zu beschreiben [308].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass weiterführende Forschung im Bereich mikrobieller Therapeutika notwendig ist. Diese stellen jedoch ein faszinierendes neues Forschungsfeld dar, innerhalb dessen die breite Anwendung durch FMT, die Substitution oder Unterstützung spezifischer Bestandteile des Mikrobioms sowie die direkte Substitution von bakteriellen Metaboliten eine bedeutende Rolle spielen können. In diesem Zusammenhang ist auch die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da sie aufzeigt, dass HK2 durch mikrobielle Modulation gezielt durch die kurzkettigen Fettsäuren beeinflusst werden kann und dadurch der Verlauf einer intestinalen Entzündung verändert werden kann.

4.7 Zukunftsvision – HK2 als Biomarker und therapeutisches Ziel.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie ermöglichen unterschiedliche Schlussfolgerungen hinsichtlich der weiteren Rolle von HK2. Angesichts der Tatsache, dass HK2 im Darmepithel unter entzündlichen Bedingungen sowohl in CED als auch in murinen *in vivo*- und *ex vivo*-Modellen sowie *in vitro* erhöht ist, drängt sich die Frage

auf, ob HK2 als potenzieller Biomarker für Krankheitsaktivität dienen könnte. Dies wird durch die Erkenntnis gestützt, dass HK2 im entzündeten Darmgewebe im Vergleich zum nichtentzündeten Gewebe derselben Patienten erhöht ist. Somit könnte HK2 in erster Linie als Indikator für intestinale Entzündungsaktivität fungieren. Aufgrund der differenziellen Verteilung von HK2 im intestinalen Epithel, insbesondere in den apikalen Epithelverbänden, könnte eine Immunhistochemie von HK2 bspw. als zusätzliches Beurteilungskriterium für die Entzündungsaktivität dienen. Alternativ könnte auch eine qPCR oder ein Nachweis von HK2-Protein aus dem Gewebe in Betracht gezogen werden. Eine Bestimmung aus einer Blutentnahme wäre wohl weniger zielführend, da es sich um einen epithelspezifischen Effekt handelt. Die Stärken des spezifischen Epitheleffekts sind gleichzeitig seine Schwächen. Es stellt sich die Frage, inwiefern HK2 als Biomarker über alle Krankheitsstadien von CED anwendbar wäre. Die untersuchten Effekte beziehen sich auf ein murines Colitis-Modell, wobei das menschliche Pendant die Colitis Ulcerosa ist. Diese Erkrankung zeichnet sich, wie der Name bereits sagt, durch mikroskopische und makroskopische Ulzerationen aus [309, 310]. Auch die histologische Beurteilung der Krankheitsaktivität in fortgeschrittenen Stadien der Colitis Ulcerosa erfolgt im Wesentlichen durch Ulzerationen [311, 312]. Bei einer solchen Ulzeration erfolgt die Deletion des Epithels, einschließlich der HK2-positiven apikalen Epithelverbände. Dieses Problem wurde auch in der histologischen Analyse der Acetat-behandelten Mäuse mit WT-Genotyp festgestellt, die trotz erheblicher Krankheitsaktivität keine erhöhten HK2-Level aufwies. Insbesondere in den milderen Krankheitsstadien der Colitis Ulcerosa, die histologisch schwerer zu beurteilen sind und zusätzliche Kriterien erfordern, könnte die Anwendung einer immunhistochemischen HK2-Färbung jedoch als ergänzender Biomarker dienen, der eine detaillierte Differenzierung ermöglicht [313]. Die Verwendung von HK2 als Biomarker wäre daher insbesondere für entzündliche Erkrankungen des Colons relevant. Es bedarf jedoch weiterer Studien an humanen Proben aus Colitiden unterschiedlicher Ätiologie, um zu klären, ob HK2 ausschließlich für Colitis Ulcerosa oder auch für andere Colitiden anwendbar ist. Bisher noch unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von PD. Felix Sommer zeigen, dass epitheliales HK2 tatsächlich als Biomarker für Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa geeignet sein könnte. Angesichts der Tatsache, dass *HK2* auch in anderen entzündlichen Erkrankungen vermehrt exprimiert wird, wie beispielsweise bei primär sklerosierender Cholangitis, Morbus Crohn, infektiöser Colitis oder rheumatoider Arthritis, könnte HK2 auch als potenzieller

Biomarker für verschiedene entzündliche Erkrankungen dienen [314] [1]. In diesem Kontext sollte untersucht werden, ob die *HK2*-Expression in weiteren entzündlichen Erkrankungen erhöht ist und insbesondere in welchen Zelltypen. Nach einer solchen Analyse sollte evaluiert werden, inwiefern *HK2* als paninflammatorischer oder spezifischer Biomarker verwendet werden könnte.

In diesem Kontext ist es von Bedeutung, die Rolle von Butyrat als prädiktivem Biomarker genauer zu untersuchen, da bereits beschrieben wurde, dass ein reduziertes Butyrat-Level im Stuhl mit einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert ist [302, 315]. Es ist jedoch anzumerken, dass einige Studien darauf hinzuweisen scheinen, dass diese Interaktion möglicherweise komplexer ist und nicht direkt mit der Butyrat-Konzentration zusammenhängt, sondern auch mit der epithelialen Metabolisierung unter inflammatorischen Bedingungen [316]. Trotzdem konnten umfangreiche Studien zeigen, dass eine Dysbiose in CED zu einer Reduktion der Butyrat-produzierenden Bakterien und zu niedrigeren Butyrat-Leveln führt [102]. In diesem Zusammenhang stellt sich eine weitere Frage, die im Rahmen dieser Studie auftrat. In allen translational gewählten Modellen dieser Arbeit wurde eine Therapie mit Butyrat vor der Induktion eines inflammatorischen Reizes eingeleitet. Dieser Ansatz (48 Stunden *in vitro* und *ex vivo*; 10 Tage *in vivo*) wurde gewählt, um die genregulatorischen Effekte von Butyrat wirken zu lassen und somit eine Reduktion von *HK2* zu erreichen. Daraus lässt sich ableiten, dass Butyrat möglicherweise einen erfolgreichen präventiven Therapieansatz darstellt. Es bleibt jedoch zu klären, inwiefern Butyrat therapeutisch wirksam ist, wenn es unter akuten Entzündungsbedingungen eingesetzt wird. Trotz einer milderen Krankheitsentwicklung führte Butyrat nicht zum vollständigen Ausbleiben der Krankheit. Daher sollten weitere murine Colitis-Modelle auf ihre Reaktion auf eine Butyrat-Therapie untersucht werden. Aufgrund des durch DSS-induzierten schweren chemischen Epithelschadens ist jedoch nicht zwingend mit einem kompletten Ausbleiben der Krankheit zu rechnen. Diese Studien sind von essenzieller Bedeutung, um abschließend zu beurteilen, ob es sich bei Butyrat um eine präventive Therapie im Sinne einer Prophylaxe handelt oder um ein vollwertiges Therapeutikum bzw. lediglich eine Zusatztherapie. Falls es sich lediglich um einen Zusatzeffekt handelt, der eine Applikation vor einem Krankheitsschub erforderlich macht, könnte die Ergänzung/Induktion von Butyrat-produzierenden Bakterien eine sinnvolle

Therapieoption darstellen, um während entzündungsfreier Intervalle die Remission aufrechtzuerhalten.

Basierend auf der Literatur und den Ergebnissen dieser Studie eröffnen sich zahlreiche Ansatzpunkte für die therapeutische Nutzung von HK2. Einer dieser Ansätze, wie zuvor erläutert, könnte die direkte Substitution von Butyrat bzw. Butyrat-Polymeren sein, ebenso wie die Substitution oder Induktion von Butyrat-produzierenden Bakterien. Dies bietet zweifellos den Vorteil einer lokalen Therapie ohne potenzielle systemische Nebenwirkungen. Im Gegenteil scheint Butyrat positive Auswirkungen auf verschiedene Bereiche des Körpers zu haben, sodass eher von additiven positiven Effekten auszugehen wäre [55, 224, 275, 296-298, 302, 305].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz könnte die direkte Modulation von HDAC8 sein, welches auch als attraktives Ziel für die Therapie maligner Neoplasien, Schistosomiasis und das Cornelia de Lange Syndrom betrachtet wird [317]. Bereits zugelassene HDAC-Inhibitoren wie Romidepsin (HDAC-Klasse 1), Vorinostat (Pan-HDAC), Panobinostat (Pan-HDAC) und Belinostat (Pan-HDAC) könnten potenziell relevant sein [318, 319]. Insbesondere sollte der Einfluss von Romidepsin als Klasse-1-Inhibitor in Bezug auf intestinale Entzündung genauer untersucht werden. Über eine Induktion von HDACs gibt es in der Literatur zwar keine direkten Informationen, jedoch gibt es Studien, die beschreiben, dass HDACs über ihre Phosphorylierung aktiviert und deaktiviert werden können [320]. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, die Interaktion zwischen Butyrat und HDAC8 genauer zu analysieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Butyrat über HDAC8 signalisiert, da eine Inhibition von HDAC8, bzw. der HDAC-Klasse 1 und aller HDACs, die Regulation von HK2 verhinderte. Es bleibt jedoch zu klären, wie diese Interaktion genau funktioniert, insbesondere da über Butyrat beschrieben wurde, dass es ebenfalls als HDAC-Inhibitor fungiert [321]. Eine mögliche Hypothese könnte sein, dass die Bindung von Butyrat durch die Inhibition verhindert wird und sowohl der Inhibitor als auch Butyrat über HDAC8 wirken, jedoch unterschiedliche Downstream-Signalwege inhibieren bzw. aktivieren. Zum Beispiel katalysiert HDAC8 die Deacetylierung von Hypoxie-induziertem Faktor-1 alpha (HIF1 α) und stabilisiert dadurch die Proteinstabilität und Transkriptionsaktivität von HIF1 α [322]. HIF1 α wiederum ist ein bekannter Induktor von HK2 [323, 324]. Eine Inhibition von HDAC8 würde demnach zu einer Destabilisierung von HIF1 α und einer Repression von HK2 führen. In weiteren Studien sollten daher mögliche Downstream-Signalwege zwischen HDAC8 und HK2 untersucht werden, um den genauen

Signalweg zu identifizieren und weitere potenzielle therapeutische Angriffspunkte aufzudecken. Auch der exakte Mechanismus, über den Butyrat mit HDAC8 interagiert, sollte eingehend erforscht werden. Die mögliche Induktion von HDAC8 sollte mit kritischem Blick betrachtet werden, insbesondere im Hinblick auf ihr potenzielles prokanzerogenes Potential bei systemischer Applikation [317, 325]. Weitere Interventionsmöglichkeiten könnten in niedermolekularen Therapeutika liegen, die bereits in der Onkologie erforscht werden [221, 222]. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass im Gegensatz zur oralen Applikation von Butyrat, auch systemische Nebenwirkungen auftreten könnten.

