

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
(in Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Charité Berlin)

**Systemische Inaktivierung des murinen 12/15-Lipoxygenase-Gens (Alox15) schützt  
weibliche Mäuse vor einer durch Dextran-Natriumsulfat induzierten Kolitis**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von  
aus  
Magdeburg

Saskia Kroschwald  
Berlin  
2018

## Bibliographische Beschreibung:

Kroschwald, S., Chiu, C. Y., Heydeck, D., Rohwer, N., Gehring, T., Seifert, U., Lux, A., Rothe, M., Weylandt, K.H., Kuhn, H. *Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (2018) 866-880.

## Kurzreferat

Die 12/15-Lipoxygenase (Alox15) wird häufig als funktioneller Gegenspieler der pro-inflammatorischen 5-Lipoxygenase (Alox5) angesehen, da das Enzym in mehreren Entzündungsmodellen eine anti-inflammatorische Wirkung zeigt. Um zu überprüfen, ob dies auch für die murine Kolitis zutrifft, wurde bei Alox15-defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren eine experimentelle DSS-Kolitis ausgelöst. Dabei erhielten die Tiere über sieben Tage 2,5 % DSS über das Trinkwasser. Dieser Induktionsphase folgte eine sieben-tägige Erholungsphase, während der kein DSS appliziert wurde. Als klinische Parameter für den Schweregrad der Erkrankung galten Gewichtsveränderungen, der Krankheitsaktivitätsindex (DAI) und die Kolonlänge. Weiterhin wurde mithilfe der qRT-PCR im Darmgewebe das Expressionsniveau pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ ), wichtiger Komponenten der intestinalen Barriere (Occludin, Claudin-1, Kollagen IV) sowie pro-inflammatorischer Enzyme (COX1, COX2, iNOS) quantifiziert. *Ex vivo*-Experimente zur intestinalen Permeabilität sollten zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Prozesse beitragen, die der DSS-Kolitis zugrunde liegen. Die Alox15-defizienten Mäuse waren im Vergleich zu den Wildtyp-tieren gegenüber der induzierten DSS-Kolitis geschützt. Die molekularen Ursachen für diesen Zusammenhang sind noch nicht eindeutig geklärt. Die mechanistischen Untersuchungen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Erhöhung der intestinalen Permeabilität bei den Alox15-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-tieren weniger stark ausgeprägt ist. Diese Hypothese wird durch Expressionsstudien von *Tight Junction*-Proteinen bestätigt.

Schlüsselwörter: Lipoxygenase, Cyclooxygenase, Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , Stickstoffmonoxid, Entzündung, Darmerkrankung, intestinale Barriere, epitheliale Permeabilität, *Tight Junction*-Proteine

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1</b>	<b>Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und akute Kolitis</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.2</b>	<b>Experimentelle DSS-Kolitis</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1.3</b>	<b>Lipoxygenasen</b>	<b>- 4 -</b>
1.3.1	Vorkommen und Nomenklatur	- 4 -
1.3.2	Struktur und katalytische Funktion	- 6 -
1.3.3	Lipoxygenasereaktionen und Lipoxygenaseprodukte	- 7 -
1.3.4	Entzündung	- 9 -
<b>1.3.4.1</b>	<b>Duale Funktion von LOX-Produkten bei der Entzündung</b>	<b>- 10 -</b>
1.3.5	Lipoxygenase bei kolorektalem Karzinom	- 12 -
<b>1.4</b>	<b>Mediatoren bei der experimentellen DSS-Kolitis</b>	<b>- 13 -</b>
1.4.1	Cyclooxygenasen – Prostaglandine und deren Biosynthese	- 13 -
<b>1.4.1.1</b>	<b>Cyclooxygenase 1</b>	<b>- 14 -</b>
<b>1.4.1.2</b>	<b>Cyclooxygenase 2</b>	<b>- 14 -</b>
1.4.2	Tumornekrosefaktor $\alpha$	- 15 -
1.4.3	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	- 15 -
1.4.4	Interleukin-1 $\beta$	- 16 -
1.4.5	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$	- 16 -
<b>1.5</b>	<b>Intestinale Barriere – <i>Tight Junction</i>-Proteine und Kollagen Typ IV</b>	<b>- 17 -</b>
<b>1.6</b>	<b>NF<math>\kappa</math>B-Signalweg</b>	<b>- 18 -</b>
<b>1.7</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>- 19 -</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>- 21 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>- 21 -</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>- 21 -</b>
<b>2.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>- 25 -</b>
2.3.1	Tierversuch	- 25 -
2.3.2	Induktion der DSS-Kolitis	- 25 -
2.3.3	RNA-Isolation und Reverse Transkription	- 26 -

2.3.4	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	- 27 -
2.3.5	Herstellung der Standards für die qRT-PCR	- 30 -
<b>2.3.5.1</b>	<b>PCR und TOPO-Cloning</b>	- 30 -
<b>2.3.5.2</b>	<b>Herstellung von Standardlösungen</b>	- 31 -
2.3.6	Proteinbestimmung, SDS-Elektrophorese und Western Blot	- 31 -
2.3.7	<i>Inverted Sac</i> -Methode	- 32 -
2.3.8	Histologische Färbungen	- 34 -
<b>2.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	- 35 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	- 36 -
<b>3.1</b>	<b>Vorversuch zur Ermittlung der optimalen DSS-Konzentration</b>	- 36 -
<b>3.2</b>	<b>Hauptversuch</b>	- 36 -
3.2.1	Klinische Parameter im Vergleich zwischen Alox15-defizienten Tieren und Wildtyptieren bei der experimentell induzierten DSS-Kolitis	- 36 -
3.2.2	Gewichtsverlauf und Gewichtsverluste	- 38 -
3.2.3	<i>Disease Activity Index</i>	- 40 -
3.2.4	Kolonlänge	- 42 -
<b>3.3</b>	<b>Die Veränderung der intestinalen Barrierefunktion durch DSS <i>in vivo</i></b>	- 44 -
<b>3.4</b>	<b>Differenzielle Genexpression bei DSS-Kolitis</b>	- 45 -
3.4.1	<i>Tight Junction</i> -Proteine und die intestinale Barriere	- 47 -
3.4.2	Lipoxygenasen	- 52 -
3.4.3	Cyclooxygenasen	- 55 -
3.4.4	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	- 57 -
3.4.5	Weitere klassische pro-inflammatorische Zytokine	- 59 -
<b>3.4.5.1</b>	<b>Tumor Nekrose Faktor <math>\alpha</math></b>	- 60 -
<b>3.4.5.2</b>	<b>Interleukin-1<math>\beta</math></b>	- 60 -
3.4.6	Anti-inflammatorische Zytokine	- 61 -
<b>3.5</b>	<b>Veränderung des NF<math>\kappa</math>B-Signalweges</b>	- 63 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	- 65 -
<b>4.1</b>	<b>Interpretation klinischer Parameter bei der akuten DSS-Kolitis</b>	- 65 -
<b>4.2</b>	<b>Störung der Integrität der Darmbarriere durch DSS</b>	- 67 -

4.3	Pro-inflammatorischer Effekt der Alox15 bei der intestinalen Inflammation	- 69 -
4.4	NFκB-Signalweg	- 71 -
4.5	Rolle der Alox15 bei der akuten Entzündung und experimentellen DSS-Kolitis	- 71 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 75 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 76 -

## Abkürzungsverzeichnis

-OH	Hydroxid-Ion
10,17-HDPA	10,17-Dihydroxydocosapentaensäure
11,12-EET	11,12-Epoxy-5Z,8Z,14Z-eicosatriensäure
12-HETE	12-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
13-H(p)ODE	13-Hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadiensäure
14-H(p)DoHE	14-Hydro(pero)xydocosahexaensäure
14,15-EET	14,15-Epoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatriensäure
15-HETE	15-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
15-oxo-ETE	15-Oxo-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
17-H(p)DHA	17-Hydro(pero)xy-4E,7Z,10Z,13Z,15Z,19Z-docosahexaensäure
17-HDHA	17-Hydroxydocosahexaensäure
18-HEPE	18-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaensäure
19-HETE	19-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
20-HETE	20-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
36B4	ribosomales, nicht-reguliertes Protein
5-H(p)ETE	5-Hydro(pero)xy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
5-oxo-ETE	5-Oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
5,6-DiHETE	5,6-Dihydroxyeicosatetraensäure
5,6-EET	5,6-Epoxy-8Z,11Z,14Z-eicosatriensäure
7-MaR1	7(S)-Maresin
8-H(p)ETE	8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8,9-EET	8,9-Epoxy-8Z,11Z,14Z-eicosatriensäure
AA	Arachidonsäure
ALOX	Humane Isoform der Lipoxygenase
Alox	Murine Isoform der Lipoxygenase
ALX	Lipoxin A4 Rezeptor
AMP	Adenosinmonophosphat
ApoE	Apolipoprotein E
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i> )
BSA	Bovine Serum Albumin
BTL1	Leukotrien B <sub>4</sub> -Rezeptor 1

BTL2	Leukotrien B <sub>4</sub> -Rezeptor 2
CD40	Cluster of Differentiation 40
cDNA	<i>copy</i> DNA
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
COX	Cyclooxygenase
COX1	Cyclooxygenase 1
COX2	Cyclooxygenase 2
CU	Colitis Ulcerosa
CYP450	Cytochrom P-450
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
DHA	Docosaheptaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonuclein acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige DNA (engl.: <i>double-stranded DNA</i> )
DSS	Dextran-Natriumsulfat (engl.: <i>Dextrane Sodium Sulfate</i> )
dT18	einzelsträngige Desoxythymidin-Sequenz
EcoRI	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Engl.: <i>Epidermal Growth Factor</i>
eNOS	Epitheliale NO-Synthase
EPA	Eicosapentaensäure
FITC-Dextran	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
FS	Fettsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
H(p)DHA	Hydro(pero)xydocosahexaensäure
H(p)DoHE	Synonym für Hydro(pero)xydocosahexaensäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease Typ II aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i> )
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$

iNOS	induzierbare NO-Synthase
I $\kappa$ B	Inhibitor des NF $\kappa$ B
JAM-A	<i>Junctional Adhesion Molecule A</i>
KHBB	Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer
KRK	Kolorektales Karzinom
LA	Linolensäure (engl.: <i>linolenic acid</i> )
LB	Engl.: <i>Lysogeny Broth</i>
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (engl.: <i>Liquid chromatography mass spectrometry</i> )
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTA <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
LTB <sub>5</sub>	Leukotrien B <sub>5</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leukotrien D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leukotrien E <sub>4</sub>
Lx	Lipoxin
LxA <sub>4</sub>	Lipoxin A <sub>4</sub>
LxB <sub>4</sub>	Lipoxin B <sub>4</sub>
MALT1	Engl.: <i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MC	Morbus Crohn
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MV	Mikrovilli
NF $\kappa$ B	Nuklear Faktor $\kappa$ B
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickoxid (engl.: <i>nitric oxide</i> )
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit-Ion
NOD2	Engl.: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>

p50	NF $\kappa$ B1 (Untereinheit des NF $\kappa$ B)
P <sub>app</sub>	Scheinbare Permeabilität
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDx	Protektin
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGE <sub>3</sub>	Prostaglandin E <sub>3</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandin F <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGG <sub>3</sub>	Prostaglandin G <sub>3</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
pI $\kappa$ B	phosphoryliertes I $\kappa$ B
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl.: <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
qRT-PCR	Quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Engl.: <i>Receptor Activator of NF<math>\kappa</math>B</i>
RelA	NF $\kappa$ B p65-Untereinheit
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
RvD1	Resolvin D1
RvD2	Resolvin D2
SC-560	COX1-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>Sodiumdodecysulfate</i> )
SL	Standardlösung
spp	Lat.: <i>species pluralis</i>
SRS-A	Langsam wirkende Substanzen der anaphylaktischen Reaktion (engl.: <i>slow reacting substance of anaphylaxis</i> )
ssDNA	Einzelsträngige DNA (engl.: <i>single-stranded DNA</i> )
TAE	Tris/Acetat/EDTA

TBS	TBS-Puffer (engl.: <i>Tris-buffered saline</i> )
TCA	Trichloressigsäure (engl.: <i>trichloroacetic acid</i> )
TGF $\beta$	Engl.: <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TJ	Engl.: <i>Tight Junction</i>
TLR	Engl.: <i>toll-like receptor</i>
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNFR	Rezeptor für den Tumor Nekrose Faktor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
TXA	Thromboxan
UL	Urlösung
XL-1 Blue E. coli	Zelllinie aus dem Stamm E. coli zum Klonieren
ZA	Lat.: <i>Zonula Adhaerens</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Lat.: <i>Zonula Occludens</i>

## 1 Einleitung

Die Einleitung soll eine Grundlage für die wichtigsten Themen der Arbeit schaffen. Dazu gehören zunächst epidemiologische Fakten zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der akuten Kolitis. Detailliert wird auf die Frage eingegangen, wie eine Kolitis experimentell mit dem Agens Dextran-Natriumsulfat herbeigeführt werden kann. Desweiteren werden die Lipoxygenasen beschrieben und deren Funktion in verschiedenen Entzündungsmodellen erläutert sowie pro- und anti-inflammatorische Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TGF}\beta$ ), wichtige Komponenten der intestinalen Barriere (Occludin, Claudin-1, Kollagen IV) und pro-inflammatorische Enzyme (COX1, COX2, iNOS) vorgestellt. Anschließend werden der  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg und die intestinale Barriere dargestellt. Am Ende der Einleitung wird das Ziel der vorliegenden Arbeit formuliert.

### 1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und akute Kolitis

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden in zwei Formen unterteilt: die Colitis Ulcerosa (CU) und den Morbus Crohn (MC). Obwohl sich beide Erkrankungen durch ihre anatomische Lokalisation und den Erkrankungsmechanismus unterscheiden, ist das gemeinsame Merkmal eine schubartig überschießende Immunantwort auf intestinale Mikroorganismen, wie *Bacteroides fragilis* und *Clostridium species* (Saleh et al., 2011). Schätzungsweise 320.000 Menschen in Deutschland leiden an einer CED, wobei das erstmalige Manifestationsalter zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade liegt (Xavier et al., 2007). In Deutschland liegt die Inzidenz dieser Erkrankungen bei 4-5/100.000 (Feuerbach et al., 2000). Entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts verursachen beispielsweise in den Vereinigten Staaten jährlich geschätzte Kosten von 1,7 Milliarden US-Dollar (Medicherla et al., 2015). Eine Unterscheidung von CU und MC ist durch die klinische Symptomatik und das Befallsmuster möglich. Bei der CU schreitet die Entzündung kontinuierlich vom Rektum bis maximal zur Bauhin'schen Klappe und verursacht nur Veränderungen in der Mukosa. Die charakteristischen Symptome sind vor allem blutige Diarrhoe mit krampfartigen abdominalen Schmerzen (Ordas et al., 2012). Im Gegensatz dazu findet man beim MC einen segmentalen Befall der gesamten Darmwand. Dieser Befall kann sich von der Mundhöhle bis zum Rektum erstrecken (Baumgart et al., 2012). Charakteristische Symptome sind vor allem abdominelle Schmerzen, Gewichtsabnahme und Diarrhoe

(Riordan et al., 1998). Histologisch kann man einen Abbau der Muzinschicht, eine epitheliale Degeneration sowie Nekrosen mit dem Verschwinden der Epithelzellen sehen (Perse et al., 2012). Lange Zeit wurde bei den CED von einem reinen Autoimmungeschehen ausgegangen. Mittlerweile ist dieser Ansatz überholt und man geht von einer komplexen Barriere-Erkrankung aus (Wehkamp et al., 2016). Zusätzlich fanden Ahmad et al. (2017) heraus, dass die Dysfunktion der intestinalen Barriere mit einer Zunahme der Darmwandpermeabilität einhergeht. Die einzigen Therapieansätze sind zurzeit die Suppression des Immunsystems durch Immunsuppressiva wie Glukokortikoide und Purinanaloga oder die Therapie mit *Biologicals* wie TNF $\alpha$ -Blockern um den inflammatorischen Prozess zu beenden (Baumgart, 2009). Aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten und damit einhergehenden Langzeitnebenwirkungen werden neue Therapieformen erforscht, wie beispielsweise die Rolle von humanen Stammzellen bei den CED oder deren Einfluss auf die Alox15 (Mao et al., 2017).

Obwohl die Inzidenz dieser Erkrankung zunimmt, ist die Ätiologie der CED aufgrund des komplexen Pathomechanismus noch immer weitgehend unklar. Es ist bekannt, dass zahlreiche Faktoren wie Umweltfaktoren, der genetische Hintergrund (familiäre Belastung), Veränderungen der intestinalen Mikrobiome und oxidativer Stress eine Rolle bei der Ausprägung der CED spielen (Yin et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit werden mögliche Pathomechanismen besprochen und experimentell unterstützt.

Dem Arachidonsäure(AA)-Stoffwechsel wird eine große Bedeutung zugewiesen. Die Stoffwechselprodukte der AA wie 12-HETE, 15-HETE oder Lipoxine, die u.a. durch Lipoxygenasen entstehen, haben einen Einfluss auf die CED. So zeigten Pochard et al. (2016) und Mangino et al. (2006), dass die untersuchten Stoffwechselprodukte der Lipoxygenasen, 15-HETE und Lipoxine, einen anti-inflammatorischen Effekt im Krankheitsmodell der CED haben. Eine weitere Rolle spielt die gestörte Expression von *Tight Junction* (TJ)-Proteinen, wie ZO-1 und Occludin, der intestinalen Barriere (J. Zhao et al., 2015). Diese TJ-Proteine verbinden als interzelluläre Proteine die Epithelzellen der Darmmukosa miteinander, sodass ein Stoffaustausch zwischen Darmlumen und Blut nicht parazellulär, sondern nur transzellulär möglich ist (Lüllmann-Rauch, 2003). Ist diese Barriere gestört, kommt es zur Durchmischung der intrainestinalen und extraintestinalen Flüssigkeitskompartimente. Dadurch können einerseits intestinale Bakterien, Toxine und Pathogenantigene unkontrolliert ins Blut gelangen. Andererseits können zelluläre (z.B.

Immunzellen, wie T-Zellen und dendritische Zellen) und lösliche Bestandteile des Blutplasmas (z.B. Komplementproteine) ins Darmlumen gelangen und dort Immunreaktionen auslösen, die zu einer weiteren Schädigung von Epithelzellen und TJs führen (Clayburgh et al., 2004). Dies kann die Initiierung einer Entzündungskaskade hervorrufen, die zur Ausbildung des charakteristischen Symptomkomplexes einer Kolitis mit Diarrhoe und abdominalen Schmerzen führt.

## 1.2 Experimentelle DSS-Kolitis

Dextran ist ein komplexes Polymer aus Glucoseeinheiten, welches durch verschiedene Bakterien wie *Streptococcus spp.* und *Leuconostoc spp.* aus Saccharose synthetisiert wird. Es besitzt sowohl verzweigte als auch unverzweigte Ketten und weist eine starke Variabilität im Molekulargewicht auf, welche von zirka 5.000 bis 1,4 Mio. Dalton (Da) reicht. Das in den vorliegenden Versuchen verwendete Dextran-Natriumsulfat (DSS) wiederum ist ein polyanionisches Derivat des Dextrans, welches durch Veresterung des Dextrans mit Chlorsulfonsäure entsteht (Solomon, 2010). Marcus et al. (1969) fanden heraus, dass man mithilfe von DSS akute Kolitiden in Tiermodellen induzieren kann. Dieses Tiermodell wurde für die tierexperimentelle Forschung optimiert und ist heute ein wichtiger Bestandteil für die Analyse von Pathomechanismen entzündlicher Darmerkrankungen (Perse et al., 2012). Hinsichtlich der Ätiologie, Pathologie, Symptomausprägung und der therapeutischen Ansprechbarkeit ähnelt die DSS-Kolitis humanen entzündlichen Darmerkrankungen (Solomon, 2010). Hauptsymptome der DSS-Kolitis sind Gewichtsverlust, Diarrhoe und blutiger Stuhl. Als histologisches Korrelat werden epitheliale Degenerationen, Infiltration der *Lamina propria* und Submukosa mit neutrophilen Granulozyten sowie der Abbau der Muzinschicht beschrieben. Die Infiltration von neutrophilen Granulozyten wird initial als Kryptitis bezeichnet. Schreitet der Entzündungsprozess weiter fort, kann sich ein Kryptenabszess entwickeln (Perse et al., 2012).

Konzentration und Applikationsdauer des DSS sind nicht nur für die Art der Kolitis (akut, chronisch) bedeutsam, sondern bestimmen auch den Schweregrad des Krankheitsbildes. Um eine akute Kolitis zu induzieren, sollten 2 bis 5 % DSS dem Trinkwasser zugefügt werden und dieses für eine kürzere Zeit (z.B. 4 bis 9 Tage) verabreicht werden (Perse et al., 2012). Geringere Konzentrationen, die über einen längeren Zeitraum gegeben werden oder eine intermittierende Gabe von DSS (z.B. 4 Zyklen á 7 Tage DSS,

dazwischen 10 Tage Gabe von unbehandeltem Trinkwasser) führen dagegen zu einer chronischen Entzündung (Perse et al., 2012). Obwohl die DSS-induzierte Kolitis der Maus ein etabliertes Krankheitsmodell zur Untersuchung akuter und chronischer Kolitiden ist, sind die molekularen Mechanismen, die der DSS-Wirkung zugrunde liegen, bisher noch nicht vollständig verstanden. Perse et al. (2012) gehen davon aus, dass DSS eine toxische Wirkung auf das Kolonepithel ausübt, wodurch es zu einem Epitheldefekt und damit zu einer Beeinträchtigung der Kolonbarriere kommt. Dieser Epitheldefekt führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Kolonwand. Erste detektierbare Veränderungen sind eine Zunahme der Expression pro-inflammatorischer Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ) und eine Abnahme der Expression von TJ-Proteinen (Claudin-1, Occludin) (Azuma et al., 2013). Durch diese Schädigung ist es großen Molekülen wie dem DSS möglich, die Barriere zu überwinden. Ob DSS dabei initial das Darmepithel transzellulär oder parazellulär passiert, ist nicht bekannt (Perse et al., 2012). Weiterhin fanden Okayasu et al. (1990) heraus, dass die DSS-Kolitis zu gravierenden Veränderungen im intestinalen Mikrobiom führt. Mäuse, die mit DSS behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere Anzahl von *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, und *Clostridium spp.* im Darmlumen.

### 1.3 Lipoxygenasen

Im Folgenden Abschnitt werden die Lipoxygenasen näher beschrieben. Dabei wird insbesondere auf das Vorkommen und die Nomenklatur, die Struktur und Funktion sowie die katalysierten Reaktionen der Lipoxygenase und deren Produkte eingegangen. Am Ende wird die duale Rolle der Lipoxygenase bei der Entzündung und auch bei der Entstehung vom kolorektalen Karzinom anhand von Beispielen beleuchtet.

#### 1.3.1 Vorkommen und Nomenklatur

Lipoxygenasen (LOX) gehören zu einer heterogenen Familie von Dioxygenasen, die als katalytisch aktive Komponente ein Nicht-Hämeisen enthalten. Sie katalysieren die Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) (Ivanov et al., 2010) und kommen in zwei (*Bacteria*, *Eucarya*) der drei Domänen des irdischen Lebens vor (Ivanov et al., 2015). Bei Vertebraten sind Arachidonsäure (AA,  $\text{C}_{20}\Delta_{5,8,11,14}$ ) und Linolensäure (LA,  $\text{C}_{18}\Delta_{9,12}$ ) die dominanten LOX-Substrate (Kuhn et al., 2015). Die Nomenklatur und die Subklassifizierung von Lipoxygenasen ist kompliziert und beruht auf ausgewählten Eigenschaften der Enzyme. Dabei wurden die evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen der LOX-Isoformen unberücksichtigt gelassen (Kuhn et al.,

2015). Das humane Genom enthält sechs LOX-Gene (*ALOX5*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *ALOX12*, *ALOX15B*, *ALOX15*), die sich mit Ausnahme des *ALOX5*-Gens (Chromosom 10) auf dem Chromosom 17 befinden. Diese sechs Gene codieren sechs verschiedene humane LOX-Isoformen, die unterschiedliche biologische Funktionen haben (Funk et al., 2002). Bei der Maus gibt es zu jedem humanen LOX-Gen ein entsprechendes Ortholog (Funk et al., 2002). Auch hier stellt die murine *Alox5* eine Ausnahme dar, deren Gen auf dem Chromosom 6 zu finden ist. Die anderen murinen LOX-Gene liegen auf Chromosom 11. Zusätzlich zu den oben genannten sechs LOX-Genen enthält das murine Genom ein funktionelles *Alox12*-Gen, welches beim Menschen ein funktionsloses Pseudogen ist (Ivanov et al., 2015). Ursprünglich lag der LOX-Nomenklatur die Reaktionsspezifität der Isoformen bei der Oxygenierung von AA zugrunde. Diese Nomenklatur besagt, dass beispielsweise die *ALOX5* selektiv das fünfte C-Atom der Kohlenwasserstoffkette der AA oxygeniert. Da aber einige Lipoxygenasen die AA an mehreren C-Atomen oxygenieren können, ist diese Nomenklatur nicht eindeutig (Ivanov et al., 2010). Außerdem besitzen orthologe LOX-Isoformen verschiedener Spezies nicht selten unterschiedliche Reaktionsspezifitäten, sodass sie entsprechend der konventionellen LOX-Nomenklatur in verschiedene Subfamilien eingruppiert werden. Kürzlich wurde vorgeschlagen, die Nomenklatur der humanen Gene zu nutzen, um die entsprechende Isoform anderer Säugetiere zuzuordnen (Kuhn et al., 2015) (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1: Funktionelle humane ALOX-Gene und Hauptexpressionsorte der entsprechenden Enzyme (modifiziert nach Kuhn et al., 2015)**

Mensch	Früherer Name	Maus	Früherer Name	Hauptexpression durch	Referenzen
ALOX15	12/15-LOX	<i>alox15</i>	<i>lc12-LOX*</i>	Eosinophile, Bronchialepithel	(Conrad et al., 1992; Sun et al., 1996)
ALOX15B	15-LOX2	<i>alox15b</i>	8-LOX	Haarwurzeln, Haut, Prostata	(Brash et al., 1997; Jisaka et al., 1997)
ALOX12	<i>pl12-LOX**</i>	<i>alox12</i>	<i>pl12-LOX</i>	Thrombozyten, Haut	(Funk et al., 1990; Virmani et al., 2001)
ALOX12B	12R-LOX	<i>alox12b</i>	12R-LOX	Haut	(Boeglin et al., 1998; Meruvu et al., 2005)
ALOXE3	eLOX3	<i>aloxe3</i>	eLOX3	Haut	(Kinzig et al., 1999; Krieg et al., 2014)
ALOX5	5-LOX	<i>alox5</i>	<i>alox5</i>	Leukozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	(Funk et al., 1989; Wasilewicz et al., 2010)

\**lc* – leukocyte-type, \*\**pl* – platelet-type

### 1.3.2 Struktur und katalytische Funktion

Säugetier-Lipoxygenasen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich in eine Zweidomänenstruktur faltet. Die kleinere N-terminale Domäne besteht aus mehreren parallelen und anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern. Diese Domäne ist vor allem für die Membranbindung der Enzyme verantwortlich, spielt aber auch für die Regulation der katalytischen Aktivität eine Rolle (Kuhn et al., 2015). Die C-terminale Domäne hingegen besteht aus mehreren  $\alpha$ -Helices und enthält das katalytisch aktive Nicht-Häm-Eisen (Abb. 1.3-2).

Die LOX-Reaktion setzt sich aus vier aufeinanderfolgenden Elementarreaktionen zusammen (Abb. 1.3-3) und umfasst folgende Schritte:

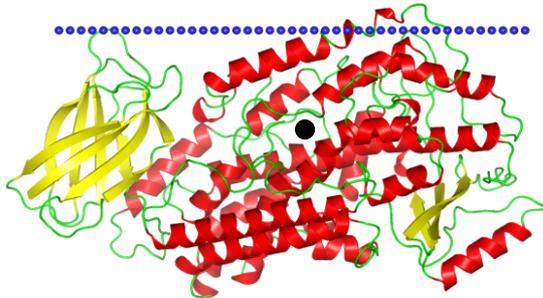


Abb. 1.3-2: Dreidimensionale Struktur der Kaninchen-Alox15: die N-terminale Domäne (gelb), die C-terminale Domäne (rot). Das Nicht-Häm-Eisen ist schwarz. Die Plasmamembran wird durch die blauen Punkte symbolisiert. (modifiziert nach Lomize et al. (2005-2013))

Gesamtreaktion (Brutsch et al., 2015).

- i. Abspaltung eines Wasserstoffatoms von einer doppelallyständigen Methylengruppe. Dies führt zur Bildung eines Fettsäureradikals.
- ii. Umordnung des Fettsäureradikals.
- iii. Einführung von molekularem Sauerstoff (Bildung eines Peroxidradikals).
- iv. Reduktion des Hydroperoxidradikals zum Peroxid anion.

Die Wasserstoffabspaltung ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der

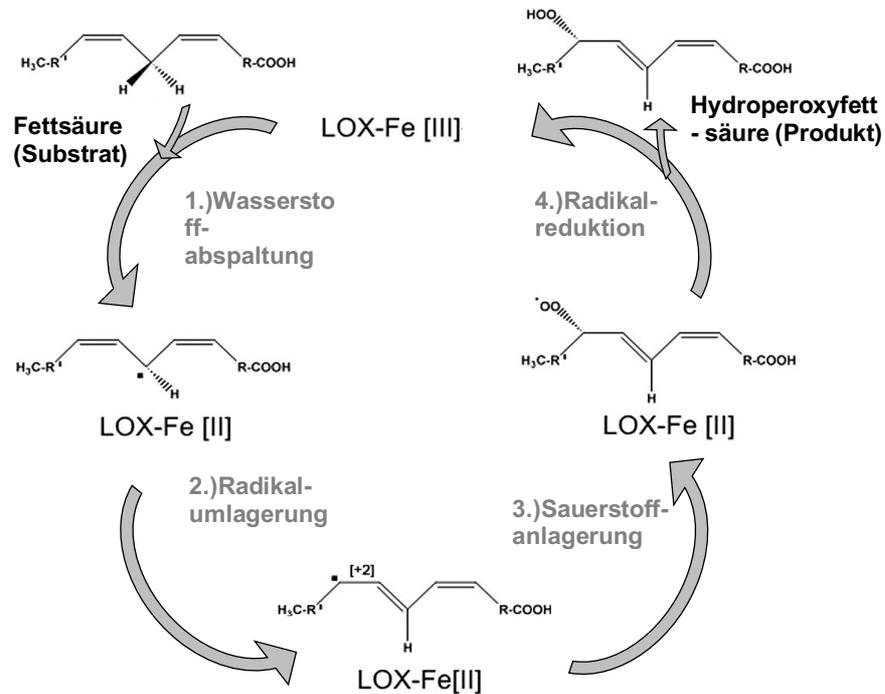


Abb. 1.3-3.: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen (modifiziert nach Ivanov et al. (2010): 1.) Wasserstoff wird von einer doppelallylständigen Methylgruppe abgespalten (geschwindigkeitsbestimmender Schritt). 2.) Das Radikal wandert in Richtung des Methyl- (+2) oder Carboxyl-Endes (-2). 3.) Sauerstoff wird angelagert. 4.) Das Fettsäureradikal wird zu einer Hydroperoxyfettsäure reduziert. Das Elektron hierfür stammt vom dreiwertigen Eisen ( $\text{Fe[III]}$ ).

### 1.3.3 Lipoxygenasereaktionen und Lipoxygenaseprodukte

Verschiedene LOX-Isoformen weisen verschiedene katalytische Aktivitäten auf (Ivanov et al., 2015). Lipoxygenasen können die Synthese von Signalmolekülen initiieren (Leukotriene, Eoxine, Lipoxine) oder tragen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen von Zellen bei (Haeggstrom et al., 2011). Nach hydrolytischer Spaltung der Membranphospholipide durch Phospholipasen A2 ( $\text{PLA}_2$ ) (Mancini et al., 2011) werden Polyenfettsäuren (u.a. AA, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA)) freigesetzt und stehen dann als LOX-Substrate zur Verfügung (Haeggstrom et al., 2011). Diese Fettsäuren werden im Rahmen der AA-Kaskade durch Cyclooxygenasen (COX) zu Prostaglandinen (zyklische Eicosanoide;  $\text{PGG}_2$  bei AA und  $\text{PGG}_3$  bei EPA), Prostazyklin und Thromboxan (TXA) umgewandelt. Alternativ dazu können diese Substrate durch Lipoxygenasen zu verschiedenen Hydroperoxyderivaten (lineare Eicosanoide, 15-HpETE bei AA und 17-HpDHA bei DHA) umgewandelt werden (Le Faouder et al., 2013). Die Produkte des LOX-Stoffwechselweges sind vor allem bioaktive Lipidmediatoren wie Leukotriene (Savari et al., 2014), Lipoxine (Romano, 2010),

Resolvine (Yoo et al., 2013), Protektine (Serhan et al., 2011) und weitere Lipidmediatoren aus den Fettsäuren AA, EPA und DHA. Zusätzlich zu den COX- und LOX-Stoffwechselwegen gibt es noch einen weiteren Weg, über den durch Cytochrom P450 (CYP450) katalysierte Reaktionen andere Lipidmediatoren synthetisiert werden (Abb. 1.3-1).

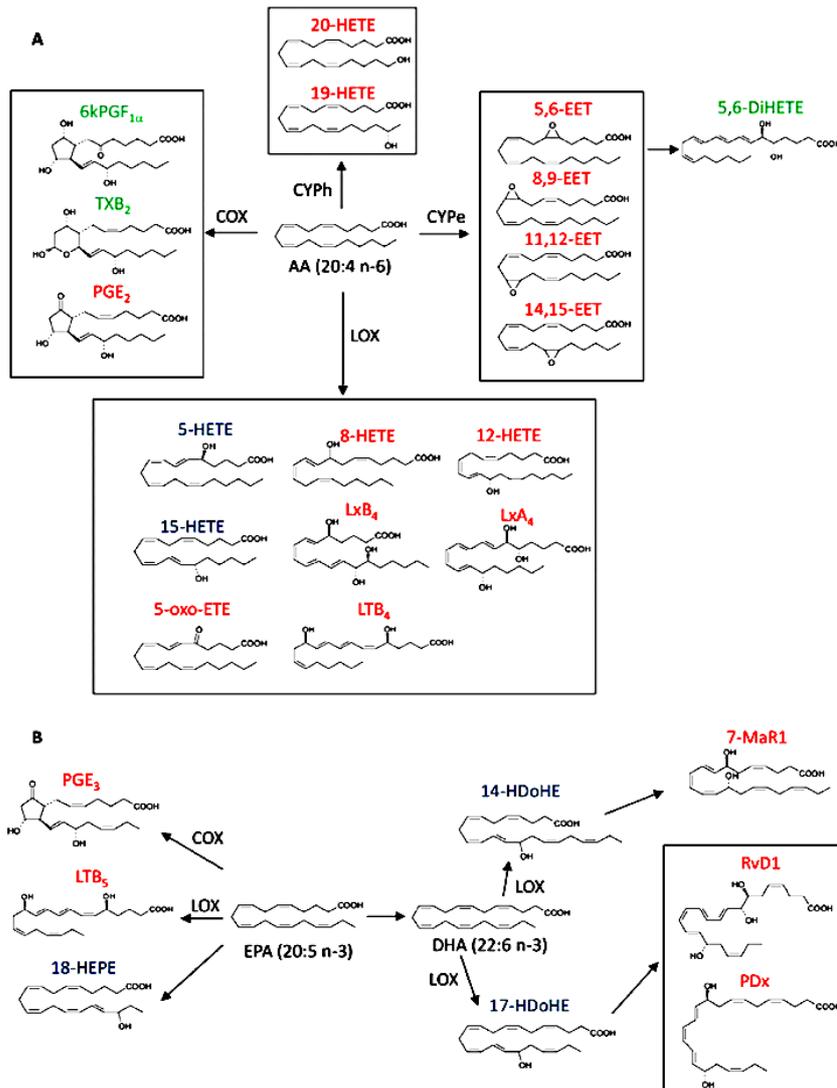


Abb.: 1.3-1: Stoffwechselweg der PUFA (nach Le Faouder et al., 2013): Die Abbildung fasst die bioaktiven Mediatoren (rot), Stoffwechsellmarker (blau) und inaktiven Produkte (grün) zusammen. **A:** Es gibt vier wichtige Stoffwechselwege über die AA metabolisiert werden kann: Der Cyclooxygenase(COX)-Stoffwechselweg, der 6-keto-Prostaglandin F1 (6kPGF<sub>1</sub>), Thromboxan B2 (TXB<sub>2</sub>) und Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) generiert; Der Lipoxygenase (LOX)-Stoffwechselweg, der 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE), 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE, Lipoxin A4 (LxA<sub>4</sub>), LxB<sub>4</sub>, 5-Oxo-eicosatetraensäure (5-oxo-EETE) und Leukotrien B4 (LTB<sub>4</sub>) generiert; Der CYP-Hydrolase-Stoffwechselweg, der 19-HETE und 20-HETE generiert, sowie der Cytochromepoxygenase (CYPe)-Stoffwechselweg, der 5,6-Epoxyeicosatriensäure (5,6-EET) und 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET und 5,6-Dihydroxy-Eicosatetraensäure (5,6-DiHETE) generiert. **B:** Aus Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) kann durch Einwirkung von LOX oder COX PGE<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub>, 18-Hydroxyeicosapentaensäure (18-HEPE), 17-hydroxy-Docosahexaensäure (17-HDoHE), 14-HDoHE, Resolvin D1 (RvD1), 7(S)-Maresin (7-MaR1) und 10(S),17(S)-Protektin (PDX) entstehen.

### 1.3.4 Entzündung

Lipoxygenasen sind die Schlüsselenzyme bei der Synthese der linearen Eicosanoide (Leukotriene, Lipoxine, Resolvine, Protektine, Maresine, Hepoxiline u.a.). Diese Mediatoren spielen bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen und bei der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen eine wichtige Rolle (Belkner et al., 1991; Schewe et al., 1975; Serhan et al., 2011; Yoo et al., 2013). Dabei ist die Funktion der Enzyme nicht auf die Bildung bioaktiver Mediatoren beschränkt (Kuhn et al., 2015). So tragen Lipoxygenasen auch einen wichtigen Teil zum Redox-Status der Zelle bei. Durch diesen wird u.a. das zelluläre Expressionsprofil gesteuert (Kuhn et al., 2015). Der Redox-Status beeinflusst auf transkriptionalen und post-transkriptionalen Ebenen eine Zellpopulation und kann dadurch den Phänotypen dieser Zellen bestimmen. Die Homöostase des Redox-Status einer Zelle ist vom Gleichgewicht pro- und anti-oxidativer Prozesse abhängig. Lipoxygenasen bilden in diesem Gleichgewicht einen Teil der pro-oxidativen Verbindungen, welche Einfluss auf Redox-abhängige Transkriptions- oder Translationsfaktoren haben (Kuhn et al., 2015).

Die Entzündung ist eine Reaktion des Organismus auf einen entzündungserregenden Reiz, z.B. eindringende Pathogene. Ihr Ziel ist es, diese eingedrungenen Pathogene zu bekämpfen und dabei dem Wirtsorganismus möglichst wenig Schaden zuzufügen. Zu diesem Zweck muss die Intensität der Entzündungsreaktion den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden. Es sind zahlreiche Entzündungsmediatoren bekannt, und einige von ihnen werden als LOX-Produkte synthetisiert. Dabei zählen Leukotriene (LT) wie Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) zu den klassischen pro-inflammatorischen Mediatoren der akuten Entzündung (Haeggstrom et al., 2011; Radmark et al., 2010). LTs werden in verschiedenen Typen von Leukozyten synthetisiert. Das Schlüsselenzym der LT-Biosynthese ist die ALOX5, welche die ersten beiden Schritte (Oxygenierung von AA zu 5-HpETE und Umwandlung von 5-HpETE in LTA<sub>4</sub>) der Leukotrienbiosynthese katalysiert (Haeggstrom et al., 2011; Radmark et al., 2007). Generell gibt es zwei verschiedene Arten von LTs: Peptid-LTs und peptidfreie LTs. Die unterschiedlichen LTs zeigen unterschiedliche Aktivitäten und interagieren mit verschiedenen Zelltypen. Die Peptid-LTs wie LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> sind Komponenten der *slow reacting substance of anaphylaxis* (SRS-A) und spielen bei der Pathogenese von allergischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale (Singh et al., 2013) und der allergischen Rhinitis (Cobanoglu et al., 2013) eine wichtige Rolle. Peptid-LTs besitzen zudem eine höhere Effektivität als der

Bronchiokonstriktor Histamin (Dahlen et al., 1981; Dahlen et al., 1980). Zusätzlich bewirken Peptid-LTs eine gesteigerte Sekretion des Bronchialschleims und eine Zunahme der Mukusviskosität (Kaliner et al., 1986; Peatfield et al., 1982). Unter den peptidfreien LTs spielt das Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) eine besondere Rolle (Le Bel et al., 2014). Es wird von polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen und Monozyten aus AA (Kuhn et al., 2015) über LTA<sub>4</sub> synthetisiert, wobei die ALOX5 auch hierbei wesentlich beteiligt ist. Laut Smith (1981) induziert LTB<sub>4</sub> die Zellaggregation und erhöht die vaskuläre Permeabilität, wodurch seine starke pro-inflammatorische Wirkung erklärt werden kann. Es bindet spezifisch an zwei G-Protein-gekoppelte Zelloberflächenrezeptoren (BLT1, BLT2), was zur Aktivierung inflammatorischer Zellen, wie Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und differenzierte Th-Zellen u.a., führt (Hicks et al., 2007; Yokomizo, 2011).

#### **1.3.4.1 Duale Funktion von LOX-Produkten bei der Entzündung**

Die Ansicht, dass die Beendigung einer akuten Entzündung ein passiver Prozess sei, der durch das Verschwinden des entzündungserregenden Stimulus eingeleitet wird (Serhan et al., 2011), scheint inzwischen überholt zu sein. Mittlerweile geht man von einem aktiven Prozess aus, der sich Resolution nennt und in dem die Wiederherstellung der Gewebshomöostase angestrebt wird (Freire et al., 2013). Diese inflammatorische Resolution wird durch Mediatoren eingeleitet und ist geprägt von einem *Switch* der Lipidmediatoren von pro-inflammatorischen Leukotrienen zu anti-inflammatorischen Lipoxinen bzw. Resolvinen (Serhan et al., 2005). Dabei ist der Phänotyp aller Makrophagen abhängig von der Mischung aus Zytokinen, Mediatoren und Metaboliten, die zu diesem Zeitpunkt am Ort der Entzündung gebildet werden (Gordon et al., 2010). So werden beispielsweise durch einen Wechsel der inflammatorischen Signale pro-inflammatorische M1-Makrophagen durch M2-Makrophagen ersetzt, die die Entzündungsreaktion beenden bzw. abmildern (Sica et al., 2012). Weiterhin wird die Bildung von pro-inflammatorischen Lipidmediatoren wie PGs und LTs herunterreguliert und die Biosynthese von anti-inflammatorischen Mediatoren hochreguliert (Kuhn et al., 2015). Endogene Lipidmediatoren, welche die inflammatorische Resolution initiieren (beispielsweise Lipoxine, Resolvine oder Protektine), sind Produkte des LOX-Stoffwechsels. Durch anti-inflammatorische Eicosanoide werden unterschiedliche Prozesse induziert. Dazu gehören u.a. die reduzierte Migration der Leukozyten (Fierro et

al., 2003), die Normalisierung der vaskulären Permeabilität (Ereso et al., 2009), die Apoptose pro-inflammatorischer neutrophiler Granulozyten (El Kebir et al., 2013) und die Phagozytose dieser apoptotischen neutrophilen Granulozyten, von Bakterienresten und nekrotischem Detritus durch M2-Makrophagen (Ohira et al., 2010). Gemeinsames Ziel dieser Prozesse ist die Wiederherstellung der normalen Gewebearchitektur. Ist die inflammatorische Resolution erfolgreich, führt dies zur *Restitutio ad integrum*. Wird die inflammatorische Resolution jedoch in irgendeiner Form gestört, geht die initial akute Entzündung in einen chronischen Prozess über (Kuhn et al., 2015).

Der bereits angesprochene duale Charakter der Lipoxygenase zeigt sich in den unterschiedlichen Forschungsergebnissen vieler entzündlicher Krankheitsmodelle. Auf der einen Seite stehen Ergebnisse von Kronke et al. (2009), die zeigen, dass die Alox15 im Krankheitsmodell der Arthritis eine anti-inflammatorische und gewebsschützende Wirkung besitzt. Auch Gronert et al. (2005) wiesen in ihren Studien zur Rolle der Lipoxine bei der Wundheilung darauf hin, dass die physiologische Rolle der Alox15 darin besteht, die Entzündung abzuschwächen und die Wundheilung zu fördern. Weiterhin fassten Mao et al. (2015) in einem Übersichtsartikel Ergebnisse zusammen, welche ebenfalls für eine anti-inflammatorische Wirkung der Alox15 beim Kolitis-induzierten kolorektalen Karzinom (KRK) sprechen. Auf der anderen Seite räumten die Autoren ein, dass die Funktion der Alox15 im Entzündungsgeschehen sehr komplex sei und sowohl eine pro- als auch anti-inflammatorische Rolle der beteiligten Zytokine, Prostaglandine und Immunzellen nachgewiesen werden konnte. *In vivo* werden anti-inflammatorische Eicosanoide durch konsekutive Reaktionen verschiedener LOX-Isoformen (z.B. zuerst ALOX5 und anschließend ALOX15 oder ALOX12) synthetisiert (Sala et al., 2010). Lipoxine werden aus der  $\Omega$ 6-Fettsäure AA hergestellt, während Resolvine und Protectine aus den  $\Omega$ 3-Fettsäuren EPA und DHA synthetisiert werden. Diese Fettsäuren, deren anti-inflammatorische Eigenschaften bekannt sind, findet man vor allem in hohen Konzentrationen in Meerestieren (Fischöl) (Horrocks et al., 1999). Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von einigen Isoformen der LOX (ALOX12, ALOX15, ALOX15B) sind jedoch nicht auf die Biosynthese von pro-resolutorisch wirkenden Lipidmediatoren beschränkt. Die Metaboliten der ALOX15 (z.B. 13S-HpODE) sind beispielsweise in der Lage, den Signalweg von PPAR $\gamma$  zu aktivieren (Altmann et al., 2007; Limor et al., 2008), wodurch anti-inflammatorische Reaktionen initiiert werden (Martin, 2010).