Im Rahmen onkologischer Grunderkrankungen könnte ebenfalls ein Dissoziations-Induktor untersucht werden, da die Dissoziation von HK2 von der mitochondrialen Membran zu dessen Destabilisierung führt und somit zu einer Zelltodinduktion beitragen kann [156, 256, 257]. Dies ist besonders interessant, da die *HK2*-Expression in diesen Geweben erhöht ist, womit ein potenziell erheblicher therapeutischer Effekt erzielt werden könnte [143]. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass ein solcher Mechanismus bei systemischer Applikation auch zu einem massenhaften Zelltod im intestinalen Epithel führen könnte und somit das Potenzial birgt, eine schwere Colitis zu induzieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HK2 das Potenzial hat, als Biomarker in nicht-ulzerierender intestinaler Entzündung zu dienen und potenziell in weiteren inflammatorischen Erkrankungen. Es gibt zudem viele interessante Anwendungsmöglichkeiten als therapeutisches Ziel in verschiedenen Erkrankungen, wobei jedoch viele Fragen bislang ungeklärt bleiben und weitere Studien erforderlich sind. Aufgrund der anti-inflammatorischen und potenziell anti-kanzerogenen Eigenschaften stellt Butyrat ein attraktives Therapeutikum dar, dessen Potenz im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt wurde.

5 Zusammenfassung

Das intestinale Mikrobiom spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Hexokinase 2. Diese regulatorische Interaktion erfolgt durch die Metabolite des Mikrobioms, insbesondere die kurzkettigen Fettsäuren. Acetat induziert die Expression von Hexokinase 2 und trägt damit zu einem schwerwiegenderen Verlauf im murinen Colitis-Modell bei. Auf der anderen Seite bewirkt Butyrat eine Depletion von Hexokinase 2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Depletion führt zu einem deutlich milderen Krankheitsverlauf im murinen Colitis-Modell und reduziert die Anfälligkeit für Zelltod, sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*. Die Auswirkungen der Hexokinase 2-Depletion spiegeln sich in vergleichbaren Einschränkungen der mitochondrialen Funktion wider, wie sie auch durch den gänzlichen Verlust von Hexokinase 2 entstehen. Der Signalweg zwischen Hexokinase 2 und Butyrat wird maßgeblich durch die Histon-Deacetylase 8 vermittelt. Die beschriebenen Effekte der kurzkettigen Fettsäuren auf den Krankheitsverlauf zeigen eine klare Spezifität für Hexokinase 2 in intestinalen Epithelzellen, da sie keinen Einfluss auf die Krankheitsaktivität von Mäusen, denen Hexokinase 2 im intestinalen Epithel fehlt, haben. Die Vorarbeiten im Rahmen dieser Publikation legten nahe, dass der Verlust von Hexokinase 2 in intestinalen Epithelzellen zu einem protektiven, durch Mitochondrien vermittelten anti-inflammatorischen Phänotyp führt, was sich in einer verringerten Anfälligkeit für Zelltod manifestiert. In chronisch-entzündlichen Erkrankungen, darunter auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, ist die Hexokinase 2-Expression in intestinalen Epithelzellen signifikant erhöht. Diese Erkenntnisse in Betracht ziehend, lässt sich die Interaktion zwischen Hexokinase 2 und dem mikrobiellen Metabolit Butyrat als vielversprechender, neuartiger Therapieansatz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beschreiben.

6 Literaturverzeichnis

1. Hinrichsen, F., et al., *Microbial regulation of hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis*. Cell Metab, 2021. **33**(12): p. 2355-2366 e8.
2. Berg, G., et al., *Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges*. Microbiome, 2020. **8**(1): p. 103.
3. Morais, L.H., H.L.t. Schreiber, and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders*. Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(4): p. 241-255.
4. Hsu, C.L. and B. Schnabl, *The gut-liver axis and gut microbiota in health and liver disease*. Nat Rev Microbiol, 2023. **21**(11): p. 719-733.
5. Dang, A.T. and B.J. Marsland, *Microbes, metabolites, and the gut-lung axis*. Mucosal Immunol, 2019. **12**(4): p. 843-850.
6. de Jonge, N., et al., *The Gut Microbiome of 54 Mammalian Species*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 886252.
7. Dwiyanto, J., et al., *Ethnicity influences the gut microbiota of individuals sharing a geographical location: a cross-sectional study from a middle-income country*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 2618.
8. Shalon, D., et al., *Profiling the human intestinal environment under physiological conditions*. Nature, 2023. **617**(7961): p. 581-591.
9. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans*. Cell, 2016. **164**(3): p. 337-40.
10. Chen, L., et al., *Influence of the microbiome, diet and genetics on inter-individual variation in the human plasma metabolome*. Nat Med, 2022. **28**(11): p. 2333-2343.
11. Zheng, D., T. Liwinski, and E. Elinav, *Interaction between microbiota and immunity in health and disease*. Cell Res, 2020. **30**(6): p. 492-506.
12. Bestion, E., et al., *Climate warming reduces gut microbiota diversity in a vertebrate ectotherm*. Nat Ecol Evol, 2017. **1**(6): p. 161.
13. Bosco, N. and M. Noti, *The aging gut microbiome and its impact on host immunity*. Genes Immun, 2021. **22**(5-6): p. 289-303.
14. Baumler, A.J. and V. Sperandio, *Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 85-93.
15. Dicksved, J., et al., *Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease*. ISME J, 2008. **2**(7): p. 716-27.
16. Vilchez-Vargas, R., et al., *Gut microbial similarity in twins is driven by shared environment and aging*. EBioMedicine, 2022. **79**: p. 104011.
17. Mueller, N.T., et al., *The infant microbiome development: mom matters*. Trends Mol Med, 2015. **21**(2): p. 109-17.
18. Panwar, R.B., R.P. Sequeira, and T.B. Clarke, *Microbiota-mediated protection against antibiotic-resistant pathogens*. Genes Immun, 2021. **22**(5-6): p. 255-267.
19. Zheng, W., et al., *Microbiota-targeted maternal antibodies protect neonates from enteric infection*. Nature, 2020. **577**(7791): p. 543-548.
20. Gazzaniga, F.S. and D.L. Kasper, *Wild gut microbiota protects from disease*. Cell Res, 2018. **28**(2): p. 135-136.
21. Hou, K., et al., *Microbiota in health and diseases*. Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 135.

22. Clausen, M.R. and P.B. Mortensen, *Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis*. Gut, 1995. **37**(5): p. 684-9.
23. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
24. Valdes, A.M., et al., *Role of the gut microbiota in nutrition and health*. BMJ, 2018. **361**: p. k2179.
25. Yatsunenko, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-7.
26. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
27. Leviatan, S., et al., *An expanded reference map of the human gut microbiome reveals hundreds of previously unknown species*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 3863.
28. Gilbert, J.A., et al., *Current understanding of the human microbiome*. Nat Med, 2018. **24**(4): p. 392-400.
29. Rowland, I., et al., *Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components*. Eur J Nutr, 2018. **57**(1): p. 1-24.
30. Dekkers, K.F., et al., *An online atlas of human plasma metabolite signatures of gut microbiome composition*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 5370.
31. van der Beek, C.M., et al., *Hepatic Uptake of Rectally Administered Butyrate Prevents an Increase in Systemic Butyrate Concentrations in Humans*. J Nutr, 2015. **145**(9): p. 2019-24.
32. Kommineni, S., et al., *Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 719-22.
33. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
34. Weis, A.M. and J.L. Round, *Microbiota-antibody interactions that regulate gut homeostasis*. Cell Host Microbe, 2021. **29**(3): p. 334-346.
35. Borghammer, P., et al., *A postmortem study suggests a revision of the dual-hit hypothesis of Parkinson's disease*. NPJ Parkinsons Dis, 2022. **8**(1): p. 166.
36. Possemiers, S., et al., *The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals*. Fitoterapia, 2011. **82**(1): p. 53-66.
37. Baquero, F. and C. Nombela, *The microbiome as a human organ*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 4**: p. 2-4.
38. Riccio, P. and R. Rossano, *The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal*. FEBS Lett, 2020. **594**(20): p. 3262-3271.
39. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.
40. Singh, V.P., S.D. Proctor, and B.P. Willing, *Koch's postulates, microbial dysbiosis and inflammatory bowel disease*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(7): p. 594-9.
41. Pisani, A., et al., *Dysbiosis in the Gut Microbiota in Patients with Inflammatory Bowel Disease during Remission*. Microbiol Spectr, 2022. **10**(3): p. e0061622.
42. Sommer, F., et al., *The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease*. Nat Rev Microbiol, 2017. **15**(10): p. 630-638.
43. Davenport, E.R., et al., *The human microbiome in evolution*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 127.