Hinweise auf eine pro-inflammatorische Wirkung der Alox15 wurden dagegen von Green-

Mitchell et al. (2013) präsentiert. NOD (*Non-obese diabetic*)-Mäuse, die ein Tiermodell für Diabetes mellitus Typ I darstellen, wurden mit Alox15-defizienten Mäusen verpaart, sodass NOD-Alox15<sup>null</sup> Mäuse entstanden. Diese Tiere waren fast vollständig vor der Entstehung des Diabetes mellitus Typ I geschützt. In diesem Modell exprimierten Makrophagen keine Alox15, was zu einer veränderten Expression von pro-inflammatorischen Genen (z.B. IL-1 $\beta$ ) führte. Dadurch wurde die Entzündung der Inselzellen verringert. In Untersuchungen zur Atherosklerose zeigten L. Zhao et al. (2004), dass die Bildung von atherosklerotischen Läsionen in Alox15-defizienten Mäusen reduziert war.

### 1.3.5 Lipoxxygenase bei kolorektalem Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist in Europa mit einer Inzidenz von 20-40/100.000 pro Jahr die zweithäufigste krebserkrankte Todesursache bei Männern (nach dem Lungenkarzinom) und Frauen (nach dem Mammakarzinom) (Herold, 2014). Es entsteht fast immer über Adenome, die endoskopisch diagnostiziert und abgetragen werden können. Ein Mechanismus der Karzinogenese ist die entzündliche Form (Nowak et al., 2007). Hierbei kommt es aufgrund einer chronischen Entzündung des Darmes zu einer permanenten oxidativen Belastung der Darmepithelzellen und somit im weiteren Verlauf zur Modifizierung ihres genetischen Materials (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2016). Dieser Mechanismus liefert eine plausible Erklärung für die Beobachtung, dass bei CEDs, wie MC und CU, das Risiko einer malignen Entartung höher ist als bei der Durchschnittsbevölkerung (Herold, 2014). Wie auch bei der akuten Entzündung ist die Rolle der ALOX15 beim KRK noch nicht gänzlich geklärt (Kuhn et al., 2015). Shureiqi et al. (2010) verglichen in einer Studie die Konzentrationen der LOX-Metabolite (12-HETE, 15-HETE und LTB<sub>4</sub>) im Mukus von normalem Darmgewebe, Schleimhautpolypen und Tumorgewebe eines KRK. Dabei fanden sie keine signifikanten Unterschiede der 12-HETE-, 15-HETE- und LTB<sub>4</sub>-Level in den untersuchten Geweben. Im Gegensatz dazu wurde während des Fortschreitens der Karzinogenese ein stetiger Abfall der Konzentration von 13S-HODE gefunden. Physiologisch aktiviert 13S-HODE PPAR $\gamma$ , was zu der Herunterregulation der Entzündungsreaktion führt (Mao et al., 2015). Ist 13S-HODE nun im Gewebe von Schleimhautpolypen oder Tumorgewebe niedriger exprimiert als im normalen Darmgewebe, kann es über PPAR $\gamma$  nicht die Kolitis und die Kolitis-induzierte Entstehung vom KRK verhindern. Weiterhin fanden Mao et al. (2015) heraus,

dass bei humanen KRK eine Induktion der ALOX15-Expression mit einer Herunterregulation der IL-1 $\beta$ -Expression assoziiert ist. Die Studien von Mao et al. (2015) und Shureiqi et al. (2010) sprechen somit für einen anti-inflammatorischen und anti-Tumor-Effekt der ALOX15. Aber auch hier gibt es gegenteilige Befunde. So erhielten beispielsweise Yoshinaga et al. (2004) Daten, die auf eine pro-karzinogene Wirkung der ALOX15 hinweisen. In ihren Untersuchungen konnten sie feststellen, dass es durch LOX-Produkte zu einer Dysregulation des Zellzyklus kommt, was die Proliferationsgeschwindigkeit der Zelle erhöht. Dabei spielen anti-oxidative Enzyme wie die Glutathionperoxidasen (GPXen), eine wichtige Rolle. Diese Enzyme regulieren antagonistisch zu den Lipoxygenasen den Redox-Status von Zellen, und sind somit als wichtiges regulatorisches Element des Zellzyklus identifiziert worden (J. Chiu et al., 2012). Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die ALOX15 bei der Karzinogenese des KRK eine ebenso duale Rolle spielt, vergleichbar mit der bei der Entzündungsreaktion.

#### **1.4 Mediatoren bei der experimentellen DSS-Kolitis**

Da die Kolitis eine entzündliche Darmerkrankung darstellt, ist das Zusammenspiel von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren für die Pathogenese von ausschlaggebender Bedeutung. Um den Schweregrad und die Pathomechanismen zu charakterisieren, die der experimentellen Kolitis zugrunde liegen, stehen die Expressionsprofile von pro- und anti-inflammatorischen Transkripten im Fokus. Für die vorliegende Arbeit wurden eine Reihe solcher Genprodukte ausgewählt, die an dieser Stelle kurz eingeführt werden.

##### **1.4.1 Cyclooxygenasen – Prostaglandine und deren Biosynthese**

Arachidonsäure (AA), deren Metabolite eine wichtige Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen spielen, kann nach Freisetzung aus den Membranphospholipiden über einen der drei Hauptwege der AA-Kaskade metabolisiert werden (Abb. 1.3-1): i) COX-Weg, ii) LOX-Weg oder iii) Cytochrom P-450(CYP450)-Weg. Hier soll der Weg der Cyclooxygenasen besprochen werden, die auch als Prostaglandin H-Synthasen oder Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen bezeichnet werden (Chandrasekharan et al., 2004). Die dominanten bioaktiven Metabolite des COX-Weges sind die klassischen Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), das Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) und das Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>).

Diese Verbindungen, die auch als zyklische Eicosanoide oder Prostanoide bezeichnet

werden, regulieren eine Anzahl biologischer Prozesse wie Schlaf-Wach-Rhythmus, Nierendurchblutung, Wasser- und Elektrolythaushalt, Magensaftproduktion, Schmerzempfinden (Püschel, 2011) und Thrombozytenaggregation (Karow, 2015). Die Biosynthese der PGs ist abhängig von der Expression des Schlüsselenzyms dieses Stoffwechselweges, der COX. Für dieses Enzym gibt es zwei unterschiedliche Isoformen (Cyclooxygenase 1 und 2), die sich hinsichtlich ihrer proteinbiochemischen und enzymatischen Eigenschaften voneinander unterscheiden, obwohl sie die gleiche Reaktion (Oxygenierung von AA in PGG<sub>2</sub> und anschließende Reduktion von PGG<sub>2</sub> zu PGH<sub>2</sub>) katalysieren (Chen et al., 2011). Die beiden Isoformen werden durch unterschiedliche Gene kodiert, deren Expression differentiell reguliert wird. Laut Sklyarov et al. (2011) sind PGs, die über den Cyclooxygenase 1 (COX1)-Weg synthetisiert werden, für physiologische Wirkungen bedeutsam (z.B. Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes in den Nieren, die Regulation der Vasomotorik und der Blutgerinnung, Magensaftsekretion und Gastroprotektion). Demgegenüber stehen die Produkte des Cyclooxygenase 2 (COX2)-Wegs, die vor allem für Entzündungsprozesse verantwortlich sind (Reuter et al., 1996).

#### **1.4.1.1 Cyclooxygenase 1**

Die Cyclooxygenase 1 (COX1) wurde über einen langen Zeitraum als das alleinige Enzym angesehen, welches die Bildung der Prostaglandine initiiert. 1976 wurde die COX1 erstmalig aus der Bläschendrüse von Rindern isoliert (Hemler et al., 1976). Sie wird konstitutiv in zahlreichen Geweben und Zellen exprimiert (Chandrasekharan et al., 2004). Die COX1 ist u.a. für die Produktion zytoprotektiver PGs wie PGE<sub>2</sub> verantwortlich. PGE<sub>2</sub> ist ein wichtiger Regulator der Magenwanddurchblutung und trägt wesentlich zur Bildung des protektiven Magenschleims bei. Dadurch wird die Magenschleimhaut vor der destruktiven Wirkung der Salzsäure und der proteolytischen Enzyme geschützt, wodurch die strukturelle und funktionelle Integrität der Magenschleimhaut erhalten bleibt (Williams et al., 1999). Okayama et al. (2007) und Nitta et al. (2002) fanden heraus, dass eine Hemmung der COX1 durch einen selektiven COX1-Hemmer (SC-560) das Auftreten von Darmulzerationen und Kolonentzündungen fördert.

#### **1.4.1.2 Cyclooxygenase 2**

Im Gegensatz zur COX1 wird die 1989 von Simmons et al. entdeckte Cyclooxygenase 2 (COX2) in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert, sondern unterliegt einer

Expressionskontrolle. Sie kommt vor allem in aktivierten Entzündungszellen, wie Makrophagen, vor, wurde aber zunehmend auch in anderen Zellen und Geweben (z.B. Plazenta, Niere, Gehirn) nachgewiesen. Stimuli für die Expression der COX2 sind vor allem Lipopolysaccharid (LPS), IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , *Epidermal Growth Factor* (EGF) und andere pro-inflammatorische Zytokine (Williams et al., 1999). Nach Bindung dieser Liganden an Zelloberflächenrezeptoren kommt es dabei zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, der dann u.a. die Expression des COX2-Gens freigibt (Rivest et al., 2000).

#### **1.4.2 Tumornekrosefaktor $\alpha$**

Der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ist ein klassisches pro-inflammatorisches Zytokin. Er ist sowohl Aktivator als auch Produkt des NF $\kappa$ B-Signalweges (Cabal-Hierro et al., 2012). Als Folge einer inflammatorischen Stimulation (z.B. durch LPS) wird er von Makrophagen, dendritischen Zellen wie auch T-Zellen exprimiert und kann in fast allen Körperzellen eine pro-inflammatorische Signalkaskade initiieren (Biton et al., 2012). Da TNF $\alpha$  bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis (RA)), CED und Psoriasis (Langkilde et al., 2016) eine entscheidende Rolle spielt, ist er oft Ziel einer medikamentösen Therapie mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Infliximab oder Adalimumab). Weiterhin ist TNF $\alpha$  in der Lage, Apoptose zu induzieren und hat damit u.a. auch einen Einfluss auf die Verteilung von TJ-Proteinen (Watson et al., 2012).

#### **1.4.3 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase**

Stickstoffmonoxid (NO) wird als gasförmiges Signalmolekül aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Diese Reaktion kann durch drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase (NOS), endotheliale NOS (eNOS), neuronale NOS (nNOS), induzierbare NOS (iNOS), katalysiert werden. Jeweils ein Gen kodiert für jede der drei Isoformen der NOS (Taylor et al., 1997). Obwohl alle drei Isoenzyme die gleiche chemische Reaktion katalysieren, unterscheiden sich die Expressionsmuster deutlich voneinander. Für die Entzündungsreaktion ist die iNOS am wichtigsten. Auf einen inflammatorischen Reiz wird die iNOS von verschiedenen Geweben und Zellen, wie Makrophagen oder Hepatozyten, exprimiert (Green et al., 1994). Sie konnte aber auch als konstitutiv exprimiertes Enzym, beispielsweise in den Zellen der Submukosa des Kolons, nachgewiesen werden (Sklyarov et al., 2011). Durch den erhöhten Gehalt an NO wird laut Sklyarov et al. (2011) mehr zytotoxisches Peroxynitrit gebildet, welches wiederum für die Bildung weiterer freier

Radikale ( $\bullet\text{OH}$  und  $\bullet\text{NO}_2$ ) zuständig ist. Diese freien Radikale induzieren dann eine Lipidperoxidation oder Valenzänderungen von Metallionen, welche zur Oxidation von Membranlipiden beitragen und damit Störungen der Zellfunktion initiieren.

#### 1.4.4 Interleukin-1 $\beta$

Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) wird vorwiegend von stimulierten Monozyten und Makrophagen sezerniert. Für den Entzündungsprozess ist es, neben TNF $\alpha$ , eines der ausschlaggebenden pro-inflammatorischen Zytokine (Li et al., 2013). Wird IL-1 $\beta$  sezerniert, induziert es die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und deren Chemotaxis (Dinarello et al., 1993). Bindet IL-1 $\beta$  an seinen spezifischen Rezeptor IL-1R auf Endothelzellen oder auf der Oberfläche von Zielzellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, B-Zellen) (Boraschi et al., 2006), wird intrazellulär die NF $\kappa$ B-Signalkaskade aktiviert, was u.a. eine verstärkte Expression anderer pro-inflammatorischer Signalmoleküle wie TNF $\alpha$  zur Folge hat (Roebuck et al., 1999).

#### 1.4.5 Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$

Um auch anti-inflammatorische Prozesse während der Heilungsphase der experimentellen DSS-Kolitis zu untersuchen, wurde die Expression des *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) als anti-inflammatorisches bzw. pro-resolutorisches Signalmolekül quantifiziert. Nach der Bindung von TGF $\beta$  an seine Zelloberflächenrezeptoren (Serin/Threoninkinaserzeptoren) wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die zur Expression verschiedener *Downstream*-Proteine führt. Dazu gehören Transkriptionsfaktoren, die verschiedene Zielgene der Zelldifferenzierung, Chemotaxis, Proliferation und Aktivierung von Immunzellen ansteuern (Massague, 2012). Eine unkontrollierte Synthese von TGF $\beta$  kann jedoch zu einer Organfibrose und Fistelbildung führen (Scharl et al., 2016). Die fibrotische Veränderung von Geweben ist nicht selten die Konsequenz chronischer Entzündungsreaktionen und der erhöhten TGF $\beta$ -Expression, welche wiederum eine Kaskade induziert die die Bildung von Myofibroblasten erhöht. Aufgrund dessen wurde die Blockade des TGF $\beta$ -Signalweges als therapeutische Strategie für die Behandlung idiopathischer Organfibrosen vorgeschlagen (G. Li et al., 2016).

## 1.5 Intestinale Barriere – *Tight Junction*-Proteine und Kollagen Typ IV

Die Bildung der intestinalen Barriere hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dabei gehören die interzellulären Kontakte der Darmepithelzellen zu den wichtigsten Komponenten. Wie die meisten Epithelien ist auch das Darmepithel durch das Vorhandensein von *Tight Junctions* (Verschlussleiste) charakterisiert (Abb. 1.5-1).

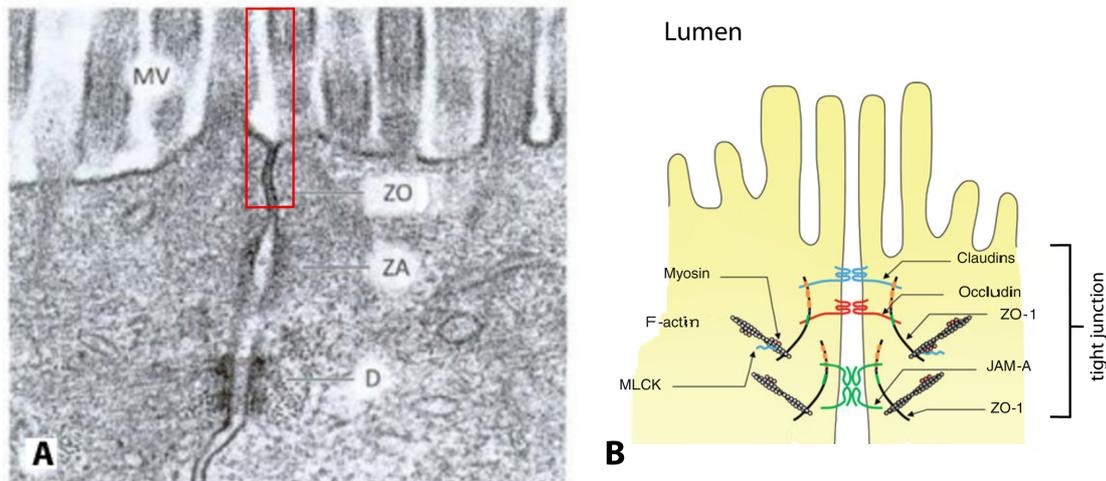


Abb. 1.5-1: Schematische Übersicht über die interzellulären Kontakte des Darmepithels. **A** Nach Lüllmann-Rauch (2003): Den apikalen Pol der Zellen bilden die *Mikrovilli* (MV). Die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt transzellulär, da der parazelluläre Transport durch die *Tight Junctions* (TJs), auch *Zonula Occludens* (ZO) genannt, blockiert ist. Weiter basal sind weniger feste interzelluläre Kontakte, wie die *Zonula Adhaerens* (ZA) und Desmosomen (D) zu finden. **B** Nach T. Suzuki (2013) zeigt die molekulare Struktur der interzellulären Kontakte zwischen den intestinalen Epithelzellen mit besonderem Augenmerk auf die TJs. Bestandteile dieses Multiprotein-Komplexes sind klassische TJ-Proteine wie Occludin, Claudin, JAM-A und ZO-1. Weiterhin gehen diese Proteine Verbindungen mit der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und F-Actin ein.

Diese gewährleisten feste Kontakte zwischen den Epithelzellen und sorgen dafür, dass ein parazellulärer Stoff- und Flüssigkeitsaustausch zwischen Darmlumen und Blut nicht möglich ist. Die *Tight Junctions* (TJs) sitzen am apikalen Pol der Epithelzelle und werden durch einen Komplex aus membrangebundenen Proteinen gebildet, die über ihre extrazellulären Anteile miteinander interagieren. Der TJ-Komplex wird aus mehreren Proteinen gebildet und besteht meist aus Claudin-1, Occludin, *Junctional Adhesion Molecule A* und ZO-1 (Laukoetter et al., 2007; Poritz et al., 2007; T. Suzuki, 2013), weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit diese Bestandteile untersucht wurden.

Zur intestinalen Barriere gehört neben den Verschlussleisten auch die Basalmembran, auf der die Epithelzellen verankert sind. Die Basalmembran der Epithelzellen besteht zu großen Teilen aus einem Netzwerk von Kollagen IV. Experimente von Kiss et al. (2016)

an der Fruchtfliege zeigten, dass dieses extrazelluläre Protein eine essentielle Rolle beim Erhalt der epithelialen Integrität und intestinalen Funktion spielt. Damit stellt Kollagen IV einen wichtigen Faktor der intestinalen Barrierefunktion dar.

## 1.6 NF $\kappa$ B-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (*nuclear factor of  $\kappa$  B*) spielt eine zentrale Rolle bei der Entzündungsreaktion. Die intrazelluläre Aktivität von NF $\kappa$ B hängt wesentlich von dessen Wechselwirkung mit I $\kappa$ B (*Inhibitor of NF $\kappa$ B*) ab. Diese Wechselwirkung zwischen NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B wird durch den Proteinphosphorylierungsstatus von I $\kappa$ B beeinflusst. In der nicht-phosphorylierten Form bindet I $\kappa$ B an zytosolisches NF $\kappa$ B und verhindert dadurch die Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern (Hayden et al., 2006). Um die Bindung zwischen I $\kappa$ B und NF $\kappa$ B zu lösen, muss I $\kappa$ B phosphoryliert werden (Abb. 1.6-1). Diese Phosphorylierung, für die spezifische Proteinkinasen (I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK)) verantwortlich sind, wird z.B. durch oxidativen Stress, pro-inflammatorische Zytokine oder durch Bestandteile von Mikroorganismen (LPS) aktiviert. Durch die Phosphorylierung löst sich I $\kappa$ B von NF $\kappa$ B, wird ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Hoesel et al., 2013). Sobald NF $\kappa$ B von I $\kappa$ B gelöst ist, wird es in den Zellkern transportiert und kann dort als Transkriptionsfaktor an spezifische Bindungssequenzen verschiedener Gene binden. Viele pro-inflammatorische Gene wie IL-1 $\beta$ , iNOS und COX2 werden in ihrer Expression durch NF $\kappa$ B-abhängige Prozesse reguliert (Jobin et al., 2000). Generell kann man drei Wege der Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signalkaskade unterscheiden, die alle zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führen:

- i) kanonischer Weg, der durch IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder LPS induziert wird.
- ii) der nicht-kanonische Weg, der die Wechselwirkung von RANK/RANKL beinhaltet.
- iii) der atypische Weg, der durch genotoxischen Stress induziert wird (Hoesel et al., 2013).

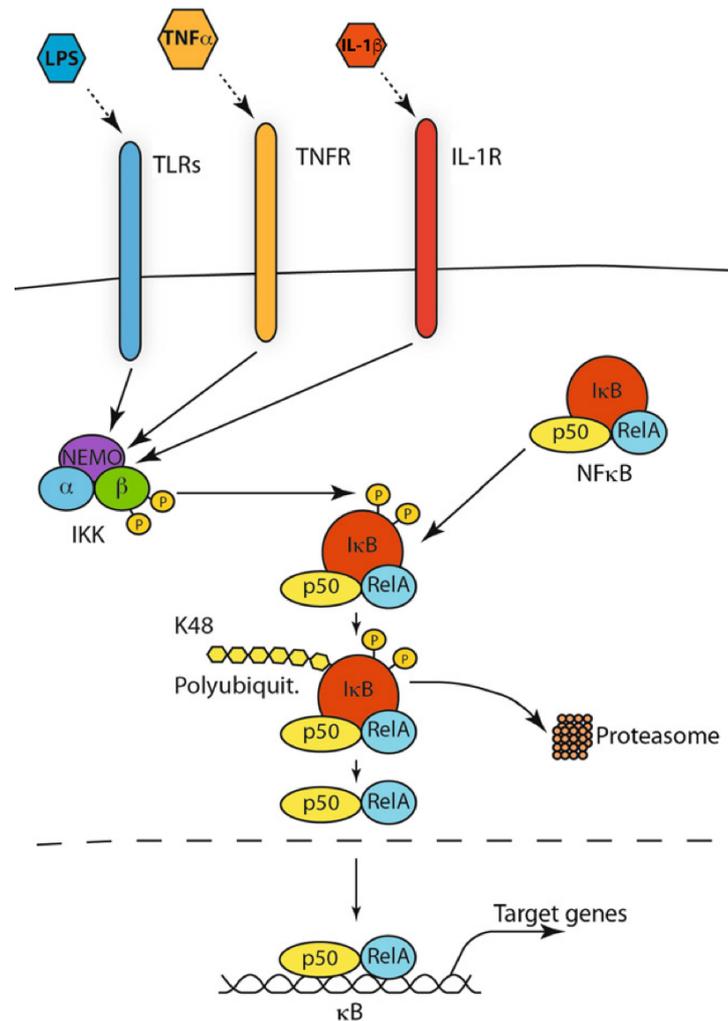


Abb.1.6-1: Darstellung der kanonischen Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signalkaskade nach Hoesel et al. (2013): Zu den kanonischen Stimuli gehören LPS (türkisches Hexagon), TNF $\alpha$  (orangefarbenes Hexagon) und IL-1 $\beta$  (rotes Hexagon) durch die dazugehörigen Rezeptoren TLR (türkis), TNFR (orange) und IL-1R (rot). Durch Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren wird der I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK), bestehend aus einer  $\alpha$ - (türkis) und  $\beta$ -Untereinheit (grün) und NEMO (violett) aktiviert und I $\kappa$ B (rot), welches an NF $\kappa$ B [gebildet aus p50 (gelb) und RelA (türkis)] gebunden ist, phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung wird I $\kappa$ B zum enzymatischen Abbau markiert, sodass NF $\kappa$ B freigegeben wird. Somit kann NF $\kappa$ B in den Nucleus wandern und an die DNA binden.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die ALOX15 hat in verschiedenen tierischen Entzündungsmodellen eine duale Funktion, da sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte für das Enzym in der Literatur beschrieben werden. Zwar gibt es einzelne Studien, die darauf hindeuten, dass dieses Enzym auch bei entzündlichen Darmerkrankungen involviert sein könnte (Mao et al., 2015; Tian et al., 2017), doch fehlen bislang systematische Untersuchungen zur Rolle des Enzyms bei diesen Erkrankungen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der Alox15 im murinen Krankheitsmodell der akuten experimentellen DSS-Kolitis zu untersuchen und die Ergebnisse im Kontext der bereits existierenden Forschungsdaten

zu bewerten.