44. Broussard, J.L. and S. Devkota, *The changing microbial landscape of Western society: Diet, dwellings and discordance*. Mol Metab, 2016. **5**(9): p. 737-42.
45. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
46. Shanahan, F., T.S. Ghosh, and P.W. O'Toole, *The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome?* Gastroenterology, 2021. **160**(2): p. 483-494.
47. Ghosh, T.S., F. Shanahan, and P.W. O'Toole, *Toward an improved definition of a healthy microbiome for healthy aging*. Nat Aging, 2022. **2**(11): p. 1054-1069.
48. Moffett, J.R., et al., *Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics, and Oncogenesis - Part 2: Acetate and ACSS2 in Health and Disease*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 580171.
49. Miller, T.L. and M.J. Wolin, *Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(5): p. 1589-92.
50. Flint, H.J., et al., *Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism*. Proc Nutr Soc, 2015. **74**(1): p. 13-22.
51. Cummings, J.H., et al., *Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood*. Gut, 1987. **28**(10): p. 1221-7.
52. Riviere, A., et al., *Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 979.
53. Van den Abbeele, P., et al., *Prebiotics, faecal transplants and microbial network units to stimulate biodiversity of the human gut microbiome*. Microb Biotechnol, 2013. **6**(4): p. 335-40.
54. Louis, P. and H.J. Flint, *Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **294**(1): p. 1-8.
55. Boets, E., et al., *Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study*. J Physiol, 2017. **595**(2): p. 541-555.
56. Peters, S.G., E.W. Pomare, and C.A. Fisher, *Portal and peripheral blood short chain fatty acid concentrations after caecal lactulose instillation at surgery*. Gut, 1992. **33**(9): p. 1249-52.
57. Brown, A.J., et al., *The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11312-9.
58. Le Poul, E., et al., *Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25481-9.
59. Tazoe, H., et al., *Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon*. Biomed Res, 2009. **30**(3): p. 149-56.
60. Sykaras, A.G., et al., *Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42373.
61. Karaki, S., et al., *Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine*. Cell Tissue Res, 2006. **324**(3): p. 353-60.
62. Hong, Y.H., et al., *Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5092-9.

63. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. Science, 2013. **341**(6145): p. 569-73.
64. Maslowski, K.M., et al., *Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1282-6.
65. Chang, P.V., et al., *The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(6): p. 2247-52.
66. Kim, C.H., J. Park, and M. Kim, *Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation*. Immune Netw, 2014. **14**(6): p. 277-88.
67. Kim, C.H., *Complex regulatory effects of gut microbial short-chain fatty acids on immune tolerance and autoimmunity*. Cell Mol Immunol, 2023. **20**(4): p. 341-350.
68. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
69. Rajilic-Stojanovic, M., et al., *Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(3): p. 481-8.
70. Willing, B.P., et al., *A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes*. Gastroenterology, 2010. **139**(6): p. 1844-1854 e1.
71. Lepage, P., et al., *Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 227-36.
72. Arthur, J.C., et al., *Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4724.
73. Wu, S., et al., *A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1016-22.
74. Parhi, L., et al., *Breast cancer colonization by Fusobacterium nucleatum accelerates tumor growth and metastatic progression*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 3259.
75. Yuan, N., et al., *Gut Microbiota Alteration Influences Colorectal Cancer Metastasis to the Liver by Remodeling the Liver Immune Microenvironment*. Gut Liver, 2022. **16**(4): p. 575-588.
76. Yu, T., et al., *Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy*. Cell, 2017. **170**(3): p. 548-563 e16.
77. Leiva-Gea, I., et al., *Gut Microbiota Differs in Composition and Functionality Between Children With Type 1 Diabetes and MODY2 and Healthy Control Subjects: A Case-Control Study*. Diabetes Care, 2018. **41**(11): p. 2385-2395.
78. Hou, K., et al., *Reconstruction of intestinal microecology of type 2 diabetes by fecal microbiota transplantation: Why and how*. Bosn J Basic Med Sci, 2022. **22**(3): p. 315-325.
79. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
80. Schwenger, K.J., N. Clermont-Dejean, and J.P. Allard, *The role of the gut microbiome in chronic liver disease: the clinical evidence revised*. JHEP Rep, 2019. **1**(3): p. 214-226.

81. Halfvarson, J., et al., *Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 17004.
82. Maeda, Y. and K. Takeda, *Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis*. Exp Mol Med, 2019. **51**(12): p. 1-6.
83. Choi, S.C., et al., *Gut microbiota dysbiosis and altered tryptophan catabolism contribute to autoimmunity in lupus-susceptible mice*. Sci Transl Med, 2020. **12**(551).
84. Fyhrquist, N., et al., *Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4703.
85. Vieira-Silva, S., et al., *Quantitative microbiome profiling disentangles inflammation- and bile duct obstruction-associated microbiota alterations across PSC/IBD diagnoses*. Nat Microbiol, 2019. **4**(11): p. 1826-1831.
86. Frati, F., et al., *The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut(-)Lung Axis*. Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
87. Konrad, A., et al., *Tight mucosal compartmentation of the murine immune response to antigens of the enteric microbiota*. Gastroenterology, 2006. **130**(7): p. 2050-9.
88. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.
89. Adolph, T.E., et al., *Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation*. Nature, 2013. **503**(7475): p. 272-6.
90. Ng, S.C., et al., *Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies*. Lancet, 2017. **390**(10114): p. 2769-2778.
91. Kaplan, G.G. and J.W. Windsor, *The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(1): p. 56-66.
92. Abraham, B.P., S. Mehta, and H.B. El-Serag, *Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a systematic review*. J Clin Gastroenterol, 2012. **46**(7): p. 581-9.
93. Schnorbach, M.T. and W. Kruis, *[Cost of illness of inflammatory bowel disease in Germany]*. Z Gastroenterol, 2021. **59**(11): p. 1173-1188.
94. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
95. Momozawa, Y., et al., *IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2427.
96. Aden, K., et al., *ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS-STING*. J Exp Med, 2018. **215**(11): p. 2868-2886.
97. Moltzau Anderson, J., et al., *NOD2 Influences Trajectories of Intestinal Microbiota Recovery After Antibiotic Perturbation*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020. **10**(2): p. 365-389.
98. Duan, J., et al., *Endoplasmic reticulum stress in the intestinal epithelium initiates purine metabolite synthesis and promotes Th17 cell differentiation in the gut*. Immunity, 2023. **56**(5): p. 1115-1131 e9.
99. Fazio, A., et al., *DNA methyltransferase 3A controls intestinal epithelial barrier function and regeneration in the colon*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 6266.
100. Nambu, R. and A.M. Muise, *Advanced Understanding of Monogenic Inflammatory Bowel Disease*. Front Pediatr, 2020. **8**: p. 618918.

101. Geirnaert, A., et al., *Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11450.
102. Lloyd-Price, J., et al., *Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases*. Nature, 2019. **569**(7758): p. 655-662.
103. Christ, A., et al., *Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 162-175 e14.
104. Adolph, T.E., et al., *The metabolic nature of inflammatory bowel diseases*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022. **19**(12): p. 753-767.
105. Chen, B.C., et al., *Effect of smoking on the development and outcomes of inflammatory bowel disease in Taiwan: a hospital-based cohort study*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 7665.
106. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1462-71.
107. Jaghult, S., et al., *Stress as a Trigger for Relapses in IBD: A Case-Crossover Study*. Gastroenterology Res, 2013. **6**(1): p. 10-16.
108. Geremia, A., et al., *Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(1): p. 3-10.
109. Rosati, E., et al., *A novel unconventional T cell population enriched in Crohn's disease*. Gut, 2022. **71**(11): p. 2194-2204.
110. Torres, J., et al., *Crohn's disease*. Lancet, 2017. **389**(10080): p. 1741-1755.
111. Ordas, I., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2012. **380**(9853): p. 1606-19.
112. Jess, T., C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet, *Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(6): p. 639-45.
113. T. Kucharzik, A.D., *S3-Leitlinie Colitis ulcerosa 2023-03*. 2023.
114. A. Sturm, A.S., *Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ (DGVS) (Version 4.1)*. 2024.
115. Garrett, W.S., J.I. Gordon, and L.H. Glimcher, *Homeostasis and inflammation in the intestine*. Cell, 2010. **140**(6): p. 859-70.
116. Helander, H.F. and L. Fandriks, *Surface area of the digestive tract - revisited*. Scand J Gastroenterol, 2014. **49**(6): p. 681-9.
117. Song, C., et al., *Intestinal mucus components and secretion mechanisms: what we do and do not know*. Exp Mol Med, 2023. **55**(4): p. 681-691.
118. Gerseemann, M., et al., *Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis*. Differentiation, 2009. **77**(1): p. 84-94.
119. Burger-van Paassen, N., et al., *The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection*. Biochem J, 2009. **420**(2): p. 211-9.
120. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
121. Kyd, J.M. and A.W. Cripps, *Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens*. Vaccine, 2008. **26**(49): p. 6221-4.
122. O'Hara, J.R., et al., *Consequences of Citrobacter rodentium infection on enteroendocrine cells and the enteric nervous system in the mouse colon*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 646-60.
123. Miron, N. and V. Cristea, *Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut*. Clin Exp Immunol, 2012. **167**(3): p. 405-12.

124. Sommer, F. and F. Backhed, *Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology*. Bioessays, 2016. **38**(5): p. 455-64.
125. Alula, K.M., et al., *Interplay of gut microbiota and host epithelial mitochondrial dysfunction is necessary for the development of spontaneous intestinal inflammation in mice*. Microbiome, 2023. **11**(1): p. 256.
126. Ning, L., et al., *Microbiome and metabolome features in inflammatory bowel disease via multi-omics integration analyses across cohorts*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 7135.
127. Stockdale, S.R., et al., *Interpersonal variability of the human gut virome confounds disease signal detection in IBD*. Commun Biol, 2023. **6**(1): p. 221.
128. Li, X.V., et al., *Immune regulation by fungal strain diversity in inflammatory bowel disease*. Nature, 2022. **603**(7902): p. 672-678.
129. Weber-Stiehl, S., et al., *Mitochondrial Function and Microbial Metabolites as Central Regulators of Intestinal Immune Responses and Cancer*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 919424.
130. Luu, M., et al., *The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 760.
131. Zaiatz-Bittencourt, V., et al., *Butyrate limits human natural killer cell effector function*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 2715.
132. Hay, N., *Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?* Nat Rev Cancer, 2016. **16**(10): p. 635-49.
133. Wilson, J.E., *Hexokinases*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1995. **126**: p. 65-198.
134. Wilson, J.E., *Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 12): p. 2049-57.
135. Heikkinen, S., et al., *Mouse hexokinase II gene: structure, cDNA, promoter analysis, and expression pattern*. Mamm Genome, 2000. **11**(2): p. 91-6.
136. Khan, M.W., et al., *Studies on the Tissue Localization of HKDC1, a Putative Novel Fifth Hexokinase, in Humans*. J Histochem Cytochem, 2018. **66**(5): p. 385-392.
137. Perrin-Cocon, L., et al., *Toll-like Receptor 4-Induced Glycolytic Burst in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Results from p38-Dependent Stabilization of HIF-1alpha and Increased Hexokinase II Expression*. J Immunol, 2018. **201**(5): p. 1510-1521.
138. Everts, B., et al., *TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKvarepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation*. Nat Immunol, 2014. **15**(4): p. 323-32.
139. John, S., J.N. Weiss, and B. Ribalet, *Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17674.
140. Thomas, G.E., et al., *The metabolic enzyme hexokinase 2 localizes to the nucleus in AML and normal haematopoietic stem and progenitor cells to maintain stemness*. Nat Cell Biol, 2022. **24**(6): p. 872-884.
141. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
142. Luo, F., et al., *Hexokinase II promotes the Warburg effect by phosphorylating alpha subunit of pyruvate dehydrogenase*. Chin J Cancer Res, 2019. **31**(3): p. 521-532.
143. Li, R., et al., *A pan-cancer analysis of the role of hexokinase II (HK2) in human tumors*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 18807.

144. Patra, K.C., et al., *Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer*. *Cancer Cell*, 2013. **24**(2): p. 213-228.
145. Wolf, A.J., et al., *Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan*. *Cell*, 2016. **166**(3): p. 624-636.
146. Yuan, Y., et al., *The transcription factor KLF14 regulates macrophage glycolysis and immune function by inhibiting HK2 in sepsis*. *Cell Mol Immunol*, 2022. **19**(4): p. 504-515.
147. Zhang, W., et al., *Lactate Is a Natural Suppressor of RLR Signaling by Targeting MAVS*. *Cell*, 2019. **178**(1): p. 176-189 e15.
148. Roberts, D.J. and S. Miyamoto, *Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(2): p. 248-57.
149. Li, Y., et al., *Immune effects of glycolysis or oxidative phosphorylation metabolic pathway in protecting against bacterial infection*. *J Cell Physiol*, 2019. **234**(11): p. 20298-20309.
150. el Marjou, F., et al., *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. *Genesis*, 2004. **39**(3): p. 186-93.
151. Heikkinen, S.P., M.; Halmekytö, M.; Suppola, S.; Pirinen, E.; Deeb, S. S.; Jänne, J.; Laakso, M., *Hexokinase II-deficient Mice. Prenatal Death of homozygotes without disturbances in glucose tolerance in heterozygotes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**: p. 22517-22523.
152. Katsandegwaza, B., W. Horsnell, and K. Smith, *Inflammatory Bowel Disease: A Review of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(16).
153. Endlicher, R., et al., *The Mitochondrial Permeability Transition Pore-Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State*. *Cells*, 2023. **12**(9).
154. Zhou, H., et al., *Mff-Dependent Mitochondrial Fission Contributes to the Pathogenesis of Cardiac Microvasculature Ischemia/Reperfusion Injury via Induction of mROS-Mediated Cardiolipin Oxidation and HK2/VDAC1 Disassociation-Involved mPTP Opening*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(3).
155. Baik, S.H., et al., *Hexokinase dissociation from mitochondria promotes oligomerization of VDAC that facilitates NLRP3 inflammasome assembly and activation*. *Sci Immunol*, 2023. **8**(84): p. eade7652.
156. Bonora, M. and P. Pinton, *The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 302.
157. Briston, T., et al., *Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 10492.
158. Baines, C.P., et al., *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7033): p. 658-62.
159. Li, B., et al., *Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1817**(9): p. 1628-34.
160. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7033): p. 652-8.

161. Machida, K., Y. Ohta, and H. Osada, *Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14314-20.
162. Kudo, T., et al., *Regulation of NETosis and Inflammation by Cyclophilin D in Myeloperoxidase-Positive Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis*. Arthritis Rheumatol, 2023. **75**(1): p. 71-83.
163. Li, X., et al., *Liver cyclophilin D deficiency inhibits the progression of early NASH by ameliorating steatosis and inflammation*. Biochem Biophys Res Commun, 2022. **594**: p. 168-176.
164. Zhu, X., et al., *Cyclophilin D regulates necrosis, but not apoptosis, of murine eosinophils*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016. **310**(8): p. G609-17.
165. Weiss, J.N., et al., *Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease*. Circ Res, 2003. **93**(4): p. 292-301.
166. Beutner, G., R.E. Alanzalon, and G.A. Porter, Jr., *Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14488.
167. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-265.
168. Sato, T. and H. Clevers, *Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications*. Science, 2013. **340**(6137): p. 1190-4.
169. Miyoshi, H. and T.S. Stappenbeck, *In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture*. Nat Protoc, 2013. **8**(12): p. 2471-82.
170. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
171. Sanger, F.C., A. R., *A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase*. J. Mol. Biol. , 1975. **94**: p. 441-448.
172. Liebisch, G., et al., *Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry-Investigation of Pre-Analytic Stability*. Biomolecules, 2019. **9**(4).
173. Zimmermann, J., C. Kaleta, and S. Waschina, *gapseq: informed prediction of bacterial metabolic pathways and reconstruction of accurate metabolic models*. Genome Biol, 2021. **22**(1): p. 81.
174. Brugiroux, S., et al., *Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Nat Microbiol, 2016. **2**: p. 16215.
175. Lewis, N.E., et al., *Omic data from evolved E. coli are consistent with computed optimal growth from genome-scale models*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 390.
176. Desouki, A.A., et al., *CycleFreeFlux: efficient removal of thermodynamically infeasible loops from flux distributions*. Bioinformatics, 2015. **31**(13): p. 2159-65.
177. Siegmund, B., et al., *IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13249-54.
178. Goodman, A.L., et al., *Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(3): p. 279-89.
179. Karow, M. and C. Georgopoulos, *Isolation and characterization of the Escherichia coli msbB gene, a multicopy suppressor of null mutations in the high-temperature requirement gene htrB*. J Bacteriol, 1992. **174**(3): p. 702-10.

180. Schaedler, R.W., R. Dubos, and R. Costello, *The Development of the Bacterial Flora in the Gastrointestinal Tract of Mice*. J Exp Med, 1965. **122**(1): p. 59-66.
181. Moolenbeek, C.R., E. J., *The 'Swiss roll': a simple technique for histological studies of the rodent intestine*. Laboratory Animals, 1981. **15**: p. 57-59.
182. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 541-6.
183. Egorin, M.J., et al., *Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43**(6): p. 445-53.
184. Wichmann, A., et al., *Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(5): p. 582-90.
185. Maslowski, K.M., *Metabolism at the centre of the host-microbe relationship*. Clin Exp Immunol, 2019. **197**(2): p. 193-204.
186. Macia, L., et al., *Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6734.
187. Bolsega, S., et al., *Composition of the Intestinal Microbiota Determines the Outcome of Virus-Triggered Colitis in Mice*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1708.
188. Sommer, F., et al., *Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85254.
189. Dewhirst, F.E., et al., *Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(8): p. 3287-92.
190. Xu, J., et al., *A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2074-6.
191. Braune, A. and M. Blaut, *Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut*. Gut Microbes, 2016. **7**(3): p. 216-34.
192. Larsson, E., et al., *Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88*. Gut, 2012. **61**(8): p. 1124-31.
193. Mogilenko, D.A., et al., *Metabolic and Innate Immune Cues Merge into a Specific Inflammatory Response via the UPR*. Cell, 2019. **178**(1): p. 263.
194. Weber, G., et al., *Feedback inhibition of key glycolytic enzymes in liver: action of free fatty acids*. Science, 1966. **154**(3754): p. 1357-60.
195. Louis, P., et al., *Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon*. J Bacteriol, 2004. **186**(7): p. 2099-106.
196. De Vadder, F., et al., *Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 84-96.
197. Nilsson, N.E., et al., *Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(4): p. 1047-52.
198. Sina, C., et al., *G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7514-22.
199. Singh, N., et al., *Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 128-39.

200. Koh, A., et al., *From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites*. Cell, 2016. **165**(6): p. 1332-1345.
201. Hocsak, E., et al., *PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway*. Free Radic Biol Med, 2017. **108**: p. 770-784.
202. Ricci, J.E., R.A. Gottlieb, and D.R. Green, *Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 65-75.
203. Taman, H., et al., *Genome-wide DNA Methylation in Treatment-naive Ulcerative Colitis*. J Crohns Colitis, 2018. **12**(11): p. 1338-1347.
204. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.
205. Cario, E., et al., *Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 966-72.
206. Qi, X., et al., *Lipopolysaccharide Upregulated Intestinal Epithelial Cell Expression of Fn14 and Activation of Fn14 Signaling Amplify Intestinal TLR4-Mediated Inflammation*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 315.
207. Yang, H., et al., *Energy metabolism in intestinal epithelial cells during maturation along the crypt-villus axis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 31917.
208. Matsumoto, M., et al., *Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 233.
209. Lagkouvardos, I., et al., *Corrigendum: The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota*. Nat Microbiol, 2016. **1**(11): p. 16219.
210. Lagkouvardos, I., et al., *The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota*. Nat Microbiol, 2016. **1**(10): p. 16131.
211. Rooks, M.G. and W.S. Garrett, *Gut microbiota, metabolites and host immunity*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 341-52.
212. Vinolo, M.A., et al., *Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(9): p. 849-55.
213. Erny, D., et al., *Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS*. Nat Neurosci, 2015. **18**(7): p. 965-77.
214. Elinav, E., et al., *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis*. Cell, 2011. **145**(5): p. 745-57.
215. Trompette, A., et al., *Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis*. Nat Med, 2014. **20**(2): p. 159-66.
216. Usami, M., et al., *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, 2008. **28**(5): p. 321-8.
217. Kendrick, S.F., et al., *Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis*. Hepatology, 2010. **51**(6): p. 1988-97.
218. Singh, N., et al., *Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases*. J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27601-8.
219. Butler, R. and G.P. Bates, *Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(10): p. 784-96.