Um die Funktion eines Genproduktes in einem Ganztiermodell zu untersuchen, gibt es zwei prinzipielle Herangehensweisen:

- i) *Loss-of-function*-Strategien (Funktionsverlust-Strategie) inaktivieren das Genprodukt mithilfe pharmakologischer (Hemmstoffstudien) oder gentechnischer (Expressionssilencing) Methoden. Aus den beobachteten funktionellen Unterschieden kann dann auf die Funktion des Genproduktes geschlossen werden kann.
- ii) *Gain-of-function*-Strategien (Funktionsgewinn-Strategie) regulieren die Expression des Genproduktes oder dessen enzymatische Aktivität hoch. Auch hier können aus den beobachteten funktionellen Veränderungen Schlussfolgerungen bezüglich der biologischen Rolle des Genproduktes gezogen werden.

Dabei muss allerdings einschränkend gesagt werden, dass in vielen Fällen die Ergebnisse der *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Strategien nicht notwendigerweise gegensätzliche Effekte liefern, da der Effekt nicht immer phänotypisch oder funktional erkennbar ist. Da spezifische ALOX15-Hemmstoffe, die für Tierexperimente zugelassen sind, nicht zur Verfügung stehen, wurden für die vorliegende Arbeit Alox15-defiziente Mäuse verwendet. Um die spezifische Rolle des Enzyms bei der DSS-Kolitis zu untersuchen, wurden Wildtypmäusen und Alox15-defizienten Mäusen mit gleichem genetischen Background (C57/BL6J, keine *littermates*) DSS über das Trinkwasser verabreicht und der Schweregrad der sich entwickelnden Kolitis anhand ausgewählter Parameter quantifiziert. Weiterhin sollen im Verlauf der Arbeit Ansätze für die mechanistischen Grundlagen für die phänotypischen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Verbrauchsmaterialien

6-well-Platten Zellkultur	BD medical; Heidelberg, Deutschland
Chirurgisches Nahtmaterial	3-0, Ethicon Johnson & Johnson Medical GmbH; Norderstedt, Deutschland
Filterpapier	Grade: 3 mm CHR; Whatman, GE Healthcare; Buckinghamshire, Großbritannien
Lysing Matrix D Tubes	M.P. Biomedicals; Irvine, CA; USA
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare; Buckinghamshire, Großbritannien
Petrischalen	BD medical; Heidelberg, Deutschland
SafeSeal-Tips professional (10 µl)	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf; Deutschland
STRIP Tubes 0,1 ml (für RotorGene 3000)	LTF Labortechnik; Wasserburg, Deutschland
X-ray films Amersham Hyperfilm	GE Healthcare; Buckinghamshire, Großbritannien

#### 2.2 Chemikalien

100 bp und 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Acrylamid	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
Agarose	Promega; Madison, WI, USA
Ammoniumpersulphat (APS)	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
BioMix Red	Bioline GmbH; Luckenwalde; Deutschland
Bradford-Reagenz	Fa. Roth; Karlsruhe, Deutschland
BSA (Stammlösung 2 mg/ml)	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland
Dextran Sodium Sulfat (MG=36-50 kDa)	ICN Biomedicals; Irvine, CA, USA
dNTP Mix	Bioline GmbH; Luckenwalde; Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland
FITC-Dextran (MG = 4 kDa)	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland
Isofluran (Forene 100 % (v/v))	Abbott Laboratories; Wiesbaden, Deutschland
Lipopolysaccharid	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland
Oligo dT18	BioTez GmbH, Berlin-Buch, Deutschland
PageRuler Plus	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific); Darmstadt, Deutschland

---

Ponceau S	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland
RevertAid Premium Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland
Ribosafe RNase Inhibitor	Bioline GmbH; Luckenwalde, Deutschland
RNA-later	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland
SensiMix™ SYBR® No-ROX	Bioline GmbH; Luckenwalde; Deutschland
SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signaling Technology; Leiden, Niederlande
Tissue Tek, O.C.T. Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen; Deutschland,
Trichloessigsäure (TCA)	Merck AG; Darmstadt, Deutschland
Trockenmilch, fettfrei	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan)	Sigma Aldrich; Darmstadt, Deutschland

---

### **Kits**

---

GeneJET Gel Extraction Kit	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific); Darmstadt, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific); Darmstadt, Deutschland
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific); Darmstadt, Deutschland
MN Kit NucleoBond Xtra MIDI Plus	Macherey-Nagel MN GmbH & Co KG; Düren, Deutschland
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel MN GmbH & Co KG; Düren, Deutschl
TOPO TA Cloning 2.1 Kit	Invitrogen AG; Karlsruhe, Deutschland

---

### **Enzyme**

---

EcoRI	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific); Darmstadt, Deutschland
HindIII	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific); Darmstadt, Deutschland
RevertAid Premium Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland

---

<b>Geräte</b>	
BioPhotometer plus 6132	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Blot/Transfersystem Multiphor II	GE Healthcare; Buckinghamshire, Großbritannien
Brutschrank (Hera cell 150)	Heraeus; Frankfurt am Main, Deutschland
Elektrophorese-Einheit	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
FastPrep-24	M.P. Biomedicals; Irvine, CA; USA
Film Prozessor Cawomat 2000 IR	CAWO Solutions, Schrobenhausen, Deutschland
Gel Imager (BioDoc Analyze)	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
RotorGene 3000	Corbett Research, nun Qiagen; Hilden, Deutschland
SDS-Gelelektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Stromversorgungsgeräte für Agarose-Gelelektrophorese	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland Hofer Scientific Instruments; San Fransisco; USA
Stromversorgung für Elektrophorese PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Stromversorgung für Elektrophorese PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Thermoblock T3	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Ultraturrax IKA T10 basic mit S10N-5G Dispergierwerkzeug	Janke & Kunkel IKA Labortechnik; Staufen, Deutschland
Wasserbad	PSL Systemtechnik GmbH; Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Vortex VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik; Staufen, Deutschland
Zentrifuge (5417R)	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland

### **Puffer und Lösungen**

Blotting Puffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,2 % SDS, 20 % Methanol 10x SDS Puffer: 2 M Glycin, 250 mM Tris, 1 % SDS
Homogenisationspuffer	320 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 2 mM Magnesiumchlorid, pH 7,4
Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer	11,1 mM D-Glukose, 1,17 mM Magnesiumsulfat Heptahydrat, 1,175 mM Kaliumphosphat Monobasic, 4,69 mM Kaliumchlorid, 118 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kalziumchlorid, 25 mM Natriumbikarbonat; pH 7,4
PBS	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12 mM Phosphat, pH 7,4
Rapid Transfer Buffer	amresco, Solon, OH, USA

RT-Puffer	10 mM Tris, 15 mM Kaliumchlorid, 0,6 mM Magnesiumchlorid; pH 8,0
Sammelgel nach Laemmli	2,63 ml 4x Sammelgelpuffer, 1,88 ml Wasser, 1,13 ml 30 % Acrylamid, 75 µl 10 % APS, 7,5 µl TEMED
Trenngel (10 %) nach Laemmli	2,25 ml 4x Trenngelpuffer, 3,75 ml dest. Wasser, 3 ml 30 % Acrylamid, 75 µl 10 % APS, 6,25 µl TEMED
Waschpuffer	1x TBS, 0,1 % Tween 20
50x TAE	40 mM Tris, 57 ml Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5
10x SDS-Puffer	2 M Glycin, 250 mM Tris, 1 % SDS
4x Puffer für Trenngel	1,5 M Tris (pH 8,8), 2 % SDS
4x Puffer für Sammelgel	0,5 M Tris (pH 6,8), 2 % SDS
1x TBS	150 mM NaCl, 500 mM Tris

### Nährmedien

#### Bakterien

Ampicillin	100 mg/l; Fa. Roth (Best. Nr.: X964.3: 8 g/400ml)
LB-Agar	Fa. Roth; Karlsruhe, Deutschland (Best. Nr. X965.2: 14 g LB Agar/400 ml)
LB-Medium	Fa. Roth; Karlsruhe, Deutschland (Best. Nr. X964.3: 8 g/400 ml)
NZY-Medium	2 g NZ-Amin (Caseinhydrolysat), 1 g Yeast Extract, 1 g NaCl: ad 190 ml mit A. Dest., pH 7,5
E. coli XL-1 Blue	Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

#### Antikörper

<b>IκBα</b>	sc371	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Heidelberg, Deutschland	1:1.000
<b>β-Actin</b>	A1978	Sigma- Aldrich; Darmstadt, Deutschland	1:10.000
<b>α-Maus</b>	111-035-003	Dianova Vertriebsgesellschaft mbH, Hamburg, Deutschland	1:10.000
<b>α-Kaninchen</b>	515-035-003	Dianova Vertriebsgesellschaft mbH, Hamburg, Deutschland	1:10.000

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Tierversuch

Für die Induktion einer akuten DSS-Kolitis wurden als Wildtypkontrollen 30 Mäuse vom Stamm C57/BL6J (Alox15<sup>+/+</sup>, Tierhaltung Berlin-Steglitz, Deutschland), sowie 30 Alox15-defiziente Mäuse (Alox15<sup>-/-</sup> nach Funk et al. (2002), Tierhaltung Berlin-Steglitz, Deutschland), mit einem C57/BL6J-Hintergrund verwendet. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere für den Versuch verwendet, die bei Beginn des Experiments 10-11 Wochen alt waren und ein Gewicht von 20 g ± 1,5 g aufwiesen (Tierversuchsnummer: G 0201/10, FEM 990).

Die Haltung der Tiere erfolgte wie von C. Y. Chiu et al. (2012) beschrieben mit Standardfutter und in Standardkäfigen mit maximal 10 Tieren pro Käfig. Die Tiere wurden nach Betäubung mit Isofluran durch zervikale Dislokation an den entsprechenden Tagen getötet.

### 2.3.2 Induktion der DSS-Kolitis

Durch Applikation von *Dextran Sodium Sulfate* (DSS) über das Trinkwasser wurde die Kolitis bei den Versuchstieren induziert (C. Y. Chiu et al., 2012). Die dafür nötige Konzentration des DSS im Trinkwasser wurde in einem Vorversuch mit n = 5 Wildtyptieren getestet. Dabei stellte sich eine Konzentration von 2,5 % DSS als optimal heraus, damit die Kolitis weder letal noch subklinisch verläuft. Das DSS wurde über sieben Tage verabreicht. Danach wurde für weitere sieben Tage auf normales Trinkwasser umgestellt, um eine Heilung der induzierten Entzündung zu erreichen. Das Experiment lief somit insgesamt über 14 Tage. Über den gesamten Zeitraum wurde das Gewicht der Tiere täglich dokumentiert. An den Tagen 0, 8 und 14 wurden jeweils 10 Tiere pro Tiergruppe getötet, das Kolon entnommen und der DAI (*Disease Activity Index*) bestimmt, der den Schweregrad der Erkrankung quantifiziert. Für den Versuch wurden die Tiere in drei experimentelle Gruppen mit jeweils 10 Tieren eingeteilt.

- i. Kontrollgruppe (Tag 0): Diese Tiere kennzeichnen den Funktionszustand vor Beginn der Intervention.
- ii. Entzündungsgruppe (Tag 8): Diese Tiere kennzeichnen die Funktionsveränderungen nach Induktion der DSS-Kolitis. Die Tiere dieser Gruppe wurden gezielt erst einen Tag nach Absetzen des DSS getötet. Die Ursache für diesen Zeitverzug bestand darin, dass die Wirkung des DSS zeitlich verzögert

eintritt und damit das am Tag 7 applizierte DSS erst am Tag 8 seine volle Wirkung entfaltet.

- iii. Resolutionsgruppe (Tag 14): Diese Tiere kennzeichnen die Funktionsveränderungen beim Ausheilen der experimentellen DSS-Kolitis.

Nach Tötung der Tiere wurde das Kolon auf der gesamten Länge (von der Einmündung des Ileums in das Kolon bis zum Anus) entnommen und dessen Länge gemessen. Der distale Teil wurde für die quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)-Analysen (Lagerung in 500µl RNAlater bei -80°C) und die Herstellung histologischer Präparate (Einbettung in Tissue Tek und Lagerung bei -80°C) genutzt. Das mittlere Stück wurde für die Lipid-Analyse der Gewebelipide mittels LC/MS (schockgefroren in Flüssigstickstoff und Lagerung bei -80°C; Daten siehe Kroschwald et al., 2018) aserviert. Der proximale Teil diente als Ausgangsmaterial für Elektrophoresen sowie Western- und Immunoblot-Analysen (ebenfalls schockgefroren in Flüssigstickstoff und Lagerung bei -80°C).

### **2.3.3 RNA-Isolation und Reverse Transkription**

Das Kolongewebe wurde gewogen und zirka 20-50 mg in 700 µl Lysepuffer (RA1 aus dem NucleoSpin RNA II Kit) mit dem FastPrep-24-Homogenisator (Lysing Matrix D) für 3 x 40 s mit 6 m/s homogenisiert. Vor der Homogenisierung wurden der Probe 7 µl β-Mercaptoethanol (1 µl/100 µl RA1) zugesetzt, um eine Oxidation der Nukleinsäuren während der Homogenisierung zu vermeiden. Zwischen den drei Homogenisationsschritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Homogenat für 3 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur (20-22 °C) in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand von zirka 600 µl in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Für die Präparation der RNA wurde den Richtlinien des NucleoSpin RNA II Kits von Macherey-Nagel gefolgt. Nach der RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung erfolgte die Reverse Transkription von 1 µg RNA in cDNA mit der RevertAid Premium Reverse Transcriptase. Hier setzte sich das Gesamtvolumen von 20 µl aus 1 µl dNTPs, 1 µl dT18, x µl RNA (entsprechend 1 µg RNA) und x µl autoklaviertem Wasser (add 14,5 µl) zusammen. Die Reaktion fand im Biometra T3 Thermoblock unter folgenden Reaktionsbedingungen statt:

5 min bei 65 °C, Abkühlen auf Eis und Zugabe von 5,5 µl des Reaktionsgemisches (4 µl 5-fach konzentrierter Reaktionspuffer, 1 µl RevertAid Premium Reverse Transcriptase und 0,5 µl RiboSafe RNase Inhibitor). Nach einer einstündigen Inkubation bei 50 °C

wurden die Ansätze bei 80 °C inaktiviert und anschließend bei -20 °C eingefroren.

#### **2.3.4 Quantitative *Real Time*-PCR**

Für quantitative Aussagen über die Expression bestimmter Gene wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt (Wang et al., 2011). Mithilfe von externen genspezifischen Amplifikationsstandards, die im Vorfeld der Analysen hergestellt werden mussten, wurde dabei die Anzahl der mRNA-Kopien/ $\mu\text{g}$  extrahierter RNA bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Standardkurven für jedes einzelne zu quantifizierende Genprodukt erstellt. Für diese Analysen wurde 1  $\mu\text{l}$  cDNA mit 9  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmix (5  $\mu\text{l}$  SensiMix SYBR no-ROX, 1  $\mu\text{l}$  Primer-Mix und 3  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O) in die Amplifikationsröhrchen gegeben. Die qRT-PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Denaturierung für 10 min bei 95 °C. Zykluszeiten: Denaturierungsphase für 20 s bei 95 °C, Annealingphase 30 s bei 65 °C, Hybridisierungsphase 60 s bei 72 °C.

Der Zyklus wurde 40 Mal wiederholt. Nach jedem Amplifikationszyklus wurde der Fortschritt der Amplifikationsreaktion durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Am Ende der PCR wurde die spezifische Schmelzkurve des Amplifikationsproduktes erstellt, die Aussagen hinsichtlich der Homogenität der Amplifikationsprodukte erlaubt.

Die verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Primersequenzen für die qRT-PCR**

Maus-Primer	Up (5' 3')	Down (5' 3')
36B4	TGCAGCTGATCAAGACTGGAGACA	TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC
Alox15	GTACGCGGGCTCCAACAACGA	TCTCCGGGGCCCTTCACAGAA
Alox5	TCGAGTTCCCATGTTACCGCT	CTGTGGTCACTGGGAGCTTCG
Claudin-1	GCTGGGTTTCATCCTGGCTTCT	CCTGAGCGGTCACGATGTTGT
COX1	CTGCGGCTCTTTAAGGATGGGA	GCGAGAGAAGGCATCCACCAG
COX2	GCATTCTTTGCCAGCACTTCAC	CCAAAGACCTCCTGCCCCACA
GAPDH	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGA	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG
IL-1 $\beta$	CTACAGGCTCCGAGATGAACAACAAAA	TGGGGAActCTGCAGACTCAAActC
iNOS	TGAGGCCAGGAGGAGAGAGA	TCACAGGCTGCCCGGAAGGTT
JAM-A	ATCTGATCTTTGACCCCGTGACA	CAAACCAGACGCCAAAAATCAAGA
Kollagen IV	GCCCCACAGGTGCCAAAGGC	AGAGGAAGCCAAGGGATGCCCG
Occludin	ATGGCGGATATACAGACCCAAGA	GATAATCATGAACCCCAGGACAAT
TGF $\beta$	CGGCCCTTCCTGCTCCTCATGG	CAGGAGCGCACGATCATGTTGGA
TNF $\alpha$	CACCATGAGCACTGAAAGCATGAT	CGGCTGATGGTGTGGGTGAGG
$\beta$ -Actin	ATGATATCGCCGCGCTCGTCGT	CGCGGTTGGCCTTGGGGTTCA

Für die Normalisierung wurde die Menge eingesetzter RNA (Huggett et al., 2005; Nolan et al., 2006) verwendet, da die Expression aller verwendeten endogenen Referenzgene (GAPDH,  $\beta$ -Actin, 36B4) in einer der beiden Phasen der Entzündung (Entzündungsphase oder Heilungsphase) reguliert wurde. Da auch Literatur über die Normalisierung der qRT-PCR-Ergebnisse auf multiple Referenzgene zu finden ist (Normalization Methods for qPCR, Bio Rad Laboratories, 2008; Vandesompele et al. 2002), wurde diese Methode ebenfalls angewendet. Exemplarisch sind die Kinetiken von Alox15 und iNOS (Abb. 2.3-1). Diese unterschieden sich in ihrer Kinetik nicht signifikant, sodass für die vorliegende Arbeit die Ergebnisse auf die Menge eingesetzter RNA (Kopien pro 50 ng RNA) normalisiert wurde.

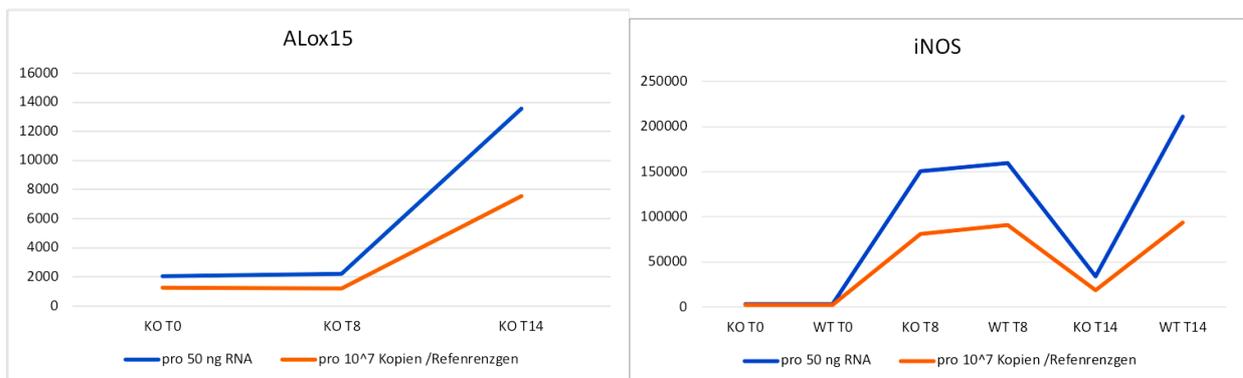


Abb 2.3-1: Gezeigt sind die Expressionsverläufe bei unterschiedlicher Normalisierungsmethodik anhand der zwei Beispiele Alox15 (**A**) und iNOS (**B**). Der blaue Graph zeigt den Verlauf, wenn man die qRT-PCR-Ergebnisse auf 50 ng eingesetzte RNA bezieht. Der orangefarbene Graph zeigt die Normalisierung auf ein Master-Referenzgen aus  $\beta$ -Actin, GAPDH und 36B4.

### 2.3.5 Herstellung der Standards für die qRT-PCR

#### 2.3.5.1 PCR und TOPO-Cloning

Um die oben genannten genspezifischen externen Amplifikationsstandards für die qRT-PCR herzustellen, wurde die Zielsequenz der entsprechenden Gene mithilfe zuvor ausgewählter Primer aus verschiedenen Geweben amplifiziert. Hierfür wurden 3 µl einer cDNA-Probe aus verschiedenen Geweben, in denen das entsprechende Gen laut Literaturangaben exprimiert wird, mit 7,5 µl sterilem H<sub>2</sub>O, 12,5 µl 2x Biomix Red und 2 µl Primer gemischt (Gesamtvolumen 25 µl). Nach einer Endpunkt-PCR im T3 Thermocycler (PCR-Bedingungen: 2 min bei 95 °C; 30x Zyklus: 30 s bei 95 °C, 1 min bei 86 °C, 1 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C) wurde die Gelbande, die im erwarteten Molekulargewichtsbereich migrierte, ausgeschnitten und es folgte eine Gelextraktion dieser Bande entsprechend des GeneJET Gel Extraction Kits. Im Anschluss wurde das gewonnene PCR-Produkt in einen Klonierungsvektor (TOPO TA Cloning 2.1) einkloniert, wobei den Angaben des Herstellers gefolgt wurde. Für die anschließende Transformation wurden kompetente XL-1 Blue E. coli-Zellen benutzt und die transformierten Zellen auf LB-Ampicillin Agarplatten ausplattiert (Inkubation bei 37°C über Nacht). Eine Auswahl gewachsener Klone wurde in Flüssigkulturen (2,5 ml LB-Medium, 2,5 µl Ampicillin) bei 37 °C und 200 rpm für ca. 18h angezüchtet und die Plasmide mittels GeneJet Plasmid Mini Kit im Anschluss isoliert. Nach einer Probespaltung mit *EcoRI* wurden positive Klone zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

Nachdem die Sequenzen der Amplifikationsstandards überprüft worden waren, wurden die erhaltenen Plasmide durch die Herstellung größerer Bakterienkulturen (100 ml) amplifiziert, präpariert und mithilfe des MN Kit NucleoBond Xtra MIDI Plus gereinigt. Nach der DNA-Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot (5 µg) mit dem Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert. Dafür wurden x µl DNA (5 µg entsprechend) mit 5 µl FD-Puffer, 3 µl Enzym auf 50 µl mit autoklaviertem Wasser aufgefüllt (doppelter Ansatz) und unter folgenden Bedingungen linearisiert: 1 h bei 37 °C und 10 min bei 80 °C zur Inaktivierung. Zur Kontrolle wurden 5 µl des Ansatzes auf ein 1 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt. Üblicherweise ergab sich bei dieser Analyse eine einzelne Bande, die bei dem entsprechenden Molekulargewicht migrierte. Diese Bande wurde präpariert und mithilfe des GeneJET PCR Purification Kits gereinigt.

Die so präparierten externen Amplifikationsstandards wurden zur Herstellung einer Urlösung (UL) in einer definierten Konzentration in Wasser gelöst.