220. Olsen, O.E., et al., *TGF-beta contamination of purified recombinant GDF15*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187349.
221. Zheng, M., et al., *Novel selective hexokinase 2 inhibitor Benitrobenrazide blocks cancer cells growth by targeting glycolysis*. Pharmacol Res, 2021. **164**: p. 105367.
222. Shan, W., Y. Zhou, and K.Y. Tam, *The development of small-molecule inhibitors targeting hexokinase 2*. Drug Discov Today, 2022. **27**(9): p. 2574-2585.
223. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. Curr Protoc Immunol, 2014. **104**: p. 15 25 1-15 25 14.
224. Fachi, J.L., et al., *Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism*. Cell Rep, 2019. **27**(3): p. 750-761 e7.
225. Mishiro, T., et al., *Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8*. Lab Invest, 2013. **93**(7): p. 834-43.
226. Sun, H., et al., *The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(4): p. 395-411.
227. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 103-11.
228. Donohoe, D.R., et al., *The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation*. Mol Cell, 2012. **48**(4): p. 612-26.
229. Mariadason, J.M., et al., *Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation*. Gastroenterology, 2001. **120**(4): p. 889-99.
230. Yang, J. and H. Yan, *Mucosal epithelial cells: the initial sentinels and responders controlling and regulating immune responses to viral infections*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(7): p. 1628-1630.
231. Daniel, N., E. Lecuyer, and B. Chassaing, *Host/microbiota interactions in health and diseases-Time for mucosal microbiology!* Mucosal Immunol, 2021. **14**(5): p. 1006-1016.
232. Kim, J., B.K. Koo, and J.A. Knoblich, *Human organoids: model systems for human biology and medicine*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(10): p. 571-584.
233. Zhao, Z., et al., *Organoids*. Nat Rev Methods Primers, 2022. **2**.
234. Cattaneo, C.M., et al., *Tumor organoid-T-cell coculture systems*. Nat Protoc, 2020. **15**(1): p. 15-39.
235. Puschhof, J., et al., *Intestinal organoid cocultures with microbes*. Nat Protoc, 2021. **16**(10): p. 4633-4649.
236. Boonekamp, K.E., T.L. Dayton, and H. Clevers, *Intestinal organoids as tools for enriching and studying specific and rare cell types: advances and future directions*. J Mol Cell Biol, 2020. **12**(8): p. 562-568.
237. Kollmann, C., et al., *Human organoids are superior to cell culture models for intestinal barrier research*. Front Cell Dev Biol, 2023. **11**: p. 1223032.
238. Lewis, S.K., et al., *DNA Methylation Analysis Validates Organoids as a Viable Model for Studying Human Intestinal Aging*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020. **9**(3): p. 527-541.
239. Rausch, P., et al., *Analysis of factors contributing to variation in the C57BL/6J fecal microbiota across German animal facilities*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(5): p. 343-355.

240. Hufeldt, M.R., et al., *Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors*. *Comp Med*, 2010. **60**(5): p. 336-47.
241. Perse, M. and A. Cerar, *Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 718617.
242. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 149-60.
243. Lin, P.L., et al., *Tumor necrosis factor and tuberculosis*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2007. **12**(1): p. 22-5.
244. Nakane, A., A. Numata, and T. Minagawa, *Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma interferon levels during Listeria monocytogenes infection in mice*. *Infect Immun*, 1992. **60**(2): p. 523-8.
245. Balkwill, F., *Tumour necrosis factor and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(5): p. 361-71.
246. Robaye, B., et al., *Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro*. *Am J Pathol*, 1991. **138**(2): p. 447-53.
247. Lin, J., et al., *TNFalpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety*. *Clin Immunol*, 2008. **126**(1): p. 13-30.
248. Keane, J., et al., *Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(15): p. 1098-104.
249. Collison, J., *Anti-TNF therapy not linked to cancer recurrence*. *Nat Rev Rheumatol*, 2018. **14**(10): p. 560.
250. Muller, M., et al., *TNF Inhibitors and Risk of Malignancy in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review*. *J Crohns Colitis*, 2021. **15**(5): p. 840-859.
251. DeWaal, D., et al., *Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 446.
252. Gottlob, K., et al., *Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase*. *Genes Dev*, 2001. **15**(11): p. 1406-18.
253. Majewski, N., et al., *Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak*. *Mol Cell*, 2004. **16**(5): p. 819-30.
254. Wang, L., et al., *Hexokinase 2-mediated Warburg effect is required for PTEN- and p53-deficiency-driven prostate cancer growth*. *Cell Rep*, 2014. **8**(5): p. 1461-74.
255. Lis, P., et al., *The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate*. *Molecules*, 2016. **21**(12).
256. Ciscato, F., et al., *Hexokinase 2 displacement from mitochondria-associated membranes prompts Ca(2+) -dependent death of cancer cells*. *EMBO Rep*, 2020. **21**(7): p. e49117.
257. Chiara, F., et al., *Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels*. *PLoS One*, 2008. **3**(3): p. e1852.
258. Ramiere, C., et al., *Activity of hexokinase is increased by its interaction with hepatitis C virus protein NS5A*. *J Virol*, 2014. **88**(6): p. 3246-54.

259. Su, W., et al., *Hexokinase 2-mediated glycolysis supports inflammatory responses to Porphyromonas gingivalis in gingival fibroblasts*. BMC Oral Health, 2023. **23**(1): p. 103.
260. Al-Zeer, M.A., et al., *Chlamydia trachomatis Prevents Apoptosis Via Activation of PDPK1-MYC and Enhanced Mitochondrial Binding of Hexokinase II*. EBioMedicine, 2017. **23**: p. 100-110.
261. Carreno-Florez, G.P., et al., *Interferon signaling drives epithelial metabolic reprogramming to promote secondary bacterial infection*. PLoS Pathog, 2023. **19**(11): p. e1011719.
262. Bouladoux, N., O.J. Harrison, and Y. Belkaid, *The Mouse Model of Infection with Citrobacter rodentium*. Curr Protoc Immunol, 2017. **119**: p. 19 15 1-19 15 25.
263. Bustamante, M.F., et al., *Hexokinase 2 as a novel selective metabolic target for rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2018. **77**(11): p. 1636-1643.
264. Torres, A., et al., *Role of mitochondria-bound HK2 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1103231.
265. Hu, Y., et al., *Dual roles of hexokinase 2 in shaping microglial function by gating glycolytic flux and mitochondrial activity*. Nat Metab, 2022. **4**(12): p. 1756-1774.
266. Chen, X., et al., *Dapagliflozin ameliorates ovulation disorders via attenuating activated microglia-mediated hypothalamic inflammation in HFD-fed mice*. Neuroendocrinology, 2023.
267. Zhuang, L., W. Ma, and J. Jiao, *Inhibition of Key Glycolytic Enzyme Hexokinase 2 Ameliorates Psoriasiform Inflammation in vitro and in vivo*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2023. **16**: p. 3229-3239.
268. Mullard, A., *2023 FDA approvals*. Nat Rev Drug Discov, 2024.
269. Jimenez, M., R. Langer, and G. Traverso, *Microbial therapeutics: New opportunities for drug delivery*. J Exp Med, 2019. **216**(5): p. 1005-1009.
270. Feuerstadt, P., et al., *SER-109, an Oral Microbiome Therapy for Recurrent Clostridioides difficile Infection*. N Engl J Med, 2022. **386**(3): p. 220-229.
271. Mullard, A., *FDA approves second microbiome-based C. difficile therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2023. **22**(6): p. 436.
272. Walter, J. and F. Shanahan, *Fecal microbiota-based treatment for recurrent Clostridioides difficile infection*. Cell, 2023. **186**(6): p. 1087.
273. Avery, E.G., et al., *The Gut Microbiome in Hypertension: Recent Advances and Future Perspectives*. Circ Res, 2021. **128**(7): p. 934-950.
274. Wilck, N., et al., *Salt-responsive gut commensal modulates T(H)17 axis and disease*. Nature, 2017. **551**(7682): p. 585-589.
275. *Gut microbial metabolites lower blood pressure in patients with hypertension*. Nat Cardiovasc Res, 2023. **2**(1): p. 18-19.
276. Warnecke, T., et al., *Gastrointestinal involvement in Parkinson's disease: pathophysiology, diagnosis, and management*. NPJ Parkinsons Dis, 2022. **8**(1): p. 31.
277. Yang, X., et al., *Parkinson's Disease Is Associated with Impaired Gut-Blood Barrier for Short-Chain Fatty Acids*. Mov Disord, 2022. **37**(8): p. 1634-1643.
278. Minter, M.R., et al., *Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30028.
279. de Theije, C.G., et al., *Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders*. Brain Behav Immun, 2014. **37**: p. 197-206.

280. Pensinger, D.A., et al., *Butyrate Differentiates Permissiveness to Clostridioides difficile Infection and Influences Growth of Diverse C. difficile Isolates*. Infect Immun, 2023. **91**(2): p. e0057022.
281. Chen, Y., et al., *Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis*. Hepatology, 2011. **54**(2): p. 562-72.
282. Hilty, M., et al., *Disordered microbial communities in asthmatic airways*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8578.
283. Cohen, N.A., et al., *A Retrospective Comparison of Fecal Microbial Transplantation Methods for Recurrent Clostridium Difficile Infection*. Isr Med Assoc J, 2016. **18**(10): p. 594-599.
284. Kuijper, E.J., et al., *A necessary discussion after transmission of multidrug-resistant organisms through faecal microbiota transplantations*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(11): p. 1161-1162.
285. Goloshchapov, O.V., et al., *Long-term impact of fecal transplantation in healthy volunteers*. BMC Microbiol, 2019. **19**(1): p. 312.
286. Liu, Q., et al., *Faecal microbiota transplantations and the role of bacteriophages*. Clin Microbiol Infect, 2023. **29**(6): p. 689-694.
287. Yu, Y., W. Wang, and F. Zhang, *The Next Generation Fecal Microbiota Transplantation: To Transplant Bacteria or Virome*. Adv Sci (Weinh), 2023. **10**(35): p. e2301097.
288. Kelly, C.R., et al., *Fecal Microbiota Transplantation Is Highly Effective in Real-World Practice: Initial Results From the FMT National Registry*. Gastroenterology, 2021. **160**(1): p. 183-192 e3.
289. Montalban-Arques, A., et al., *Commensal Clostridiales strains mediate effective anti-cancer immune response against solid tumors*. Cell Host Microbe, 2021. **29**(10): p. 1573-1588 e7.
290. Dizman, N., et al., *Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase 1 trial*. Nat Med, 2022. **28**(4): p. 704-712.
291. El-Salhy, M., et al., *Long-term effects of fecal microbiota transplantation (FMT) in patients with irritable bowel syndrome*. Neurogastroenterol Motil, 2022. **34**(1): p. e14200.
292. Aggarwala, V., et al., *Author Correction: Precise quantification of bacterial strains after fecal microbiota transplantation delineates long-term engraftment and explains outcomes*. Nat Microbiol, 2022. **7**(5): p. 736.
293. Aggarwala, V., et al., *Precise quantification of bacterial strains after fecal microbiota transplantation delineates long-term engraftment and explains outcomes*. Nat Microbiol, 2021. **6**(10): p. 1309-1318.
294. Singh, P., et al., *Effect of antibiotic pretreatment on bacterial engraftment after Fecal Microbiota Transplant (FMT) in IBS-D*. Gut Microbes, 2022. **14**(1): p. 2020067.
295. Allegretti, J.R., et al., *Early Antibiotic Use After Fecal Microbiota Transplantation Increases Risk of Treatment Failure*. Clin Infect Dis, 2018. **66**(1): p. 134-135.
296. Wei, H., et al., *Butyrate ameliorates chronic alcoholic central nervous damage by suppressing microglia-mediated neuroinflammation and modulating the microbiome-gut-brain axis*. Biomed Pharmacother, 2023. **160**: p. 114308.
297. Tang, G., et al., *Butyrate ameliorates skeletal muscle atrophy in diabetic nephropathy by enhancing gut barrier function and FFA2-mediated PI3K/Akt/mTOR signals*. Br J Pharmacol, 2022. **179**(1): p. 159-178.

298. Chen, H.C., et al., *Gut butyrate-producers confer post-infarction cardiac protection*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 7249.
299. Hu, C., et al., *Sodium Butyrate Ameliorates Atopic Dermatitis-Induced Inflammation by Inhibiting HDAC3-Mediated STAT1 and NF-kappaB Pathway*. Inflammation, 2023.
300. Zhu, W., et al., *Acetate attenuates hyperoxaluria-induced kidney injury by inhibiting macrophage infiltration via the miR-493-3p/MIF axis*. Commun Biol, 2023. **6**(1): p. 270.
301. Lee, J.G., et al., *Impact of short-chain fatty acid supplementation on gut inflammation and microbiota composition in a murine colitis model*. J Nutr Biochem, 2022. **101**: p. 108926.
302. Simeoli, R., et al., *An orally administered butyrate-releasing derivative reduces neutrophil recruitment and inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(11): p. 1484-1496.
303. Liu, S., et al., *Tributylin administration improves intestinal development and health in pre-weaned dairy calves fed milk replacer*. Anim Nutr, 2022. **10**: p. 399-411.
304. Bourdu, S., et al., *Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats*. Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1996-2008.
305. Zhang, W., et al., *Rectal administration of butyrate ameliorates pulmonary fibrosis in mice through induction of hepatocyte growth factor in the colon via the HDAC-PPARgamma pathway*. Life Sci, 2022. **309**: p. 120972.
306. Boyle, M., et al., *Adherence to Rectal Mesalamine in Patients with Ulcerative Colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(12): p. 2873-8.
307. Kadyan, S., et al., *Resistant starches from dietary pulses modulate the gut metabolome in association with microbiome in a humanized murine model of ageing*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 10566.
308. Montroy, J., et al., *The effects of resistant starches on inflammatory bowel disease in preclinical and clinical settings: a systematic review and meta-analysis*. BMC Gastroenterol, 2020. **20**(1): p. 372.
309. Kirsner, J.B., *Historical origins of current IBD concepts*. World J Gastroenterol, 2001. **7**(2): p. 175-84.
310. Kobayashi, T., et al., *Ulcerative colitis*. Nat Rev Dis Primers, 2020. **6**(1): p. 74.
311. Vespa, E., et al., *Histological Scores in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: The State of the Art*. J Clin Med, 2022. **11**(4).
312. Marchal-Bressenot, A., et al., *Development and validation of the Nancy histological index for UC*. Gut, 2017. **66**(1): p. 43-49.
313. Le, H.D., et al., *Interobserver Reliability of the Nancy Index for Ulcerative Colitis: An Assessment of the Practicability and Ease of Use in a Single-Centre Real-World Setting*. J Crohns Colitis, 2023. **17**(3): p. 389-395.
314. Zhou, K.L., et al., *Increased hexokinase-2 as a novel biomarker for the diagnosis and correlating with disease severity in rheumatoid arthritis*. Medicine (Baltimore), 2021. **100**(25): p. e26504.
315. Huda-Faujan, N., et al., *The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects*. Open Biochem J, 2010. **4**: p. 53-8.
316. Ferrer-Picon, E., et al., *Intestinal Inflammation Modulates the Epithelial Response to Butyrate in Patients With Inflammatory Bowel Disease*. Inflamm Bowel Dis, 2020. **26**(1): p. 43-55.

317. Chakrabarti, A., et al., *HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(7): p. 481-92.
318. Yoon, S. and G.H. Eom, *HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases*. Chonnam Med J, 2016. **52**(1): p. 1-11.
319. Khan, N., et al., *Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors*. Biochem J, 2008. **409**(2): p. 581-9.
320. Bahl, S. and E. Seto, *Regulation of histone deacetylase activities and functions by phosphorylation and its physiological relevance*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(2): p. 427-445.
321. Liu, H., et al., *Butyrate: A Double-Edged Sword for Health?* Adv Nutr, 2018. **9**(1): p. 21-29.
322. Kim, J.Y., et al., *HDAC8 Deacetylates HIF-1alpha and Enhances Its Protein Stability to Promote Tumor Growth and Migration in Melanoma*. Cancers (Basel), 2023. **15**(4).
323. Taylor, C.T. and C.C. Scholz, *The effect of HIF on metabolism and immunity*. Nat Rev Nephrol, 2022. **18**(9): p. 573-587.
324. Sun, X., et al., *Expression and Clinical Significance of HKII and HIF-1alpha in Grade Groups of Prostate Cancer*. Front Genet, 2021. **12**: p. 680928.
325. Kim, J.Y., et al., *Pathological Role of HDAC8: Cancer and Beyond*. Cells, 2022. **11**(19).

7 Anhang

7.1 Angaben über genutzten Materialien

7.1.1 Antikörper

Tabelle 7.1 Antikörper

Antikörper	Quelle	Identifikation
Anti-Caspase 3/cCaspase 3	Cell Signaling Technology	9542
Anti-Hexokinase 2 (OTI4C5)	Novus Biologicals	NBP2-02272
Anti-Ki67	BD Biosciences	556003
Anti-Mouse IgG	TH Geyer	NA931V
Anti-PARP1/cPARP1	Cell Signaling Technology	9662
Anti-Rabbit	TH Geyer	NA934V
HRP Anti-beta Actin	Abcam	ab20272

7.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 7.2 Bakterienstämme

Bakterienstämme	Quelle	Identifikation
ASF	Taconic	ASF-DONOR
<i>B. longum</i> NCC 2705	Nestle Research Center, N/A Lausanne, Switzerland	Nicht verfügbar
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	Edison Family Center für (Goodman et al., 2009) Genome Sciences and Systems Biology, Washington University School of Medicine	Nicht verfügbar
<i>E. coli</i> W3110	Edison Family Center für (Karow and Georgopoulos, 1992) Genome Sciences and Systems Biology, Washington University School of Medicine	Nicht verfügbar
OMM	Max von Pettenkofer Institut der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München	Nicht verfügbar
One Shot® TOP10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific	C404010

7.1.3 Biologische Proben

Tabelle 7.3 Biologische Proben

Biologische Proben	Quelle	Identifikation
Serum und Gewebe von <i>Hk2^{ΔIEC}</i> -Mäusen	[1]	Nicht verfügbar
Serum und Gewebe von WT-Mäusen	[1]	Nicht verfügbar

7.1.4 Labormaterialien

Tabelle 7.4 Labormaterialien

Labormaterialien	Quelle	Identifikation
(3-Nitrophenyl)-hydrazin -hydrochlorid	Sigma-Aldrich	N21804
0,1 % pH4.2. Ethansäure	Biosolve	23234101
10 % (v/v) Formalinlösung	Sigma-Aldrich	HT501128-4L
10 x SYBR® Safe DNA gel stain	Thermo Fisher Scientific	S33102
10 x TGS	Bio-Rad	1610732
100x Halt Protease and phosphatase inhibitor cocktail	Thermo Fisher Scientific	78452
384-Well-Platte für qRT-PCR	Sarstedt	72.1984.202
Acetat	Sigma-Aldrich	S2889
Acetonitril	Sigma-Aldrich	1000291000
<i>Acutalibacter muris</i> KB18 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific	12634028
Agarose-Gel	Biozym	840001
<i>Akkermansia muciphila</i> YL44 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich	9691
<i>Bacterioides ceacimuris</i> I48 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
BD Matrigel Growth factor reduced; Phenol red free	BD Bioscience	356231
<i>Bifidobacterium animalis</i> YL2 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
<i>Blautia coccoides</i> YL58 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
BSA	Carl Roth	8076.4
Butansäure	Sigma-Aldrich	B103500
Butyrat	Sigma-Aldrich	B5887
Citrat-Puffer	Thermo Fisher Scientific	005000
<i>Clostridium innocuum</i> I46 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
CoolCell® Box	Biocision	BCS-405
CryoPure 2.0 ml	Sarstedt	72.380.002
CryoStor® CS10	STEMCELL Technologies	07930
DBPS	Life Technologies GmbH	14190136
DMEM	Thermo Fisher Scientific	31095-052
DSS	Sigma-Aldrich	D8906
EDTA	Sigma-Aldrich	E9884
<i>Enterocloster clostridioforme</i> YL32 Überstand	[1]	Nicht verfügbar