### 2.3.5.2 Herstellung von Standardlösungen

Für die Herstellung der Standardlösungen (SL1-3) musste zunächst berechnet werden, wie viele einzelsträngige (*single stranded*, ss) DNA-Moleküle in den ULs vorhanden sind. In diese Berechnung gehen die DNA-Konzentration der ULs (in ng/μl, spektrophotometrische Bestimmung) und die Fragmentgröße des PCR-Produktes (in Basenpaaren (bp)) ein. Mithilfe der unten genannten Formel kann mithilfe dieser beiden Werten die Zahl der doppelsträngigen (*double stranded*, ds) DNA-Moleküle/μl in der UL berechnet werden:

$$UL = \left( \frac{\text{Konz. UL} / 10^9}{\text{Fragmentgröße (Vektor + Insert)} \times 660} \right) \times 6,022 \times 10^{23}$$

Die SL1 wurde aus der UL durch Verdünnung so hergestellt, dass  $10^{10}$  ss DNA-Moleküle/μl enthalten waren. Zur Berechnung dient folgende Gleichung, die das Volumen UL für 100 μl SL1 angibt:

$$SL1 = \left( \frac{10^{10} \times 100}{\text{ds DNA Moleküle}/\mu\text{l}} \right) / 2$$

Die weitere Verdünnung für die Herstellung der SL2 erfolgte mit RT-Puffer. 1 ml einer SL2 (die 100 Mio. ss DNA-Moleküle/μl enthält) wurde aus 10 μl SL1, 1 μl Plasmid (pGL3 Control 4,8 μg/μl als DNA-Tracer) und 989 μl 1x RT-Puffer hergestellt. Im letzten Schritt wurden mehrere SL2 zu einer SL3 gemischt, indem beispielsweise jeweils 30 μl von drei SL2 mit insgesamt 910 μl RT-Puffer verdünnt wurden. Somit entstand eine SL3 für drei verschiedene Gene mit jeweils 3 Mio. Kopien.

### 2.3.6 Proteinbestimmung, SDS-Elektrophorese und Western Blot

Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus dem Kolongewebe wurden 50-100 mg des Gewebes mittels Ultraturax (mit S10 N 5G) in 300 μl Homogenisationspuffer (30.000 U/min für 30-60 s) zerkleinert. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 12.000 xg und 4 °C für 10 min wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Gemessen wurde der Proteingehalt des Überstands mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Die Eichkurve wurde durch 1:10 Verdünnung der BSA-Stammlösung (2 mg/ml) mit demineralisiertem Wasser in Eppendorf-Gefäßen hergestellt. Die Standards hatten die Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 μg/ml Protein. Für

den Ansatz der Proben wurden 10 µl des Lysates zu 790 µl demineralisiertem Wasser gegeben. Das Endvolumen betrug immer 800 µl. Zuletzt wurden 200 µl des Bradford-Reagenz zugegeben, gut gemischt und nach 10 min Reaktionszeit die Extinktion für Standards und Proben bei 595 nm mittels Photometrie bestimmt. Unter Verwendung der Eichkurve wurden die Proteinwerte der Proben berechnet.

Bevor die Proteine mittels SDS-Elektrophorese im 12,5 %igen Polyacrylamidgel (4 %iges Sammelgel und 10 %iges Trenngel) analysiert werden konnten, wurden sie für 7 min bei 95 °C in einem SDS-haltigen Probenpuffer denaturiert. Dabei lagerten sich SDS-Moleküle an die Proteine an, sodass die Proteine eine stark negative Ladung aufwiesen. Anschließend wurden je 50 µg Protein zur Analyse verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mithilfe eines Bio-Rad-Elektrophorese-Systems bei 120 V für zirka 100 min. Als Marker für die Proteingröße wurden 10 µl PageRuler Plus Markermischung aufgetragen. Die fertigen Elektropherogramme wurden entweder mit Coomassieblau gefärbt oder für den spezifischen Proteinnachweis im Western Blot weiterverwendet. Dafür wurden die Proteine im *semi-dry*-Verfahren vom Elektrophoresegel auf eine Nitrozellulosemembran bei 120 mA für 1 h übertragen. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch Anfärbung der Membran mit Ponceau S (0,2 % in 3 % TCA) überprüft. Anschließend erfolgte das Blockieren der Membranen mit einer 5 %igen Trockenmilchlösung und mehrmaliges Waschen der Membranen. Die so präparierten Membranen wurden mit den verschiedenen primären Antikörpern behandelt. Hierfür kam einerseits ein Antikörper, der gegen die phosphorylierte Form von I $\kappa$ B (anti-pI $\kappa$ B  $\alpha$ ) gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:1.000 zum Einsatz. Andererseits wurde ein anti- $\beta$ -Actin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 als Ladungskontrolle eingesetzt. Die Membranen wurden auf einem Orbitalschüttler mit der Antikörperlösung über Nacht inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS/Tween wurde eine Lösung des sekundären Antikörpers, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war, zur Membran zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der überschüssige Antikörper in drei Waschschritten mit PBS/Tween entfernt wurde, konnten die Blots durch Zugabe von ECL-Reagenz detektiert werden.

### **2.3.7 *Inverted Sac*-Methode**

Die *Inverted Sac*-Methode, auch *Everted Sac*-Methode genannt, diente der *in vitro*-Messung der Kolonpermeabilität. Dabei wurden Kolonpräparationen evertiert (Kolonepithel nach außen), mit isotoner Lösung gefüllt, und beidseits verschlossen.

Danach wurden diese Kolonsäcke in einer Lösung mit einem Chemilumineszenzfarbstoff (Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran) eingelegt, der bei intakter Epithelbarriere die Kolonwand nicht oder nur zu einem geringen Anteil permeieren kann. Ist die Epithelbarriere geschädigt, kann der Fluoreszenzfarbstoff in den Kolonsack über das Epithel eindringen und in der sich darin befindlichen Flüssigkeit nachgewiesen werden. Für diesen Versuch wurden jeweils zehn Kontrolltiere (Alox15<sup>+/+</sup> und Alox15<sup>-/-</sup> ohne DSS-Behandlung) im Alter von 22 Wochen getestet, um einen Basiswert der Permeabilität zu erhalten. Anschließend wurden jeweils fünf DSS-behandelte Tiere (Alox15<sup>+/+</sup> und Alox15<sup>-/-</sup>) im Alter von 10 Wochen untersucht. Die DSS-Gabe erfolgte wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Untersucht wurden nur Tag 0 (Kontrollgruppe) und Tag 8 (Entzündungsgruppe).

Die *Inverted Sac*-Methode war in der Arbeitsgruppe nicht etabliert und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Angaben aus der Literatur adaptiert. Zur Literaturrecherche dienten Studien von Yuan et al. (2013) die an der Ratte und H. Zhao et al. (2012) sowie Higuchi et al. (2008) die an der Maus forschten. Nach Präparation des gesamten Kolons wurde dieses mithilfe einer langen, stumpfen Hohlzahn und einem geflochtenen Mersilene-Faden evertiert. Hierzu wurde zunächst der Faden durch die Hohlzahn und anschließend das Kolon vorsichtig über die Hohlzahn gezogen, sodass an der Spitze der Hohlzahn ein Hilfsknoten um das Kolonende gemacht werden konnte. Über diesen Knoten konnte anschließend das Kolon vorsichtig manuell evertiert werden. Danach wurde der Hilfsknoten entfernt und das evertierte Kolon vorsichtig gesäubert. Um den Kolonsack zu befüllen, wurde ein Ende erneut mit dem Faden verschlossen. Das noch offene Ende des Kolons wurde über die Hohlzahn gezogen. Die Hohlzahn war an eine Spritze, die das Inkubationsmedium enthielt, angeschlossen. Damit kein Inkubationsmedium aus dem Kolonsack entweichen konnte, wurde ein Knoten um das noch offene Kolonende und die Hohlzahn gespannt. Sobald der Kolonsack ausreichend gefüllt war (zirka 0,5 ml), wurde dieser von der Hohlzahn abgezogen und gleichzeitig der Knoten verschlossen. Zur besseren Anschauung der Methode ist der Arbeit eine CD-ROM mit dem Video zur Durchführung der *Inverted Sac*-Methode beigelegt. Alternativ ist das Video über der URL <https://youtu.be/R25R7dCAK-k> anzusehen.

Als Inkubationsmedium wurde Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (KHBB) verwendet. Dieses Medium, zusammen mit 20 µg/ml FITC-Dextran, wurde für die spätere Inkubation der Kolonsäcke in 6-well-Platten mit einem Gesamtvolumen von 6 ml vorgelegt (5970 µl

Medium und 30 µl FITC-Dextran). Aufgrund der Länge der Kolonpräparate war es immer möglich, zwei Kolonsäcke pro Tier und Darm herzustellen. Somit konnten zwei unterschiedliche Zeitpunkte (30 min und 60 min) untersucht werden. Die Inkubation der Kolonsäcke erfolgte im Brutschrank bei 37 °C unter ständiger Bewegung des Mediums auf einem Orbitalschüttler und bei 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurde der Inhalt des Kolons in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 1.000 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Fluoreszenzmessung (485 nm Exzitation/528 nm Emission) erfolgte jeweils mit einem minimalen Messvolumen von 50 µl. Frisches KHBB-Medium ohne FITC-Dextran diente als Nullwert, weiterhin wurden KHBB mit FITC-Dextran vor und nach der Inkubation sowie ein Aliquot (50 µl) der zentrifugierten Probe aus dem Lumen gemessen. Die Messungen erfolgten mithilfe des Mikrotiterplatten-Readers (Synergy HT) und der dazugehörigen Software KC4 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Für die Auswertung wurden die permeable Fläche und das Inhaltsvolumen des Kolonsacks bestimmt. Die Berechnung und Auswertung der Permeabilität erfolgte mit der unten genannten Formel (Yuan et al., 2013):

$$P_{\text{app}}(\text{cm/s}) = \frac{\partial Q}{A \times C_0 \times \partial t}$$

$P_{\text{app}}$  steht für die scheinbare Permeabilität (apparent permeability), die sich zusammensetzt aus  $\partial Q$ , der Menge des über die Darmwand transportierten FITC-Dextrans [µg] geteilt durch  $A$ , der permeablen Fläche [cm<sup>2</sup>] multipliziert mit der Anfangskonzentration des Außenmediums  $C_0$  [µg/ml] und der Inkubationszeit  $\partial t$  [s].

### 2.3.8 Histologische Färbungen

Die histologischen Färbungen wurden in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie des Charité Virchow Klinikums durchgeführt. Hierfür wurde das am weitesten distale Stück des Kolons nach Präparation in Tissue Tek bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde das Gewebe in 5 µm dünne Schichten geschnitten und die angefertigten Schnitte mit der standardisierten HE-Methode angefärbt (Kroschwald et al. 2018). Die Evaluation des Entzündungsgrades und der Epithelschädigung, welche verblindet durchgeführt wurde, ist ein kombinierter Score und besteht aus folgenden Komponenten (Dieleman et al., 1998):

- i. Schwere der Inflammation (0 = keine Entzündung, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = schwer),

- ii. Von der Entzündung betroffene Gewebeschichten (0 = keine Entzündung, 1 = Mucosa, 2 = Mucosa plus Submucosa, 3 = transmural),
- iii. Charakter des Epithelschadens (0 = intaktes Epithel, 1 = Störung der architektonischen Struktur, 2 = Erosion, 3 = Ulzeration)
- iv. Ausmaß der Läsion (0 = keine Läsionen, 1 = punktuell, 2 = multifokal, 3 = diffuse).

## **2.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung der Software IBM SPSS Statistics, Version 22 mit Hilfe des Instituts für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Es erfolgte zunächst eine deskriptive Beschreibung der Untersuchungsgrößen. Die Ergebnisse wurden als Lage- und Streuungsparameter (Mittelwert und Standardabweichung, Median) angegeben. Zum Vergleich der (größtenteils nicht normalverteilten) quantitativen Variablen hinsichtlich der Tiergruppen (Wildtyp vs. Alox15-Defizienz), des Zeitpunkts (Tag 0 vs. Tag 8 und Tag 8 vs. Tag 14) bzw. des Vorhandenseins von DSS (ohne DSS vs. mit DSS) wurde zunächst der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Zur gleichzeitigen Untersuchung des Einflusses von Tiergruppe und Zeitpunkt bzw. Tiergruppe und DSS unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen wechselseitigen Beziehungen wurden univariate Varianzanalysen verwendet.

Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels Boxplots. Als Signifikanzniveau bei den statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  (alle p-Werte  $< 0,05$  gelten als signifikant) angenommen. Dabei ist die Kennzeichnung in den Abbildungen wie folgt: # p  $< 0,05$  und ## p  $< 0,005$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes), die Sternchen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente zur klinischen Ausprägung der DSS-Kolitis, den qRT-PCR-Daten der Entzündungsparameter und den Parametern der intestinalen Barriere, der *Inverted Sac*-Methode und dem NF $\kappa$ B-Signalweg detailliert dargelegt.

#### 3.1 Vorversuch zur Ermittlung der optimalen DSS-Konzentration

Der Schweregrad der DSS-Kolitis hängt in erster Linie von der applizierten DSS-Menge ab, wobei sich in der Regel die Schwere der Kolitis proportional zur DSS-Konzentration im Trinkwasser verändert. Dabei beeinflussen erfahrungsgemäß auch andere Parameter (z.B. Immunstatus der Versuchstiere, Haltungsbedingungen, Futterzusammensetzung, Jahreszeit, DSS-Charge) die Beziehung zwischen DSS-Konzentration und Schweregrad der Entzündung. Um herauszufinden, welche DSS-Konzentration im Trinkwasser für die Induktion einer mittelschweren Kolitis unter unseren Versuchsbedingungen am besten geeignet war, wurde ein Pilotversuch über acht Tage mit je  $n = 5$  Wildtypmäußen durchgeführt. Die Wildtypmäußen wurden in zwei Gruppen eingeteilt und erhielten für sieben Tage DSS der Konzentration von 3,5 % bzw. 2,5 % über das Trinkwasser. Dabei stellte sich die Konzentration von 3,5 % als zu hoch heraus, da sich bei allen Wildtypmäußen der Gesundheitsstatus so sehr verschlechterte, dass sie aus Tierschutzgründen aus dem Versuch genommen werden mussten. Bei einer 2,5 %-DSS-Applikation überlebten alle Versuchstiere den Pilotversuch und zeigten gut quantifizierbare Veränderungen der wesentlichen Parameter (Gewichtsveränderung, Stuhlkonsistenz). Deshalb wurden 2,5 % als geeignete Konzentration für den Hauptversuch angesehen.

#### 3.2 Hauptversuch

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Pilotversuchs wurde ein experimentelles Protokoll für den Hauptversuch konzipiert. Die Details dieses experimentellen Protokolls können dem Kapitel 2.3.2 (Induktion der DSS-Kolitis) entnommen werden.

##### 3.2.1 Klinische Parameter im Vergleich zwischen Alox15-defizienten Tieren und Wildtypmäußen bei der experimentell induzierten DSS-Kolitis

Die DSS-induzierte Kolitis stellt ein etabliertes Mausmodell für experimentelle entzündliche Darmerkrankungen dar. Dabei wird DSS als entzündungserregender Reiz mit dem Trinkwasser den Tieren zugeführt, wobei sich bei der hier angewandten

Versuchsdurchführung eine akute Kolitis entwickelte. Der Schweregrad der experimentellen Entzündung kann anhand verschiedener klinischer Parameter quantifiziert werden, die im Folgenden kurz dargestellt sind:

- i. Gewichtsverlust: Unter dem Einfluss von DSS kommt es typischerweise zum Gewichtsverlust der Tiere. Das Ausmaß dieses Gewichtsverlustes repräsentiert den Schweregrad der Entzündung und kann leicht als Verlaufsparemeter genutzt werden. Dieser könnte, wie es Melgar et al. (2007) auch bei CED-Patienten vermuten, durch eine sekundäre Anorexie durch Schmerzassoziation bei Nahrungsaufnahme herbeigeführt werden.
- ii. Stuhlveränderungen: Durch Applikation von DSS kommt es neben dem genannten Gewichtsverlust zu Stuhlveränderungen (Diarrhoe, Blut im Stuhl). Einerseits kann eine Diarrhoe aufgrund der Schädigung der Permeabilität und somit durch die Störung des Wassertransports entstehen. Andererseits kann Blut im Stuhl durch massive entzündliche Erosionen des intestinalen Epithels auftreten (Kitajima et al., 1999).
- iii. Aus den unter i) und ii) beschriebenen Parametern kann der *Disease Activity Index* (DAI) berechnet werden (Tabelle 3.1) (Cooper et al., 1993). Er dient als objektives und globales Maß für den Schweregrad einer experimentellen Kolitis.

**Tabelle 3.1: Index der Krankheitsaktivität (*Disease Activity Index*) nach Cooper et al. (1993)**

Punktzahl	0	1	2	3	4
Gewichtsverlust	<1 %	1-5 %	5-10 %	10-15 %	>15 %
Stuhlkonsistenz	Keine Veränderung	-	breiig, klebt nicht am Anus	-	flüssig, klebt am Anus
Blutung	Keine Blutung	-	Moderate Blutung	-	ausgeprägt

- iv. Als viertes Maß für die Quantifizierung des Schweregrades einer experimentellen DSS-Kolitis kann die Kolonlänge herangezogen werden. Durch die Entzündungsreaktion kommt es zu einer Reduktion der Dickdarmlänge (Perse et al., 2012). Diese Längenreduktion ist ebenfalls proportional zum Schweregrad der Kolitis. Unglücklicherweise kann die Kolonlänge jedoch nicht an lebenden Tieren quantifiziert werden, sodass dieser Parameter für die Verlaufskontrolle ungeeignet ist. Die exakte

Bestimmung der Kolonlänge kann nur *ex vivo* erfolgen. Zu diesem Zweck müssen die Tiere getötet und das Kolon entnommen werden.

Im vorliegenden Tiermodell der DSS-induzierten Kolitis zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich aller oben erläuterten Parameter (Gewichtsverlust, Stuhlveränderungen, DAI und Kolonlänge) beim Vergleich von Wildtypmäusen mit Alox15-defizienten Tieren. Bei einer DSS-Konzentration von 2,5 % im Trinkwasser über sieben Tage entwickelten die Wildtypmäuse im Gegensatz zu Alox15-defizienten Tieren eine typische Kolitis. Die Unterschiede der verschiedenen Parameter werden nun im Detail besprochen.

**Zusammenfassung:** Um die Rolle der Alox15 bei entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen, wurden Wildtypmäuse und Alox15-defiziente Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund im Tiermodell der DSS-induzierten Kolitis getestet. Der Schweregrad der Erkrankung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 8, 14) durch die Quantifizierung von vier Parametern (Körpergewicht, Stuhlveränderungen, *Disease Activity Index*, Kolonlänge) bestimmt.

### 3.2.2 Gewichtsverlauf und Gewichtsverluste

Das tägliche Wiegen der Tiere in beiden experimentellen Gruppen (Wildtypmäuse vs. Alox15-defiziente Mäuse) diente als Verlaufskontrolle der DSS-Wirkung. Gleichzeitig wurden die Stuhlbeschaffenheit und das Vorhandensein von Blut im Stuhl semi-quantitativ eingeschätzt und aus diesen drei klinischen Parametern der DAI an den Tagen 0, 8 und 14 berechnet.

Die detaillierten zeitlichen Gewichtsprofile des Hauptversuches sind in Abbildung 3.2-1 dargestellt. Bei Wildtypmäusen (blau) zeigte sich bis Tag 2 der DSS-Applikation eine leichte Gewichtszunahme, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Diese geringgradige Gewichtszunahme könnte auf eine Flüssigkeitseinlagerung (Ödembildung) in der Lamina propria des Darmes zurückzuführen sein (Perse et al., 2012). Ab Tag 3 war ein deutlicher Gewichtsverlust bei den Wildtyptieren nachweisbar. Beobachtungen aus den Vorversuchen zeigten, dass die Wirkung des DSS länger anhielt als die Applikation. Dieser Effekt ist möglicherweise durch die orale Applikation zu erklären. Dementsprechend war nach dem Absetzen des DSS am Tag 7 eine anhaltende

Gewichtsreduktion bis Tag 8/9 zu erkennen und daher wurden die Tiere der Entzündungsgruppe erst am Tag 8 getötet. Bis Tag 10 hielt sich das Gewicht der Wildtypmäuse auf diesem niedrigen Niveau. Danach begannen sich die Tiere zu erholen und wieder an Gewicht zuzunehmen. Allerdings erreichten nur wenige Tiere ihr Ausgangsgewicht vom Tag 0, sodass man davon ausgehen kann, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen die Resolutionsphase noch nicht vollständig abgeschlossen war. Im zeitlichen Verlauf der DSS-Kolitis ergaben sich bei den Wildtyptieren am 6. Tag der DSS-Applikation erstmals signifikante Unterschiede im Körpergewicht im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht. Ähnlich signifikante Unterschiede waren auch an den Tagen 7, 8, 9 und 10 nachzuweisen. Erst am Tag 11 hatte sich das Gewicht der Wildtypiere wieder soweit normalisiert, dass kein signifikanter Unterschied zum Ausgangsgewicht (Tag 0) mehr zu verzeichnen war.

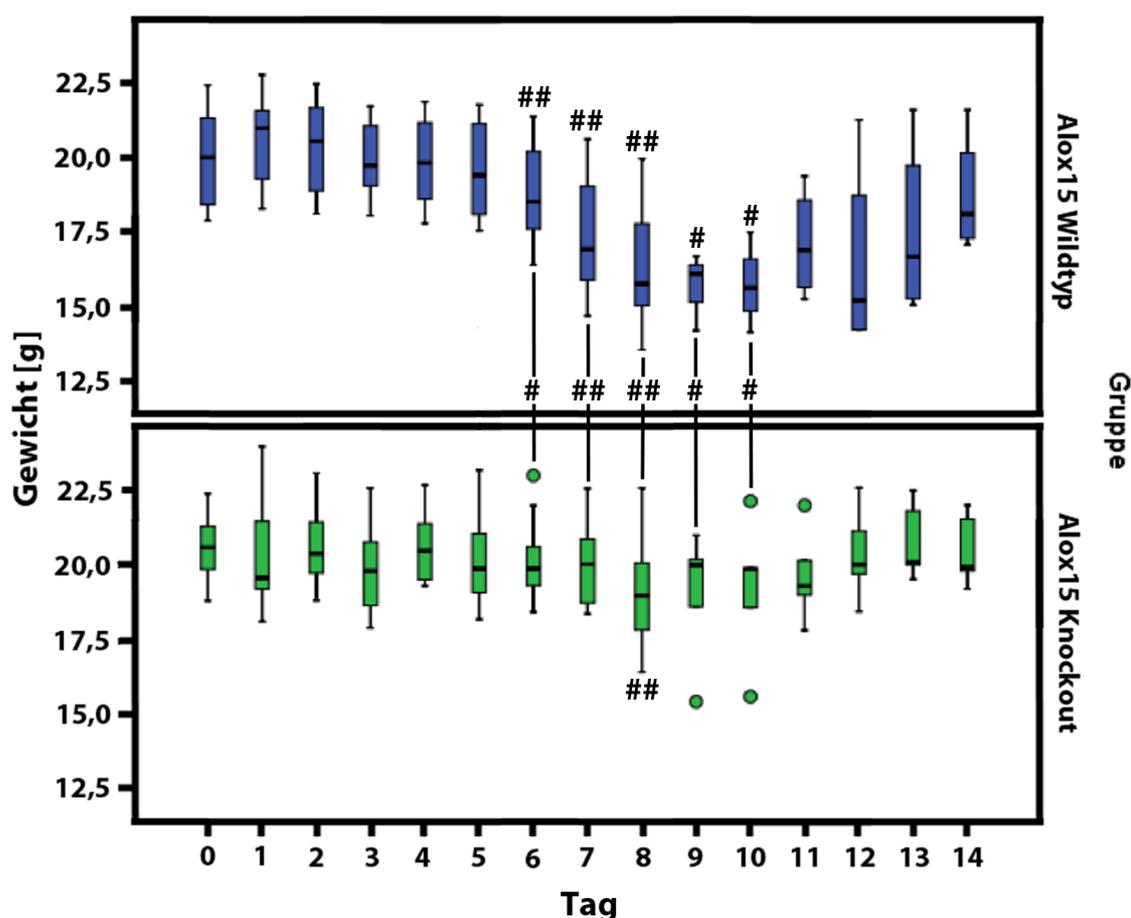


Abb. 3.2-1: Gewichtskinetiken von Wildtypmäusen (blau) und Alox15-defizienten Mäusen (grün). Die Gabe von DSS erfolgte über das Trinkwasser von Tag 0 bis 7 (Entzündungsphase), darauf folgte von Tag 8 bis 14 die Resolutionsphase, in der die Tiere normales Trinkwasser erhielten (n = 10 pro Gruppe). Die grünen Kreise stellen Ausreißerwerte der Alox15-defizienten Tiere dar, # p < 0,05, ## p < 0,005.