<i>Enterococcus faecalis</i> KB1 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
Eosin Y-Lösung	Merck	HT1102128-4L
Ethanol	Merck	E7148
Ethansäure	Sigma-Aldrich	A6283
FBS	Biochrom	S0115
<i>Flavonifractor plautii</i> YL31 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
Genectin	Thermo Fisher Scientific	10131035
GlutaMAX-1	Thermo Fisher Scientific	35050-038
GoTaq® Master Mixes	Promega	M7122
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375
Human recombinant EGF Protein,CF	R&D Systems	236-EG
Hygromycin	Thermo Fisher Scientific	10687010
Immun-Blot PVDF Membrane	Bio-Rad	162-0177
IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)	STEMCELL Technologies	06005
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> I49 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
Lithium-Heparin-Mikrogefäße	Sarstedt	41.1503.005
Mayers Hämlaunlösung	Merck	109249
MEM	Thermo Fisher Scientific	31095-052
Methanol	Merck	1.06035.1000
Milchpulver	Santa Cruz	sc-2325
Mouse tumor necrosis factor-alpha recombinant protein	Thermo Fisher Scientific	PMC3016
<i>Muribaculum intestinale</i> YL27 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
NAC	Sigma-Aldrich	A9165-25G
Natriumhydroxid	Merck	655104
Nuclease-free Water	Thermo Fisher Scientific	AM9916
PageRuler™ Plus Prestained Protein	Thermo Fisher Scientific	26619
Paraffin	Thermo Fisher Scientific	416770020
PBS	Thermo Fisher Scientific	10010023
PCI	MedChemExpress	HY-15224
Pen/Strep	Thermo Fisher Scientific	15140-122
Probenpuffer nach Lämmli	Sigma-Aldrich	S3401-10VL
Propansäure	Sigma-Aldrich	P1386
Puromycin	Sigma-Aldrich	P7255
RGFP966	MedChemExpress	HY-13909-10mM
RIPA Puffer	Thermo Fisher Scientific	89900

RLT	QiaGen	79216
RNase-free Water	QiaGen	129112
Roti®-HistoKit	Roth	6638.1
ROTI®Histol	Roth	6640.1
SAHA	Sigma-Aldrich	SML0061-25MG
Santacruzamate A/ CAY-10683	MedChemExpress	HY-N0931
Seahorse XF24 V28 PS Cell Culture Microplates	Aligent Technologies	100882-004
Seahorse XF24 V7 PS Cell Culture Microplate	Aligent Technologies	100777-004
SIS17	MedChemExpress	HY-128918
SmartLadder MW-1700-10	Eurogentec	MW-1700-10
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	444203
SYBR® Select Master Mix	Applied Biosystems	4472920
TRIS-Acetate-EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich	T6025-1L
TC-H 106	MedChemExpress	HY-19348
TMP269	MedChemExpress	HY-18360
Tributyrin	Sigma-Aldrich	W222305
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot	Thermo Fisher Scientific	25300062
<i>Turicimonas muris</i> YL45 Überstand	[1]	Nicht verfügbar
Tween 20	Carl Roth	9127.2
Valproinsäure	Sigma-Aldrich	PHR1061-1G
Wasserstoffperoxid	Thermo Fisher Scientific	202465000
Zellkulturplatte 24-Well	Sarstedt	83.3922.005
Zellkulturplatte 6-Well	Sarstedt	83.3920
Zellkulturplatte 96-Well	Sarstedt	83.3925
Zeocin	Thermo Fisher Scientific	46-0509
Ziegenserum	Thermo Fisher Scientific	50197Z
β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate	Sigma-Aldrich	N0505-1G

7.1.5 Kritische kommerzielle Tests

Tabelle 7.5 Kritische kommerzielle Tests

Kritische kommerzielle Tests	Quelle	Identifikation
ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit	Sigma-Aldrich	S710
CXCL1/KC DuoSet ELISA Quantikine	R&D Systems	MKC00B
DC Protein Assay	Biorad	5000111
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen	69504

Dynabeads® CD4 Positive Isolation Kit	Invitrogen	11331D
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare UK	RPN2209
GeneArt® CRISPR Nuclease Vector with CD4 Enrichment Kit	Thermo Fisher Scientific	A21175
H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	K1651
Haemocult®	Beckman Coulter	Nicht verfügbar
Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific	L3000015
NucleoSpin Bead Tubes Type A (50)	Macherey-Nagel	740786.50
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific	32132X3
RNase-free DNase Set	QiaGen	79254
RNeasy Mini Kit	QiaGen	74004
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Aligent Technologies	103015-100
Standart ABTS ELISA Development Kit	Peptotech	250-11
Vectastain ABC kit	Vector Laboratories	PK-4000
Viromer Blue Kit for siRNA transfection	Lipocalyx	Nicht verfügbar
BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific	4337449

7.1.6 Zelllinien

Tabelle 7.6 Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Identifikation
Caco-2-Zellen	DSMZ	ACC-169
Caco-2 ^{ΔHk2} -Zellen	[1]	Nicht verfügbar
Caco-2 ^{WT} -Zellen	[1]	Nicht verfügbar
HEK-293 Zellen	DSMZ	ACC-305
HT-29 Zellen	DSMZ	ACC-299
L-WRN Zellen	ATCC	CRL-3276

7.1.7 Organismen

Tabelle 7.7 Organismen

Organismus	Quelle	Identifikation
C57BL/6j Mäuse	Jackson Laboratory	000664
Hk2 ^{ΔIEC} Intestinale Organoide	[1]	Nicht verfügbar
Hk2 ^{ΔIEC} -Mäuse	[1]	Nicht verfügbar
Hk2 ^{fl/fl} Intestinale Organoide	[1]	Nicht verfügbar
Hk2 ^{fl/fl} Mäuse (WT)	[1]	Nicht verfügbar

7.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 7.8 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Quelle	Identifikation
Primer (PCR)	Tabelle 2.6, Tabelle 2.13	Nicht verfügbar
siGenome siRNA <i>FFAR2</i> (Human) Smart Pool	Horizon	M-005574-00-0005
siGenome siRNA <i>FFAR3</i> (Human) Smart Pool	Horizon	M-005572-00-0005
siGenome siRNA <i>HCAR2</i> (Human) Smart Pool	Horizon	M-006688-03-0005

7.1.9 Rekombinante DNA

Tabelle 7.9 Rekombinante DNA

Rekombinante DNA	Quelle	Identifikation
CRISPR Plasmid für humanes <i>Hk2</i>	[1]	Nicht verfügbar

7.1.10 Software und Algorithmen

Tabelle 7.10 Software und Algorithmen

Software/Algorithmus	Quelle	Link
Adobe Illustrator Version 25.3	Adobe	www.adobe.com
Biorender	Biorender	www.biorender.com
finchTV software (version 1.4.0)	Geospiza's FinchTV i	https://finchtv.software.informer.com/1.4/
Gapseq	Gapseq	https://github.com/jotech/gapseq
Graph-Pad-Prism software, version 9.2	GraphPad	https://www.graphpad.com
ImageJ bundled with Java 1.8.0_172	ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
MacQIIME v1.9.2	Qiime	http://qiime.org/index-qiime1.html
QuantAnalysis	Bruker Daltonics GmbH	www.bruker.com
R Version 3.2.5	R	https://www.r-project.org
Tecan-i.control software 1.9	Tecan	Nicht verfügbar
ViiA 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific	Nicht verfügbar
ZEN pro (Blue edition)	Zeiss	https://www.zeiss.com

7.1.11 Hardware

Tabelle 7.11 Hardware

Hardware	Quelle	Identifikation
3730xl DNA Analyser	Thermo Fisher Scientific	Nicht verfügbar
96-well-Thermocycler	Thermo Fisher Scientific	Nicht verfügbar
amaZon ETD IonTrap Massenspektrometer	Bruker Daltonics GmbH	Nicht verfügbar
Axiomager Z1 Mikroskop	Zeiss	Nicht verfügbar
Bio-Rad Power Pac 300 power supply	Bio-Rad	Nicht verfügbar
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad	Nicht verfügbar
GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems	Nicht verfügbar
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers	PeqLab Biotechnologie GmbH	Nicht verfügbar
Precellys Evolution Homogenizer	Bertin Corp	Nicht verfügbar
RM2255 Mikrotom	Leica	Nicht verfügbar
Seahorse XFe24 Analyser	Agilent Technologies	Nicht verfügbar
Infinite M200 Pro Microplate Reader von Tecan	Tecan	Nicht verfügbar
TissueLyser II	QiaGen	Nicht verfügbar
Trans-Blot Turbo™ Transfer System	Bio-Rad	Nicht verfügbar
Ultra-High Performance Liquid Chromatography	Acquity UPLC	Nicht verfügbar
XCell SureLock Mini Cell System	Thermo Fisher Scientific	EI0001

7.1.12 Versuchstierdiäten

Tabelle 7.12 Versuchstierdiäten

Versuchstierdiät	Quelle	Identifikation
Butyrat-Diät	[1]	Nicht verfügbar
Kontrolldiät	Ssniff special diets GmbH	V1534
Kontrollfutter Gnotobiotik	Labdiet	5001

7.2 Danksagung

Meine Dissertation markiert das Ende eines bedeutenden Abschnitts meiner akademischen und persönlichen Reise, und ich danke allen, die mich auf diesem Weg unterstützt haben.

Zunächst gebührt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater Felix Sommer, der mich während meiner gesamten Promotionszeit mit Hingabe betreut hat. Sein Vertrauen und die intensiven wissenschaftlichen Diskussionen haben dazu beigetragen, meine Forschung voranzubringen.

Weiterhin gilt mein Dank Philip Rosenstiel, der als Leiter des Institutes nicht nur eine herausragende wissenschaftliche Autorität ist, sondern auch eine Quelle der Unterstützung und Inspiration während meiner gesamten Promotionszeit war.

Ich danke Jacob Hamm, ohne dessen Vorarbeit und Zeit die gemeinsame Publikation nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich bei allen Beteiligten bedanken, die bei dieser Arbeit mitgeholfen haben. Besonderer Dank gilt Florian Tran, Lena Schröder und Simon Imm. Weiterhin möchte ich Silke, Steffi, Sabine, Go, Ken, Antonella, Lina, Georg, Saskia, Fenja, Huy und Dora danken.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.