Ein interessanter Aspekt bei dem Verlauf der experimentellen DSS-Kolitis war, dass im Hauptexperiment nur vier von zehn Wildtypmäusen den Endpunkt des experimentellen Protokolls erreichten. Alle weiteren mussten aufgrund der schweren Symptomausprägung (starke Verschlechterung des allgemeinen Gesundheitszustandes) aus Tierschutzgründen vor Ende des Experiments euthanasiert werden.

Im Vergleich dazu zeigten die Alox15-defizienten Mäuse (grün) eine völlig andere Gewichtskinetik. Bis zum Tag 5 nach Beginn der DSS-Applikation variierte das Gewicht um das Ausgangsgewicht. Erst ab Tag 7 zeigte sich eine Tendenz zur Gewichtsabnahme, die nur am Tag 8 so ausgeprägt war, dass einmalig ein statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangsgewicht quantifiziert werden konnte. In den Folgetagen, bis zum Ende des Experiments am Tag 14, erholten sich die Alox15-defizienten Tiere sehr schnell und erreichten bereits am Tag 12 ihr Ausgangsgewicht.

**Zusammenfassung:** Wildtypmäuse reagierten auf die Applikation von 2,5 % DSS im Trinkwasser über sieben Tage mit einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes beginnend am Tag 6 des experimentellen Protokolls. Bei Alox15-defizienten Tieren zeigten sich mit Ausnahme von Tag 8 des experimentellen Protokolls keine signifikanten Veränderungen des Körpergewichtes zum Ausgangswert. Diese Daten deuten auf eine pro-inflammatorische Wirkung der Alox15 in diesem Krankheitsmodell hin.

### 3.2.3 *Disease Activity Index*

Der *Disease Activity Index* (DAI) ist, neben der Gewichtsveränderung, ein weiterer wichtiger Verlaufsparemeter für die Schwere einer experimentellen DSS-Kolitis (Cooper et al., 1993). In diesen Index fließen der Grad der Gewichtsabnahme (Prozentsatz vom Ausgangsgewicht), die Konsistenz des Stuhls und mögliche rektale Blutungen ein. Die Spanne des DAI reicht von 0 bis 12 Punkten, wobei ein DAI von 0 gesunde Tiere und ein DAI von 12 schwerkranke Tiere beschreibt (Tabelle 3.1). Die Höhe des Index ist demnach proportional zur Schwere der Kolitis. Der DAI wurde, wie die Kolonlänge, zu den Zeitpunkten 0, 8 und 14 Tage im laufenden Versuch detailliert bestimmt (Abb. 3.2-2). Eine detaillierte tägliche Untersuchung der Tiere hätte diese zu sehr unter Stress gesetzt. Zu Beginn des Experiments war sowohl in der Gruppe der Wildtypmäuse als auch in der Gruppe der Alox15-defizienten Tiere keine Krankheitsaktivität zu beobachten, da nur

gesunde Tiere in den Versuch aufgenommen wurden. Somit ist ein DAI-Score von 0 in beiden Tiergruppen am Tag 0 vergeben worden. Zum Höhepunkt der Entzündung am Tag 8 war ein signifikanter Anstieg des DAI in beiden experimentellen Tiergruppen nachweisbar. Bei den Wildtyptieren wurde durchschnittlich ein Score von 9,7 erreicht, wobei einigen Tieren der maximale Score von 12 zugeordnet werden musste. Die Alox15-defizienten Tiere unterschieden sich signifikant von den Wildtypmäusen, da sie nur einen durchschnittlichen DAI-Score von 4,5 erreichten. Am Tag 8 des experimentellen Protokolls mussten zwei Wildtyptiere aufgrund ihres schlechten Gesundheitszustandes euthanasiert werden.

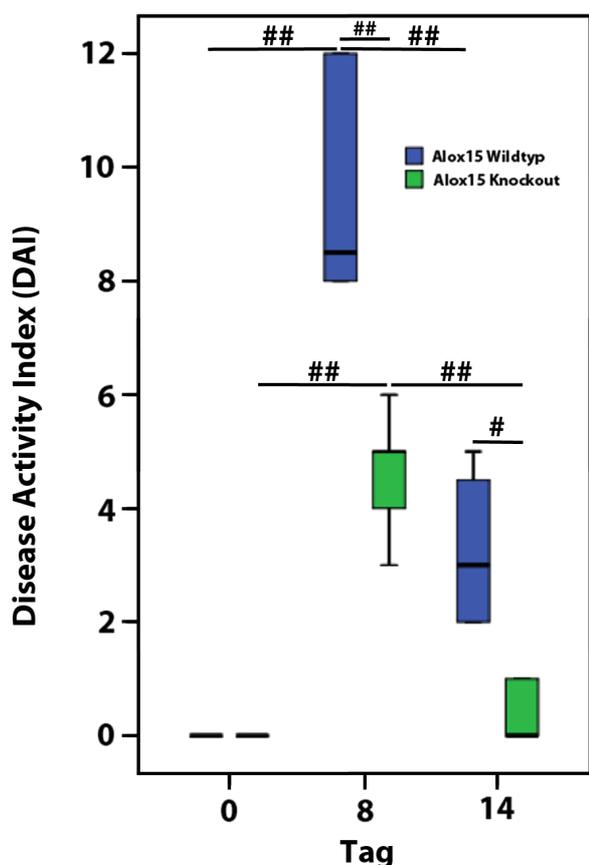


Abb. 3.2-2: Disease Activity Index (DAI) von Wildtypmäusen (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ .

Nach Absetzen des DSS am Tag 7 des experimentellen Protokolls erholten sich die Tiere beider Tiergruppen relativ schnell. Der durchschnittliche DAI-Score sank signifikant bei den Wildtypmäusen auf 3,25 und bei den Alox15-defizienten Tieren auf 0,4 ab. Trotz der schnellen Erholung in beiden Gruppen blieb auch am Tag 14 noch ein signifikanter Unterschied zwischen Alox15<sup>+/+</sup>- und Alox15<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisbar. Im Gesamtverlauf der DSS-Kolitis verschlechterte sich der Gesundheitszustand der Wildtyptiere teilweise so stark, dass weitere vier Tiere dieser Gruppe euthanasiert werden mussten und

am Ende nur vier von zehn Wildtyptieren den Tag 14 des experimentellen Protokolls erreichten. Bei den Alox15-defizienten Tieren mussten keine Tiere aufgrund ihres Gesundheitszustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

**Zusammenfassung:** Auch mit Fokus auf den *Disease Activity Index* (DAI) gab es im Verlauf der experimentellen DSS-Kolitis zwischen den beiden tierexperimentellen Gruppen statistisch signifikante Unterschiede. Dabei fiel die Erhöhung des DAI in der akuten Phase der Entzündung in der Gruppe der Wildtypiere signifikant größer aus als bei Alox15-defizienten Tieren. Nach der Resolutionsphase zeigten die Alox15-defizienten Tiere nahezu keine Krankheitsaktivität mehr. In der Gruppe der Wildtypiere erholten sich die Tiere deutlich, zeigten jedoch noch einen leicht erhöhten DAI. Diese Daten unterstützen die Vermutung einer pro-inflammatorischen Wirkung der Alox15 in diesem Krankheitsmodell.

### 3.2.4 Kolonlänge

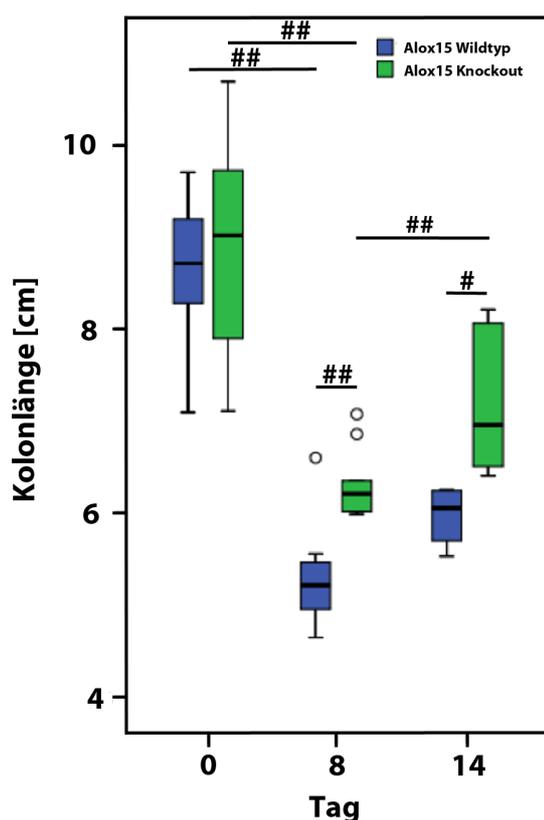


Abb. 3.2-3: Kolonlänge [cm] bei Wildtypmäusen (blau) und Alox15-defizienten Mäusen (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes).

An den Tagen 0, 8 und 14 wurde nach Tötung der Tiere das Kolon entnommen und dessen Länge gemessen (Abb. 3.2-3). Zusätzlich wurde das makroskopische Erscheinungsbild des Organs zwischen den beiden Tiergruppen verglichen. Zum Tag 0 fiel bei der Kolonlänge kein statistischer Unterschied zwischen beiden experimentellen Tiergruppen auf, was belegt, dass der systemische *Knockout* der Alox15 keinen phänotypischen Einfluss auf die Länge oder das makroskopische Erscheinungsbild des Kolons bei gesunden Mäusen hat. Eine durchschnittliche Kolonlänge von 8,57 cm wurde bei den

Wildtypieren ermittelt, während sich eine mittlere Kolonlänge von 8,80 cm bei den Alox15-defizienten Tieren ergab. Analog zum Gewichtsverlauf war der Grad der

Kolonverkürzung bei den Wildtyptieren zum Höhepunkt der Entzündungsreaktion (mittlere Kolonlänge von 5,31 cm) signifikant stärker ausgeprägt als bei den Alox15-defizienten Tieren (mittlere Kolonlänge von 6,30 cm). Somit verkürzte sich das Kolon bei den Wildtyptieren signifikant um zirka 3,5 cm, bei den Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren nur um zirka 2,5 cm. Nach Ende der DSS-Applikation nahm die Kolonlänge in beiden Tiergruppen wieder zu, erreichte aber nicht das Ausgangsniveau am Tag 0. Diese Daten zeigen, dass die akute DSS-Kolitis keinen irreversiblen Schaden am Kolon induziert. Die Normalisierung der Kolonlänge erfolgte im Rahmen der Resolutionsphase in beiden Tiergruppen, wobei die Wildtyptiere eine noch immer signifikant reduzierte Kolonlänge im Vergleich zu Alox15-defizienten Mäusen aufwiesen.

Eine makroskopische Inspektion der entnommenen Kolonpräparate zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede in der Beschaffenheit des Kolons. Die Verkürzung des Kolons während der Entzündung geht einher mit einer ödematösen Wandverdickung. Dieses transmurale Ödem war makroskopisch insofern gut erkennbar, da das Kolon im Vergleich zum Kolon der Kontrolltiere vom Tag 0 sehr glasig erschien. Außerdem wies das Gewebe blutige Erosionen der Darmschleimhaut auf (Abb. 3.2-4). Die Auswertung der makroskopischen Entzündungssymptome zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyptieren und Alox15-defizienten Mäusen zu Beginn des experimentellen Protokolls nachweisbar waren. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte erst am Tag 8 nach DSS-Applikation festgestellt werden. Diese Unterschiede in Form von entzündlichen Veränderungen waren nach subjektiver Einschätzung bei Wildtypmäusen stärker ausgeprägt als bei den Alox15-defizienten Tieren.



Abb. 3.2-4: Makroskopische Darstellung des Kolons von Wildtyptieren (links) und Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren (rechts) an den Untersuchungstagen 0 (Kontrollgruppe) und 8 (Entzündungsgruppe). Nach Tötung der Tiere wurde das Kolon auf der gesamten Länge entnommen und die Länge gemessen sowie makroskopisch verglichen. Am Tag 0 stellten sich die Kola rosig und mit glatter, unverletzter Schleimhaut dar. Nach DSS-Gabe reduzierte sich die Kolonlänge signifikant bei beiden Tiergruppen. Die Schleimhaut wirkt glasig und insbesondere bei den Wildtyptieren sind blutige Erosionen erkennbar.

**Zusammenfassung:** Im Verlauf der akuten Phase der experimentellen DSS-Kolitis kam es in beiden tierexperimentellen Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der Kolonlängen. Dabei fiel die Kolonverkürzung bei den Wildtypmäusen signifikant größer aus als bei den Alox15-defizienten Tieren. In der Resolutionsphase der Entzündung erholte sich das Kolon beider Tiergruppen, was sich in der Kolonlänge widerspiegelte. Die Alox15-defizienten Mäuse erreichten annähernd die durchschnittlichen Ausgangslängen, was bei den Wildtypmäusen nicht der Fall war. Die Schlussfolgerung einer pro-inflammatorischen Wirkung der Alox15 in diesem Krankheitsmodell wird durch diese Daten unterstützt.

### 3.3 Die Veränderung der intestinalen Barrierefunktion durch DSS *in vivo*

Entzündungen des Darmes gehen fast immer mit einem (partiellen) Verlust der intestinalen Barriere einher (Kitajima et al., 1999; Wehkamp et al., 2016). Eine geeignete Methode zur Überprüfung der intestinalen Barrierefunktion ist die *Inverted Sac*-Methode (siehe Material und Methoden), die hier als *ex vivo*-Experiment an vitalem Kolongewebe zur Quantifizierung der Kolonpermeabilität angewendet wurde.

Interessanterweise zeigte ein Vergleich der Kolonpermeabilität von unbehandelten Alox15-defizienten Mäusen und Wildtyptieren (keine DSS-Applikation), dass Alox15-defiziente Tiere eine höhere Kolonpermeabilität aufwiesen. Diese Beobachtung wurde sowohl nach 30 min als auch nach 60 min der *in vitro*-Inkubation gemacht, war bei den verwendeten n-Zahlen statistisch gesehen aber nicht signifikant. Nach Behandlung mit DSS zeigten Wildtypmäuse am Tag 8 des experimentellen Protokolls eine signifikante Erhöhung der Kolonpermeabilität. Diese Veränderung konnte man sowohl nach 30 min als auch nach 60 min *in vitro*-Inkubation des Kolons beobachten. Die Alox15-defizienten Tiere zeigten hingegen nach DSS-Gabe keine signifikante Änderung der Kolonpermeabilität (Abb. 3.3-1). Diese Daten deuten darauf hin, dass die systemische Inaktivierung des *Alox15*-Gens die Kolonpermeabilität dahingehend beeinflusst, dass die Darmbarriere gegenüber DSS-induzierten Veränderungen widerstandsfähiger wird.

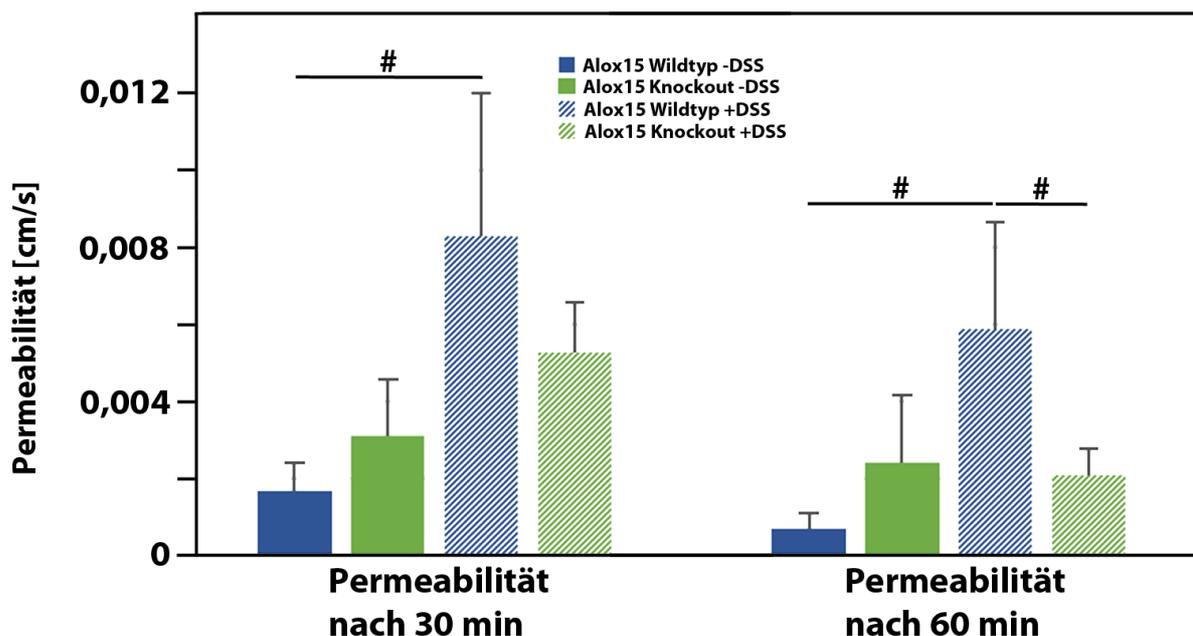


Abb. 3.3-1: *Ex vivo*-Messungen der Kolonpermeabilität mit der *Inverted Sac*-Methode. Gemessen wurde die Permeation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran durch die Kolonwand vor (volle Balken) und nach *in vivo*-Applikation von 2,5 % DSS im Trinkwasser über sieben Tage (schraffierte Balken) bei Wildtypmäußen (blau) und Alox15-defizienten Mäusen (grün). Die Zeiten der *in vitro*-Inkubation mit KHBB + 20µg/ml FITC-Dextran waren 30 min (links) und 60 min (rechts). Alox15-defiziente Tiere besitzen ohne DSS-Gabe eine höhere Permeabilität als Wildtypmäußen. Sowohl nach 30 min, als auch nach 60 min Inkubation zeigte sich bei den Wildtypmäußen ein signifikanter Unterschied zwischen der Permeabilität ohne/mit DSS. Bei den Alox15-defizienten Tieren nimmt die Permeabilität unter DSS-Gabe nach 30 min Inkubation in geringem Maße zu. Nach einer Inkubation von 60 min ist die Permeabilität leicht geringer als vor DSS-Gabe. #  $p < 0,05$ .

**Zusammenfassung:** Die *ex vivo*-Messungen der Kolonpermeabilität zeigten, dass Wildtypmäuße nach DSS-Behandlung eine deutlich höhere Kolonpermeabilität aufwiesen als Alox15-defiziente Mäuse. Die Daten unserer *ex vivo*-Experimente belegen, dass DSS-Applikation die Kolonpermeabilität deutlich erhöht und dass der systemische *Knockout* der Alox15 diesen Effekt abschwächt. Auch diese Resultate deuten auf eine pro-inflammatorische Funktion der Alox15 hin.

### 3.4 Differenzielle Genexpression bei DSS-Kolitis

Um Veränderungen im Genexpressionsmuster von Wildtypmäußen und Alox15-defizienten Tieren im zeitlichen Ablauf der experimentellen DSS-Kolitis zu untersuchen, wurde die mRNA-Kopienanzahl ausgewählter Gene im distalen Kolongewebe mittels qRT-PCR quantifiziert. Für diese Untersuchungen wurden Schlüsselenzyme der Synthese von Eicosanoiden (COX1, COX2, Alox15, Alox5) und Stickstoffmonoxid (iNOS)

sowie klassische pro- und anti-inflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) und Proteine der *Tight Junctions* (*Junctional Adhesion Molecule A*, Claudin-1, Occludin, *Zonula Occludens-1* und Kollagen Typ IV) ausgewählt. Bei der Quantifizierung der Genexpressionsmuster wurde die Anzahl der Kopien einer ausgewählten mRNA pro 50 ng extrahierter Gesamt-RNA angegeben. Dabei konnte das Expressionsniveau eines Gens mehr oder weniger willkürlich in drei Gruppen eingeteilt werden:

- i. Niedriges Expressionsniveau (<10.000 Kopien pro 50 ng RNA).
- ii. Mittleres Expressionsniveau (10.000 bis 100.000 Kopien pro 50 ng RNA).
- iii. Hohes Expressionsniveau (>100.000 Kopien pro 50 ng RNA).

Obwohl drei unterschiedliche Referenzgene (GAPDH,  $\beta$ -Actin, 36B4) quantifiziert wurden, eignete sich keines dieser Gene (bzw. die entsprechende mRNA) als interner Standard. Bei jedem der untersuchten Referenzgene wurde eine Regulation im Verlauf der Kolitis beobachtet. Die Normalisierung auf ein *Master-Houskeeping-Gen* aus GAPDH,  $\beta$ -Actin und 36B4, wie es im Material und Methoden-Teil beschrieben wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA (Kopien/ 50 ng RNA).

### 3.4.1 Tight Junction-Proteine und die intestinale Barriere

Die intestinale Barriere ist unter anderem von der Expression von TJ-Proteinen und deren regulärer Anordnung abhängig (Iwaya et al., 2012). Abbildung 1.5-1 zeigt den Aufbau einer intakten interzellulären TJ-Verbindung und deren beteiligten Proteine und Proteinkomplexe. Die DSS-abhängige Erhöhung der Kolonpermeabilität (Abb. 3.3-1) lässt vermuten, dass sich die Expression der TJ-Proteine und somit die intestinale

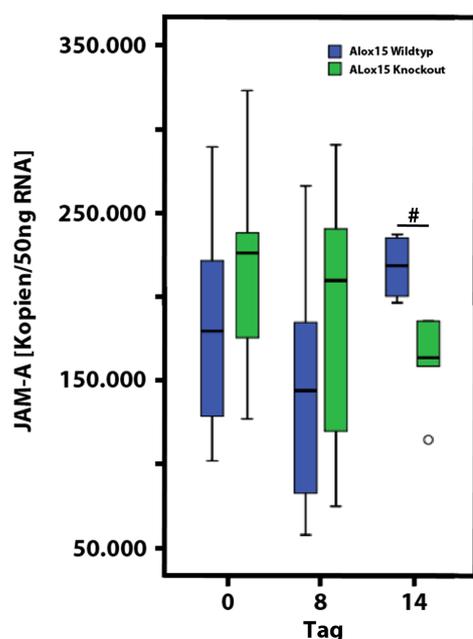


Abb. 3.4-1: Expression von JAM-A bei Wildtyp-Tieren (blau) und Alox15-defizienten Mäusen (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Die Expression von JAM-A unterscheidet sich am Tag 0 der experimentellen DSS-Kolitis nicht signifikant. Dennoch ist die Expression in den Wildtyp-Tieren geringer. Unter Einfluss von DSS wird die Expression von JAM-A in beiden Tiergruppen herunterreguliert bzw. bleibt gleich. Nachdem die DSS-Applikation beendet wurde, erholte sich die Expression der JAM-A in den Wildtyp-Tieren wieder auf das Ausgangsniveau vom Tag 0. Bei den Alox15-defizienten Tieren sank die Expression weiter ab. Dadurch war der Unterschied am Tag 14 zwischen Wildtyp- und Alox15-defizienten Tieren signifikant. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes).

Barriere im Verlaufe der DSS-induzierten Kolitis verändert (Woo et al., 2016).

Erst kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen ALOX15 und der Expression von TJ-Proteinen postuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass 15S-HETE (Produkt des ALOX15-Weges) die Expression von endothelialen (Chattopadhyay et al., 2014; Chattopadhyay et al., 2015) und epithelialen (Pochard et al., 2016) TJ-Proteinen reguliert. Chattopadhyay et al. (2014) fanden bei ihren Untersuchungen, dass der systemische *Knockout* des *ALOX15*-Gens die Ausbildung der TJ-Proteine begünstigt und damit vor dessen Funktionsverlust schützt. Diese Daten stimmen mit unseren Beobachtungen weitestgehend überein.

Um zu untersuchen, ob der systemische *Knockout* des *Alox15*-Gens einen Einfluss auf die Expression von TJs *in vivo* hat, wurden die Expressionsmuster verschiedener TJ-Proteine (Occludin, *Junctional Adhesion Molecule-A* und Claudin-1) mithilfe der qRT-PCR

quantifiziert. Ein Vergleich des Expressionsniveaus von Claudin-1 und JAM-A am Tag 0 des experimentellen Protokolls ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen. Bei JAM-A zeigte sich am Tag 14 zwischen den tierexperimentellen Gruppen ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.4-1).

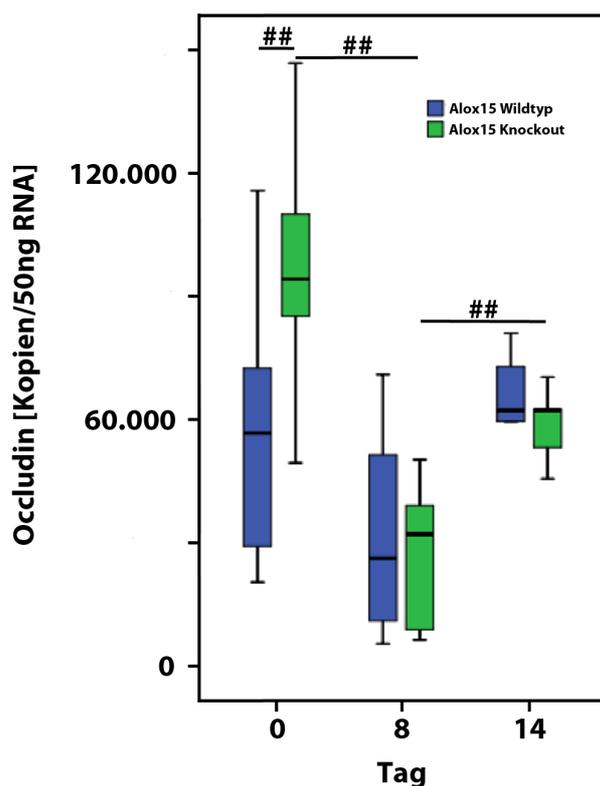


Abb. 3.4-2: Expression von Occludin im Kolon bei Wildtypmäußen (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Durch den DSS wurde die Occludin-Expression in beiden Tiergruppen herunterreguliert. Nach Absetzen des DSS erholten sich die tierexperimentellen Gruppen unterschiedlich gut. Problematisch ist die große Streuung am Tag 0. Dadurch kann nur schwer eine Aussage über Unterschiede getroffen werden. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ .

Für die Expression von Occludin hingegen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei den Ausgangswerten am Tag 0 ist trotz großer Streuung zu erkennen, dass die Expression der Wildtypmäuße unter dem Ausgangswert der Alox15-defizienten Tiere (Abb. 3.4-2) lag. Ist diese Tendenz korrekt, kann das darauf hinweisen, dass die Occludin-Expression durch den systemischen *Knockout* des *Alox15*-Gens hochreguliert wird. Durch DSS-Gabe sank das Expressionsniveau von Occludin in beiden Gruppen (Wildtypmäuße und Alox15-defiziente Mäuse) ab. Dabei wurde in beiden tierexperimentellen Gruppen ein vergleichbarer Wert erreicht und es gab am Tag 8 keinen signifikanten Unterschied mehr. Nach Absetzen

des DSS konnte eine erneute Hochregulation der Expression beobachtet werden, wobei nur die Veränderung der Alox15-defizienten Tiere statistisch signifikant war. Am Tag 14 ist die Expression von Occludin in den Wildtypmäußen und Alox15-defizienten Tieren ähnlich hoch und ohne Signifikanz.

Claudin-1, als weiteres wichtiges Protein des TJ-Komplexes, zeigte bei der Quantifizierung in Kontrolltieren (Tag 0 des experimentellen Protokolls) keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Alox15-defizienten Mäusen. Während der akuten Entzündung wurde die Expression von Claudin-1 hochreguliert. Damit unterscheidet sich Claudin-1 mit seiner Kinetik von den anderen TJ-Proteinen JAM-A und Occludin. Diese Hochregulation war bei Alox15-defizienten Tieren statistisch signifikant, bei den Wildtypmäusen nicht (Abb. 3.4-3). Nachdem das DSS abgesetzt wurde, zeigte sich am Tag 14 eine Reduktion der Claudin-1-Expression. Dabei waren die

Expressionslevels bei Tieren mit systemischem Alox15-*Knockout* signifikant höher als bei Wildtyp-Tieren.

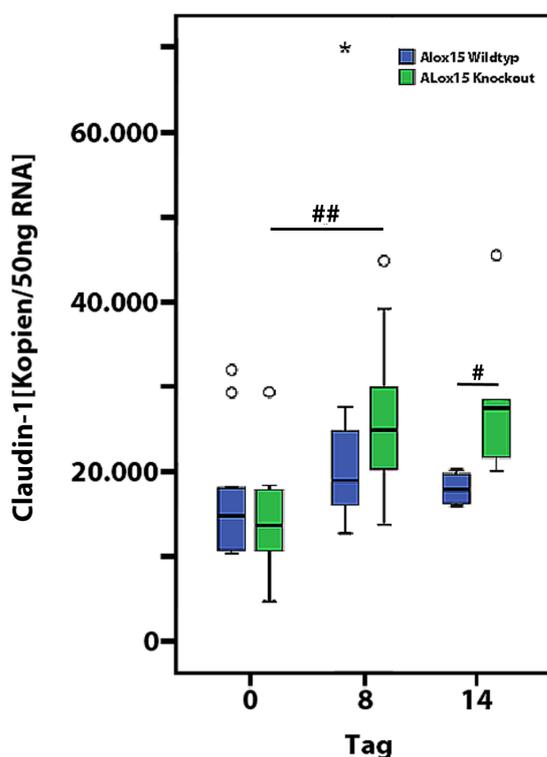


Abb. 3.4-3: Expression von Claudin-1 bei Wildtyp-Tieren (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Unter DSS-Applikation stieg die Expression sowohl in den Wildtyp-Tieren als auch in den Alox15-defizienten Tieren an. Nachdem das DSS abgesetzt wurde, war die Expression von Claudin-1 bei den Wildtyp-Tieren gleichbleibend. Bei den Alox15-defizienten Tieren war ein weiterer Anstieg der Expression zu sehen. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes), die Sternchen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

Somit zeigen die erhobenen Daten einerseits, dass die Änderungen der TJ-Proteine Occludin und Claudin-1 einer Regulation durch die Alox15 zu unterliegen scheinen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Barrierefunktion des Kolons durch DSS bei Alox15-defizienten Tieren weniger stark beeinträchtigt wird als bei Wildtypmäusen. Damit unterstützen die Daten zur Expression dieser TJ-Proteine die oben beschriebenen klinischen Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass Alox15-defiziente Mäuse resistenter gegenüber der DSS-Kolitis sind.

Der Vergleich der beiden oben genannten Normalisierungsmethoden (Normalisierung auf multiple Referenzgene und Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA) zeigt keinen signifikanten Unterschied der

Expressionsverläufe von Occludin, ZO-1, JAM-A und Claudin-1.

**Zusammenfassung:** Während der Phase der akuten Entzündung wurde die Expression von JAM-A und Occludin herunterreguliert. Dieser Abfall war in beiden Tiergruppen (Wildtyp vs. Alox15<sup>-/-</sup>) zu beobachten, wobei für JAM-A keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachzuweisen waren. In der Resolutionsphase wurde die Expressionen dieser Gene wieder hochreguliert. Claudin-1 zeigte eine abweichende Expressionskinetik. Sowohl in der akuten Entzündungsphase als auch in der Heilungsphase war ein Anstieg der Expression zu

beobachten. Dabei war die Hochregulation während der akuten Entzündungsphase bei Alox15-defizienten Tieren statistisch signifikant.

Die Untersuchung der TJ-Proteine auf RNA-Ebene ist der Einstieg für eine mechanistische Erklärung der signifikanten klinischen Unterschiede zwischen Wildtyptieren und Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren. Weitere Untersuchungen, wie immunhistologische Färbungen, sind bei Kroschwald et al. (2018) zu finden.

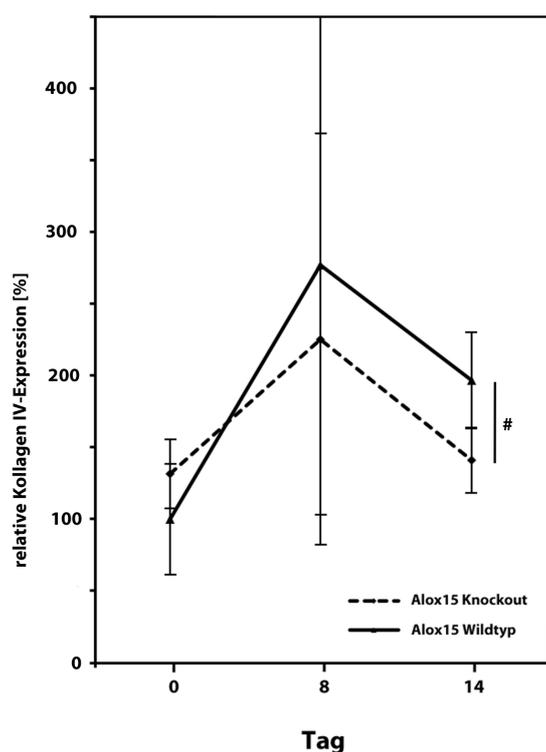


Abb. 3.4-4: Dargestellt ist die relative Expression von Kollagen Typ IV [%] bei Wildtyptieren (durchgezogene Linie) und Alox15-defizienten Tieren (gestrichelte Linie) an den Tagen 0, 8 und 14. Die Kollagen Typ IV-Expressionen wurden auf die Wildtyptiere am Tag 0 normiert. Die Gabe von DSS führt in beiden tierexperimentellen Gruppen zu einer Hochregulation der Kollagen Typ IV-Expression. Nachdem das DSS abgesetzt wurde, war die Expression von Kollagen Typ IV sowohl bei den Wildtyptieren als auch in den Alox15-defizienten Tieren herunterreguliert. #  $p < 0,05$ .

Kollagen Typ IV ist Hauptbestandteil der Basalmembran des Darmepithels und somit auch wichtig für die Integrität der Darmbarriere (Kiss et al., 2016). Da die histologischen Bilder (Abb. 3.4-5) der Entzündungsreaktion einen partiellen Verlust der Basalmembran durch die akute DSS-Kolitis belegen, wurde die relative Expression von Kollagen Typ IV zu den Zeitpunkten Tag 0 (Kontrolle), Tag 8 (Entzündung) und Tag 14 (Resolution) analysiert. Die relative Expression von Kollagen Typ IV war am Tag 0 in Alox15-defizienten Mäusen etwas höher als in den Wildtypkontrollen (Abb. 3.4-4). Während der akuten Entzündungsphase wurde die Expression von Kollagen Typ IV in beiden Mausstämmen hochreguliert, Dies könnte eine kompensatorische Reaktion auf die entzündlich-induzierte Störung des Kollagen Typ IV in der

Basalmembran sein. Am Tag 14 normalisierten sich die Kollagen Typ IV-Level wieder. Dabei fiel auf, dass zu diesem Zeitpunkt die Expression bei den Wildtyptieren signifikant höher war als bei Alox15-defizienten Tieren. Diese Beobachtungen könnten damit im Zusammenhang stehen, dass Alox15-defiziente Mäuse in der Histologie keine größeren

Defekte der Basalmembran und somit einen niedrigeren histologischen Score aufwiesen (Daten siehe Kroschwald et al., 2018). Während der Resolutionsphase erreichten die Alox15-defizienten Tiere den Ausgangswert der Kollagen Typ IV-Expression wieder und die Wildtypiere übertrafen den Ausgangswert vom Tag 0 um das Doppelte.

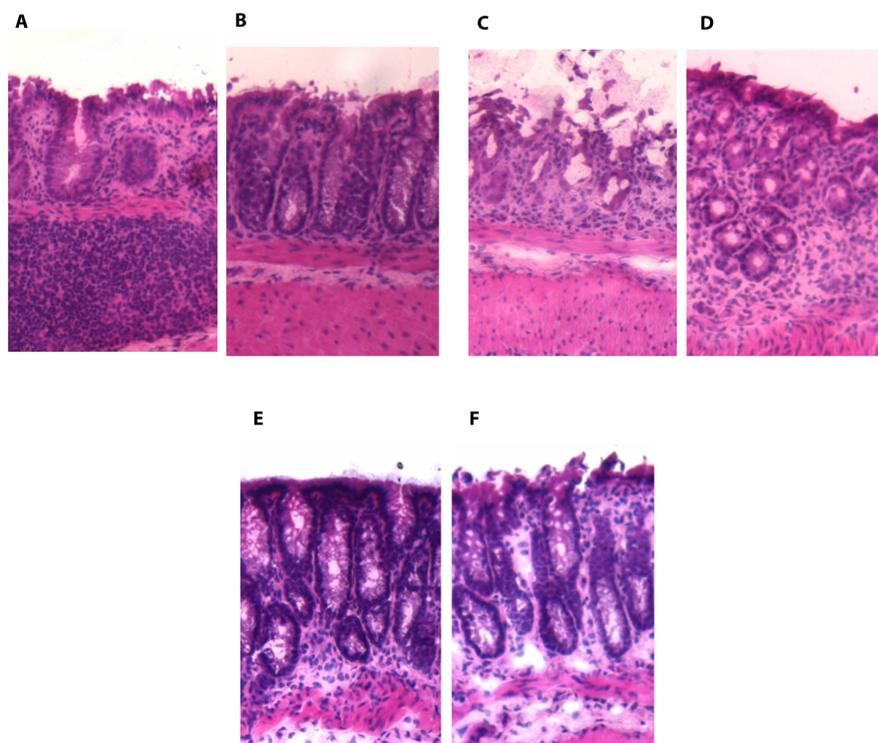


Abb. 3.4-5: Histologische Darstellung des Kolongewebes in HE-Färbung in Wildtypmäusen (A, C, E) und Alox15-defizienten Tieren (B, D, F) zu den Zeitpunkten 0 (A, B), 8 (C, D) und 14 (E, F), Vergrößerung 1:100. Man sieht als Zeichen der Entzündung in den Proben am Tag 8 (C und D) vermehrt Epitheldefekte, eine aufgehobene Kryptenstruktur und eine vermehrte Entzündungsinfiltration. Diese entzündlichen Veränderungen sind im Wildtyp stärker ausgeprägt als in den Alox15-defizienten Tieren.

**Zusammenfassung:** Unter dem Einfluss von DSS wird die Expression von Kollagen Typ IV in beiden experimentellen Gruppen (Wildtyp vs. Alox15<sup>-/-</sup>) stark hochreguliert, was auf einen Kompensationsmechanismus der entzündungsinduzierten Basalmembranschäden zurückzuführen sein könnte. Dieser Anstieg fällt bei Alox15-defizienten Tieren geringer aus, was auf eine reduzierte Notwendigkeit von Reparaturprozessen bei dieser Tiergruppe hindeuten könnte. Nach Absetzen des DSS fällt die Kollagen Typ IV-Expression in beiden experimentellen Gruppen wieder ab.

### 3.4.2 Lipoxygenasen

Im Rahmen der Entzündungsreaktion wurde in Kapitel 1.3.4.1 bereits auf den dualen Charakter der Alox15 eingegangen. Die genaue Rolle im speziellen Fall der DSS-induzierten Kolitis wurde bisher noch nicht untersucht. Um zunächst die Expression des *Alox15*-Gens ausschließlich in den Wildtyptieren im zeitlichen Verlauf einer DSS-Kolitis zu verfolgen, wurde die entsprechende mRNA aus dem Gewebe des distalen Kolons analysiert (Abb. 3.5-1). Zwischen den Wildtyptieren der Kontroll- (Tag 0) und Entzündungsgruppe (Tag 8) war kein signifikanter Unterschied in der Expression der Alox15 zu finden. An den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten wurde die Alox15 auf geringem Niveau exprimiert. In der Phase der Resolution am Tag 14 war ein statistisch signifikanter Anstieg der Alox15-Expression zu sehen. Mit Blick auf die vorliegenden klinischen Parameter gibt es verschiedene Möglichkeiten die erhobenen Daten zu interpretieren. Einerseits könnte die ansteigende Expression der Alox15 im Kolon

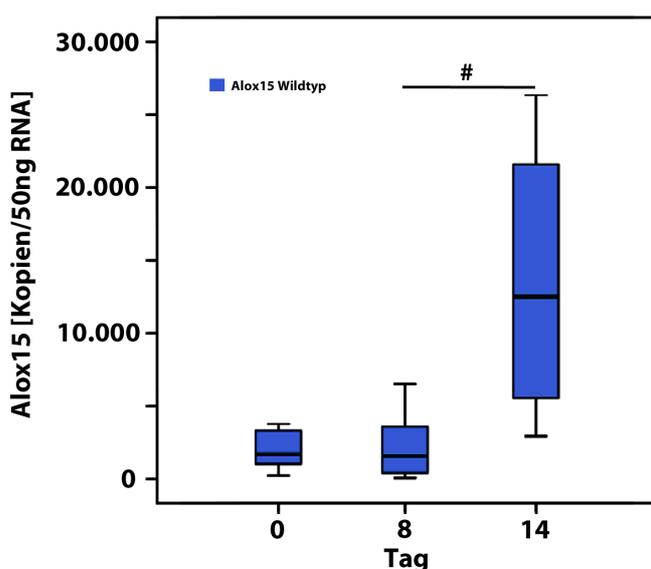


Abb. 3.5-1: Expression der Alox15 im Kolongewebe von Wildtyptieren an den Untersuchungstagen 0, 8 und 14. Die Expression veränderte sich zunächst durch Applikation von DSS nicht, sodass diese an den Tagen 0 und 8 auf ähnlichem Niveau war. Erst nach Absetzen des DSS stieg die Alox15-Expression signifikant an. #  $p < 0,05$ .

integraler Bestandteil der Resolution sein. Somit könnte dem Enzym im DSS-Kolitismodell eine pro-resolutorische oder anti-inflammatorische Rolle zugesprochen werden. Andererseits konnte anhand des DAI gezeigt werden (Abb. 3.2-2), dass eine systemische Inaktivierung des *Alox15*-Gens einen signifikant abgeschwächten Krankheitsverlauf induziert. Diese Beobachtung im *Alox15*-defizienten Organismus weist darauf hin, dass die Alox15 auch

pro-inflammatorisch wirken kann. An dieser Stelle sollte kritisch angemerkt werden, dass die Zeitpunkte unseres experimentellen Protokolls relativ weit auseinanderlagen (Tag 0, Tag 8, Tag 14), sodass detaillierte Aussagen zu den Expressionskinetiken der Alox15 nicht gemacht werden können.

Die *Alox15*-defizienten Tiere wurden hinsichtlich der Alox15-Expression nicht untersucht,

da die Inaktivierung des *Alox15*-Gens die Bildung einer funktionellen Alox15-mRNA nicht zulässt.

Als weitere LOX-Isoform wurde die Alox5 untersucht. Sie ist das Schlüsselenzym der Leukotrienbiosynthese und vermittelt hauptsächlich eine pro-inflammatorische und prokanzerogene Wirkung durch die Synthese von Leukotrienen (Poeckel et al., 2010; Zhou et al., 2015). Bei der Quantifizierung der Alox5-Expression am Tag 0 des experimentellen Protokolls zeigten beide Tiergruppen nur geringe Unterschiede der Expressionsniveaus (Abb. 3.5-2), wobei die Expression bei den Alox15-defizienten Tieren höher war. Unter Einfluss von DSS stieg die Alox5-Expression in den Wildtyptieren am Tag 8 an, die der Alox15-defizienten Tiere ging hingegen zurück. Zu diesem Zeitpunkt war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen zu beobachten. In der Resolutionsphase fiel bei den Wildtyptieren die Expression der Alox5 wieder leicht ab. Bei den Alox15-defizienten Tieren setzte sich der Abfall der Alox5-Expression weiter fort. Dieser Abfall der Alox5-Expression bei den Alox15-defizienten Tieren von Tag 8 zu Tag 14 war statistisch nicht signifikant. Die erhaltenen experimentellen Daten zur Expression der Alox5 bei der DSS-Kolitis lassen keine präzisen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Rolle des Enzyms bei der Kolitis zu. Deutlich wird jedoch, dass die systemische Inaktivierung des *Alox15*-Gens die Expressionsregulation der Alox5 im Rahmen der experimentellen DSS-Kolitis beeinflusst. Welcher molekulare Mechanismus hinter diesem Zusammenhang steckt, muss durch weiterführende Experimente untersucht werden.

Auch hier zeigt der Vergleich beider Normalisierungsmethoden (Normalisierung auf multiple Referenzgene und Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA) keinen signifikanten Unterschied der Expressionsverläufe von Alox15 und Alox5.

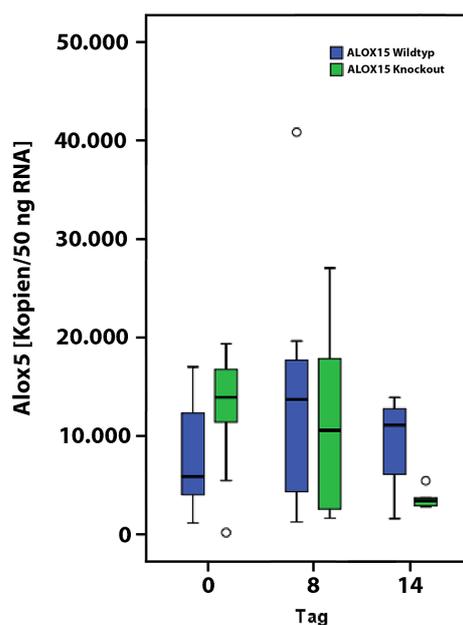


Abb. 3.5-2: Expression von Alox5 bei Wildtyptieren (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Zu Beginn des experimentellen Protokolls zeigten die Wildtypmäuse eine geringere Expression der Alox5 als die Alox15-defizienten Mäuse. Unter DSS-Gabe veränderte sich dieses Verhältnis insoweit, als dass die Expression in den Wildtypen hochreguliert und in den Alox15-defizienten Mäusen herunterreguliert wurde. Nach Absetzen des DSS fiel die Alox5-Expression in den Wildtyptieren wieder. In den Alox15-defizienten Tieren sank die Expression weiter. Die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes).