Liebe Katharina, vielen Dank für deinen Teil an dieser Arbeit, der insbesondere außerhalb des Labors lag

Meine Anerkennung gilt ebenso dem Institut für klinische Molekularbiologie, dem PMI und der RTG 1743, welche mir die notwendigen Ressourcen und Forschungseinrichtungen zur Verfügung gestellt hat, um meine Untersuchungen durchzuführen. Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Mitbetreuern und dem Prüfungsausschuss für ihre Zeit, kritischen Einblicke und konstruktiven Feedbacks, die die Qualität meiner Arbeit bereichert haben.

7.3 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Finn Hinrichsen, an Eides statt, dass

- meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorliegt.
- Veröffentlichungen nach den Richtlinien über Benotung von Dissertationen erfolgt sind.
- die zuständigen Behörden zugestimmt haben, dass Forschungsvorhaben an Tieren vorgenommen wurden.
- ich 15 Semester im Studienfach Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität studiert habe.
- die Leiter des Instituts für klinische Molekularbiologie einverstanden sind, dass die Dissertation an deren Einrichtung geschrieben wurde.
- für die Nutzung von Arbeitsmöglichkeiten der wissenschaftlichen Einrichtung durch mich das Einverständnis der Leitung der Einrichtung vorliegt.

Ich erkläre, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, 23. 04. 2024

7.4 Publikationen und wissenschaftliche Präsentationen

7.4.a. Publikationen

Die Doktorarbeit ist Bestandteil der folgenden Publikation:

Microbial regulation of hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis

Authors: **Hinrichsen F** # & Hamm J[#], Westermann M, Schroeder L, Shima K, Mishra N, Walker A, Sommer N, Klischies K, Prasse D, Zimmermann J, Kaiser S, Bordoni D, Fazio A, Marinos G, Laue G, Imm S, Tremaroli V, Basic M, Häsler R, Schmitz-Streit R, Krautwald S, Wolf A, Stecher B, Schmitt-Koplin P, Kaleta C, Rupp J, Bäckhed F, Rosenstiel P* & Sommer F*

#Diese Autoren haben gleichmäßig beigetragen und teilen sich die Erstautorenschaft

*Diese Autoren haben gleichmäßig beigetragen und teilen sich die Letztautorenschaft

Journal: Cell Metabolism
Datum der Publikation: Dezember 7, 2021
DOI: j.cmet.2021.11.0

1. *Microbial regulation of hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis.*

Cell metabolism 2021

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.11.004>

Finn Hinrichsen*, Jacob Hamm*, Magdalena Westermann, Lena Schröder, Kensuke Shima, Neha Mishra, Alesia Walker, Nina Sommer, Kenneth Klischies, Daniela Prasse, Johannes Zimmermann, Sina Kaiser, Dora Bordoni, Antonella Fazio, Georgios Marinos, Georg Laue, Simon Imm, Valentina Tremaroli, Marijana Basic, Robert Häsler, Ruth A. Schmitz, Stefan Krautwald, Andrea Wolf, Bärbel Stecher, Philippe Schmitt-Kopplin, Christoph Kaleta, Jan Rupp, Fredrik Bäckhed, Philip Rosenstiel**, Felix Sommer**.

* Geteilte Erstautorenschaft; ** Geteilte Letztautorenschaft.

2. *Activating Transcription Factor 6 Mediates Inflammatory Signals in Intestinal Epithelial Cells Upon Endoplasmic Reticulum Stress.*

Gastroenterology. 2021

DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.088>

Stephanie T. Stengel, Antonella Fazio, Simone Lipinski, Martin T. Jahn, Konrad Aden, Go Ito, Felix Wottawa, Jan W.P. Kuiper, Olivia I. Coleman, Florian Tran, Dora Bordoni, Joana P. Bernardes, Marlene Jentzsch, Anne Luzius, Sandra Bierwirth, Berith Messner, Anna Henning, Lina Welz, Nassim Kakavand, Maren Falk-Paulsen, Simon Imm, **Finn Hinrichsen**, Matthias Zilbauer, Stefan Schreiber, Arthur Kaser, Richard Blumberg, Dirk Haller, Philip Rosenstiel

3. *Longitudinal multi-omics analyses identify responses of megakaryocytes, erythroid cells and plasmablasts as hallmarks of severe COVID-19 trajectories.*

Immunity. 2021

DOI: [10.1016/j.immuni.2020.11.017](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.017)

Joana P. Bernardes, Neha Mishra, Florian Tran, Thomas Bahmer, Lena Best, Johanna I. Blase, Dora Bordoni, Jeanette Franzenburg, Ulf Geisen, Jonathan Josephs-Spaulding, Philipp Köhler, Axel Künstner, Elisa Rosati, Anna C. Aschenbrenner, Petra Bacher, Nathan Baran, Teide Boysen, Burkhard Brandt, Niklas Bruse, Jonathan Dörr, Andreas Dräger, Gunnar Elke, David Ellinghaus, Julia Fischer, Michael Forster, Andre Franke, Sören Franzenburg, Norbert Frey, Anette Friedrichs, Janina Fuß, Andreas Glück, Jacob Hamm, **Finn Hinrichsen**, Marc P. Hoeppner, Simon Imm, Ralf Junker, Sina Kaiser, Ying H. Kan, Rainer Knoll,

Christoph Lange, Georg Laue, Clemens Lier, Matthias Lindner, Georgios Marinos, Robert Markewitz, Jacob Nattermann, Rainer Noth, Peter Pickkers, Klaus F. Rabe, Alina Renz, Christoph Röcken, Jan Rupp, Annika Schaffarzyk, Alexander Scheffold, Jonas Schulte-Schrepping, Domagoj Schunk, Dirk Skowasch, Thomas Ulas, Klaus-Peter Wandinger, Michael Wittig, Johannes Zimmermann, Hauke Busch, Bimba F. Hoyer, Christoph Kaleta, Jan Heyckendorf, Matthijs Kox, Jan Rybníček, Stefan Schreiber, Joachim L. Schultze and Philip Rosenstiel, HCA Lung Biological Network, and the Deutsche COVID-19 Omics Initiative (DeCOI)

4. *Nutritional Targeting of the Microbiome as Potential Therapy for Malnutrition and Chronic Inflammation trajectories.*

Nutrients. 2021

DOI: 10.3390/nu12103032.

Lena Schröder, Sina Kaiser, Burkhardt Flemer, Jacob Hamm, **Finn Hinrichsen**, Dora Bordoni, Philip Rosenstiel and Felix Sommer.

5. *DNA methyltransferase 3A controls intestinal epithelial barrier function and regeneration in the colon.*

Nature Communications. 2022.

DOI: 10.1038/s41467-022-33844-2.

Antonella Fazio, Dora Bordoni, Jan W.P. Kuiper, Saskia Weber-Stiehl, Stephanie T. Stengel, Philipp Arnold, David Ellinghaus, Go Ito, Florian Tran, Berith Messner, Anna Henning, Joana P. Bernardes, Robert Häsler, Anne Luzius, Simon Imm, **Finn Hinrichsen**, Susanna Nikolaus, Konrad Aden, Stefan Schreiber, Felix Sommer, Gioacchino Natoli, Neha Mishra and Philip Rosenstiel

7.4.b. Vorträge im Rahmen der Dissertation

1. **Hinrichsen F.***, Hamm J.* *et al.* *Microbial regulation of epithelial hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis*. Präsentiert auf dem internationalen Symposium des Exzellenzcluster Precision Medicine in Chronic Inflammation „Inflammation Medicine- From Bench to Bedside“. Vortrag während des Animalworkshops. 2020 Februar 17-18, Hamburg, Deutschland.

**geteilte Erstautorenschaft.*

2. **Hinrichsen F.***, Hamm J.* *et al.* *Microbial regulation of epithelial hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis*. Präsentiert auf der United European Gastroenterology Week 2020. United European Gastroenterology; 2020, Oktober 11-13, Online (Geplant Amsterdam, Niederlande). Moderated Postersession: Colorectal Cancer.

**geteilte Erstautorenschaft.*

7.4.c. Posterpräsentationen im Rahmen der Dissertation

1. Hamm J., **Hinrichsen F.**, et al. *Loss of the microbially regulated hexokinase 2 in intestinal epithelial cells protects from acute colitis.* Präsentiert durch Jacob Hamm auf der United European Gastroenterology Week 2019. United European Gastroenterology; 2019, Oktober 19-23, Barcelona, Spanien: United European Gastroenterol J; 2019. Vol. 7. **Poster of Excellence**
2. Hamm J.*, **Hinrichsen F.*** et al. *Hexokinase 2 is regulated by the intestinal microbiome and its loss in the intestinal epithelium is beneficial upon acute colitis..* Präsentiert auf der Autumn School on the role of the microbiome in complex metabolic and inflammatory diseases. 2019, Oktober 02-03, Ebberup, Dänemark.
* geteilte Erstautorenschaft.
3. **Hinrichsen F.***, Hamm J.* et al. *Microbial regulation of epithelial hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis.* Präsentiert auf der United European Gastroenterology Week 2020. United European Gastroenterology; 2020, Oktober 11-13, Online (Geplant Amsterdam, Niederlande). Moderated Postersession: Colorectal Cancer. United European Gastroenterol J; 2019. Vol. 8.
* geteilte Erstautorenschaft.
4. **Hinrichsen F.***, Hamm J.* et al. *Microbial regulation of epithelial hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis.* Präsentiert auf dem internationalen Symposium des Exzellenzcluster Precision Medicine in Chronic Inflammation. 2020 Februar 17-18, Hamburg, Deutschland. **Erster Platz Posterpreis International PMI-Symposium.**
* geteilte Erstautorenschaft.

7.4.d. Eingeworbene Drittmittel im Rahmen der Dissertation

1. **Hinrichsen F.** et al. *Bacterial metabolite Butyrat links mitochondrial metabolism and cell death in colitis via repression of HK2.* Miniproposal RTG 1743. 2020; Erster Platz. 35.000 €. <https://www.genes-environment-inflammation.de/projects>. Miniproposal 2.