**Zusammenfassung:** Die Expression der Alox15 wird in Wildtyptieren nur in der Resolutionsphase der DSS-Kolitis hochreguliert. Für die Alox5 scheint der systemische *Knockout* der Alox15 Auswirkungen auf die Expression zu haben, da sowohl zwischen beiden Kontrollgruppen am Tag 0 Unterschiede zu beobachten waren als auch während der Resolutionsphase, wobei die Alox5-Expression in der Gruppe der Alox15-defizienten Tiere deutlich herunterreguliert wurde.

### 3.4.3 Cyclooxygenasen

Cyclooxygenasen sind die Schrittmacherenzyme der Prostaglandin-Biosynthese und

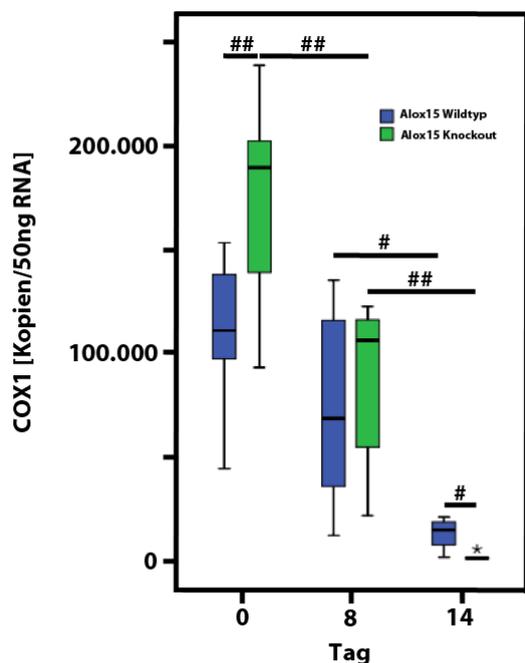


Abb. 3.5-3: Expression von COX1 bei Wildtyptieren (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Die Expression der COX1 war am Tag 0 signifikant höher in den Alox15-defizienten Tieren als bei Wildtyptieren. Unter Einfluss von DSS sank die Expression in beiden tierexperimentellen Gruppen ab. Trotz Absetzen des DSS sank die COX1-Expression in der zweiten Hälfte des experimentellen Protokolls in beiden Tiergruppen weiterhin signifikant ab. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Sternchen stehen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

wandeln freigesetzte AA über PGG<sub>2</sub> zu PGH<sub>2</sub> um (Chen et al., 2011), welches als Ausgangssubstrat für die Biosynthese aller anderen Prostanoiden fungiert. Es gibt zwei Isoformen des Enzyms (COX1 und COX2), die unterschiedliche Funktionen ausüben.

Die COX1, die konstitutiv exprimiert wird, ist für die Biosynthese der ‚physiologischen‘ Prostaglandine verantwortlich. Am Tag 0 konnten im Kolongewebe beider Tiergruppen (Wildtyptiere vs. Alox15-defiziente Tiere) hohe Expressionsniveaus der COX1 nachgewiesen werden (Abb. 3.5-3).

Interessanterweise lag die COX1-Expression bei Alox15-defizienten Tieren signifikant höher als bei Wildtyptieren. Durch DSS-Applikation sank die Expression der COX1 in beiden Tiergruppen auf fast die Hälfte ab. Hierbei war nur der Abfall der COX1 bei Alox15-defizienten Mäusen signifikant. Auch nach Absetzen des DSS sank die COX1-

Expression weiterhin, was sowohl bei Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren als auch bei Wildtypmäusen beobachtet wurde. In beiden Tiergruppen war diese Herunterregulation am Tag 14 des experimentellen Verlaufs statistisch signifikant.

Die COX2 dagegen bildet ‚pathologische‘ Prostanoiden, die vor allem bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen (Reuter et al., 1996). Werden Entzündungszellen stimuliert, steigt die Expression der COX2 drastisch an, die mit der Bildung pro-inflammatorischer Prostaglandine einhergeht. In den Experimenten war das Ausgangsniveau (Tag 0) der COX2-Expression in beiden tierexperimentellen Gruppen sehr gering, aber statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 3.5-4). Auf DSS-Gabe reagierten beide Tiergruppen mit einer Hochregulation der COX2-Expression. Nach

Beendigung der DSS-Applikation war bei Alox15-defizienten Tieren eine Herunterregulation der COX2-Expression zu beobachten.

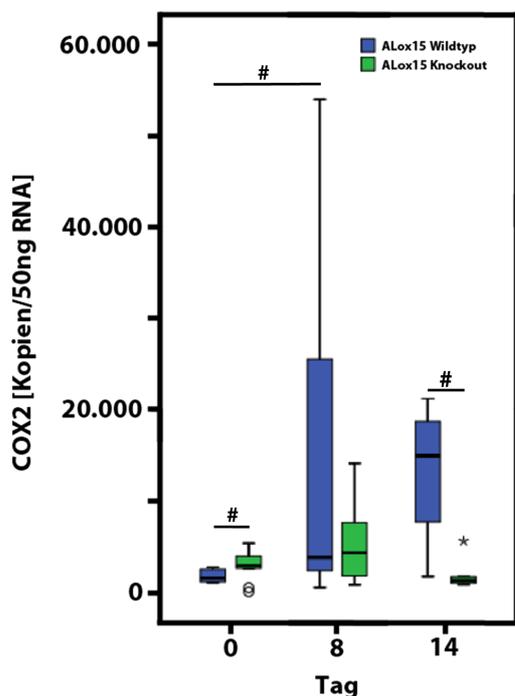


Abb. 3.5-4: Expression von COX2 bei Wildtyptieren (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Die Expression der COX2 am Tag 0 ist sowohl bei Wildtyptieren als auch bei den Alox15-defizienten Tieren auf einem geringen Niveau, aber signifikant unterschiedlich. Unter DSS-Gabe stieg in geringem Maße an. In der Resolutionsphase stieg die COX2-Expression bei den Wildtyptieren weiter an, trotz großer Streuung der Werte. Bei den Alox15-defizienten Tieren wurde die Expression noch unter den Ausgangswert am Tag 0 herunterreguliert. #  $p < 0,05$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes), die Sternchen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

Bei den Wildtyptieren zeigte sich allerdings ein weiterer Anstieg der COX2-Expression. Durch diese unterschiedliche Expressionskinetik war am Tag 14 des experimentellen Protokolls der Unterschied in der COX2-Expression zwischen Wildtyptieren und Alox15-defizienten Tieren statistisch signifikant.

Die vorliegenden Resultate zeigen, dass in beiden Tiergruppen (Wildtypmäuse und Alox15-defiziente Mäuse) eine ähnliche Expressionskinetik der COX1 zu finden ist, sodass man vermuten kann, dass der Verlust der Alox15 die Expression der COX1 im Verlauf der DSS-Kolitis nur im Expressionsniveau, nicht in der Expressionskinetik beeinflusst. Okayama et al. (2007) fanden heraus, dass die Cyclooxygenasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der DSS-Kolitis eine Rolle spielen. Dabei wurde die COX1 eher in

der frühen und die COX2 in der späten Phase exprimiert. Diese Daten stimmen mit den vorliegenden Beobachtungen überein. Die COX1-Expression ist durch einen stetigen Abfall in beiden Tiergruppen gekennzeichnet und die COX2 steigt erst langsam zum Tag 8 hin an. Dazu muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass die Zeitpunkte unseres experimentellen Protokolls relativ weit auseinanderlagen (Tag 0, Tag 8, Tag 14), sodass detaillierte Aussagen zu den Expressionskinetiken der ausgewählten Mediatoren nicht gemacht werden konnten.

Bei dem Vergleich zweier Normalisierungsmethoden (Normalisierung auf multiple

Referenzgene und Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionsverläufen von COX1 und COX2.

**Zusammenfassung:** Die beiden Isoformen der Cyclooxygenase sind im Rahmen der DSS-Kolitis unterschiedlich von einem systemischen *Knockout* der *Alox15* beeinflusst. Die Kinetik der COX1-Expression wird von der *Alox15*-Defizienz nicht wesentlich beeinflusst, wohl aber das Expressionsniveau, welches in den *Knockout*-Mäusen initial höher war und am Ende des Experimentes signifikant niedriger. Im Gegensatz dazu wird die COX2-Expression und -Kinetik durch den systemischen *Knockout* der *Alox15* reguliert. Bei *Alox15*-defizienten Tieren fällt die COX2-Expression ab, steigt bei Wildtyptieren jedoch weiter an.

#### 3.4.4 Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Ähnlich wie die COX2 gehört die iNOS zu den induzierbaren pro-inflammatorischen Enzymen. Am Tag 0 des experimentellen Protokolls war in beiden Tiergruppen (*Alox15*-defiziente Tiere und Wildtyptiere) die Expression der iNOS nur auf sehr niedrigem Niveau nachzuweisen (Abb. 3.5-5). Erwartungsgemäß stieg die Expression der iNOS in der Phase der akuten Entzündungsreaktion bei den Wildtypmäusen signifikant an. Bei den *Alox15*-defizienten Tieren wurde ein ähnlicher signifikanter Anstieg gemessen. Am Tag 8 waren somit die Expressionslevel der iNOS in beiden Tiergruppen annähernd gleich hoch. Interessanterweise ergab sich in der Resolutionsphase ein signifikanter Unterschied zwischen beiden tierexperimentellen Gruppen. Während bei den Wildtyptieren die Expression der iNOS weiterhin leicht zunahm, sank die Kopienzahl bei den *Alox15*-defizienten Tieren signifikant ab und erreichte annähernd ihren Ausgangswert (Tag 0). Diese Beobachtungen könnten dahingehend interpretiert werden, dass die funktionelle Inaktivierung des *Alox15*-Gens zu einer besseren inflammatorischen Resolution führt. Obwohl die molekularen Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der iNOS-Expression während der Resolutionsphase in beiden experimentellen Gruppen (Wildtyp vs. *Alox15*<sup>-/-</sup>) nicht geklärt werden konnte, sind die erhaltenen Ergebnisse kompatibel mit einer pro-inflammatorischen Wirkung der *Alox15* in diesem Entzündungsmodell. Sklyarov et al. (2011) postulierten für die akute Kolitis eine indirekte Interaktion der iNOS mit COX1, COX2 und *Alox5*. NO erhöht die katalytische Aktivität beider COX-Isoformen, was zu einer erhöhten Synthese pro-inflammatorischer

Prostaglandine führt. Weiterhin aktiviert NO auch die Alox5, so dass vermehrt pro-inflammatorisch wirkendes LTB<sub>4</sub> freigesetzt werden kann, was zur Verstärkung der Entzündungsreaktion beiträgt.

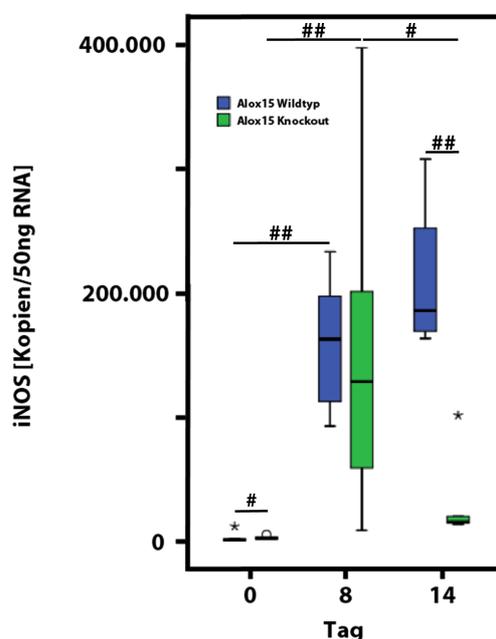


Abb. 3.5-5: Expression der iNOS im Kolongewebe von Wildtyptieren (blau) und Alox15-defizienten Mäusen (grün). Aufgrund der Induzierbarkeit der iNOS ist in beiden tierexperimentellen Gruppen am Tag 0 ein geringes Expressionsniveau zu sehen. Unter dem Einfluss von DSS wurde die iNOS-Expression signifikant in beiden Tiergruppen hochreguliert. Nach Absetzen des DSS stieg die Expression bei Wildtyptieren weiter an, in den Alox15-defizienten Mäuse wurde sie herunterreguliert. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes), die Sternchen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

Der Vergleich zweier Normalisierungsmethoden (Normalisierung auf multiple Referenzgene und Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA) zeigt keinen signifikanten Unterschied des Expressionsverlaufes von iNOS.

**Zusammenfassung:** Die Expression der iNOS wird in der akuten Entzündungsphase in beiden experimentellen Gruppen hochreguliert. In der Resolutionsphase wurde ein weiterer Anstieg der iNOS-Expression bei Wildtypmäusen beobachtet, während bei Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren ein signifikanter Abfall zu verzeichnen war. Die Herunterregulation der iNOS im Rahmen der inflammatorischen Resolution bei Alox15-defizienten Mäusen ist kompatibel mit der pro-inflammatorischen Wirkung der Alox15 in diesem Entzündungsmodell.

### 3.4.5 Weitere klassische pro-inflammatorische Zytokine

Während der akuten DSS-Kolitis wurde auch die Expression zwei weiterer klassischer pro-inflammatorischer Gene,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ , untersucht. Sie zeigten sehr ähnliche Expressionskinetiken (Abb. 3.5-6). Beide Zytokine wurden unter DSS-Einfluss hochreguliert und nach Absetzen des DSS sank ihre Expression wieder ab. Die Ausgangslevel (Tag 0) der beiden Zytokine waren trotz der sehr geringen Expression im Vergleich der beiden Tiergruppen (Wildtyp vs.  $\text{Alox15}^{-/-}$ ) signifikant unterschiedlich. Zu den Zeitpunkten 8 und 14 zeigten  $\text{Alox15}$ -defiziente Tiere ein höheres Expressionsniveau. Trotz der relativ großen interindividuellen Unterschiede wurden signifikante Unterschiede in den Kinetiken von  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  unter Einfluss von DSS gefunden. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyptieren und  $\text{Alox15}$ -defizienten Tieren am Tag 8. In der Resolutionsphase zeigen  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  einen gegensätzlichen Verlauf bei den Wildtyptieren, mit einem Anstieg bei  $\text{IL-1}\beta$  und einem Abfall bei  $\text{TNF}\alpha$ . Trotz unterschiedlicher Kinetik unterstützen beide Verläufe den bisher festgestellten pro-inflammatorischen Effekt der  $\text{Alox15}$ .

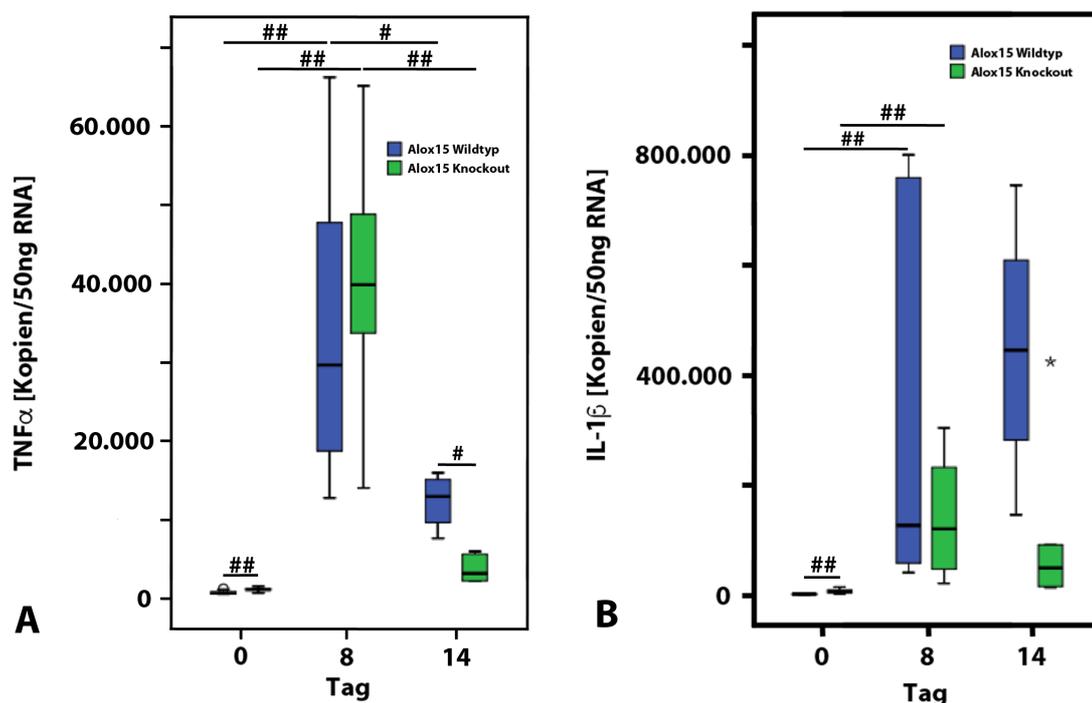


Abb. 3.5-6: Vergleichende Expression von  $\text{TNF}\alpha$  (**A**) und  $\text{IL-1}\beta$  (**B**) im Kolon von Wildtyptieren (blau) und  $\text{Alox15}$ -defizienten Mäusen (grün). Am Tag 0 war die Expression beider Zytokine auf sehr geringem Niveau. Als Reaktion auf die DSS-Gabe stieg die Expression beider pro-inflammatorischer Zytokine in beiden Tiergruppen signifikant an. Nach Absetzen des DSS wurde die Expression von  $\text{TNF}\alpha$  (**A**) in beiden experimentellen Gruppen signifikant herunterreguliert. Bei  $\text{IL-1}\beta$  (**B**) war die Expression in den Wildtyptieren weiterhin erhöht. Bei den  $\text{Alox15}$ -defizienten Tieren ging die Expression von  $\text{IL-1}\beta$  zurück. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Kreise stehen für Ausreißerwerte (Werte größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes), die Sternchen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

Bei dem Vergleich zweier Normalisierungsmethoden (Normalisierung auf multiple Referenzgene und Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA) zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Expressionsverläufe von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ .

#### 3.4.5.1 Tumor Nekrose Faktor $\alpha$

$\text{TNF}\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches von aktivierten Entzündungszellen (Makrophagen) im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion sezerniert wird (Wen et al., 2007). Im vorliegenden DSS-Kolitismodell scheint die Expression von  $\text{TNF}\alpha$  dem Verlauf eines klassischen pro-inflammatorischen Zytokins zu folgen (Hochregulation in der Entzündungsphase, Herunterregulation in der Resolution) und unabhängig von der Expression der  $\text{Alox15}$  zu sein. Die Expression war am Tag 0 des experimentellen Protokolls in beiden Tiergruppen auf sehr geringem Niveau nachweisbar (Abb. 3.5-6 A). Unter dem Einfluss von DSS und zunehmender Induktion der Kolitis stieg die Expression sowohl bei Wildtypmäußen als auch bei  $\text{Alox15}^{-/-}$ -Mäusen signifikant an. Nachdem DSS abgesetzt wurde, erholten sich die Tiere rasch, was sich in einer herunterregulierten Expression von  $\text{TNF}\alpha$  widerspiegelte. Der Ausgangswert vom Tag 0 konnte jedoch nicht ganz erreicht werden. Zum Ende des Experimentes ergab sich eine signifikante Differenz zwischen Wildtypmäußen und  $\text{Alox15}$ -defizienten Mäusen, wobei bei den Wildtypmäußen eine höhere Expression nachgewiesen wurde.

**Zusammenfassung:** Aufgrund der gleichartigen Expressionskinetiken beider Tiergruppen ist anzunehmen, dass der systemische *Knockout* der  $\text{Alox15}$  nur einen geringen oder keinen Einfluss auf die Expressionskinetik von  $\text{TNF}\alpha$  während der akuten DSS-Kolitis hat. Signifikante Unterschiede im Expressionsniveau von  $\text{TNF}\alpha$  konnten sehr wohl festgestellt werden. Möglicherweise kann die geringere Herunterregulation des  $\text{TNF}\alpha$  im Rahmen der inflammatorischen Resolution bei Wildtypmäusen als pro-inflammatorischer Effekt der  $\text{Alox15}$  in diesem Entzündungsmodell gedeutet werden. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die vermehrte Migration von Makrophagen zurückzuführen.

#### 3.4.5.2 Interleukin-1 $\beta$

Als weiterer Vertreter der pro-inflammatorischen Zytokine wurde Interleukin-1 $\beta$  ( $\text{IL-1}\beta$ ) in

die Expressionsuntersuchungen einbezogen. Da weder Wildtyptiere noch Alox15-defiziente Mäuse Anzeichen einer Darmentzündung am Tag 0 des experimentellen Protokolls aufwiesen, wurde erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Menge IL-1 $\beta$  zu diesem Zeitpunkt im Kolon nachgewiesen. Wie auch schon bei TNF $\alpha$  beobachtet, wurde die Expression von IL-1 $\beta$  durch DSS-Gabe gleichermaßen in beiden Tiergruppen signifikant hochreguliert. Erst nach Absetzen des DSS zeigte sich ein Unterschied zwischen den Tiergruppen. Bei den Wildtyptieren wurde IL-1 $\beta$  trotz Fehlen von DSS weiterhin hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurde die Expression bei den Alox15-defizienten Tieren herunterreguliert (Abb. 3.5-6 B). Damit ähnelt das Expressionsprofil von IL-1 $\beta$  dem der iNOS. Hier zeigt sich, ähnlich wie bei iNOS, dass der systemische Verlust der Alox15 zu einer Beeinflussung der IL-1 $\beta$ -Expression in der Resolutionsphase führt.

**Zusammenfassung:** Obwohl die Ausgangslevel der IL-1 $\beta$ -Expression sehr gering waren, konnte für Alox15<sup>-/-</sup>-Mäuse ein signifikant höheres Expressionsniveau festgestellt werden. Analog zur iNOS wurde in der akuten Entzündungsphase in beiden Tiergruppen die IL-1 $\beta$ -Expression gleichermaßen hochreguliert. In der Resolutionsphase konnte ein weiterer Anstieg der medianen IL-1 $\beta$ -Expression bei Wildtypmäusen beobachtet werden, während bei Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren ein signifikanter Abfall zu verzeichnen war. Dieser signifikante Unterschied in der Resolutionsphase spricht für die pro-inflammatorische Wirkung der Alox15 in diesem Entzündungsmodell.

### 3.4.6 Anti-inflammatorische Zytokine

Damit eine Entzündung nicht chronifiziert, wird unter physiologischen Bedingungen die inflammatorische Reaktion durch eine veränderte Freisetzung von Zytokinen (z.B. IL-1 $\beta$ , COX1, TNF $\alpha$ ) und durch einen *Switch* zu vorwiegend anti-inflammatorischen Zytokinen beendet (R. Suzuki et al., 2016). Als ein Vertreter der anti-inflammatorischen Zytokine wurde der *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) untersucht. Im vorliegenden Experiment wurde TGF $\beta$  am Tag 0 auf mittlerem Niveau exprimiert und zwischen Wildtyptieren und Alox15-defizienten Tieren war ein signifikanter Unterschied zu sehen (Abb. 3.5-7). Auf DSS-Applikation reagierten beide Tiergruppen mit einer signifikanten Hochregulation der TGF $\beta$ -Expression. Diese Hochregulation blieb noch in der Resolutionsphase bestehen

und war bei Wildtyptieren stärker ausgeprägt als bei Alox15-defizienten Tieren. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch eine verschobene Kinetik der Wildtyptiere und damit einer späteren Resolution oder durch eine kompensatorische Erhöhung des TGF $\beta$  aufgrund eines stärker geschädigten Darms erklären.

Klassischerweise wird TGF $\beta$  zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gezählt, da er für die Regulation von regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) eine entscheidende Rolle spielt (Soufli et al., 2016). Zusätzlich ist TGF $\beta$  bei der Rekonstruktion des Gewebes nach abgelaufener Entzündungsreaktion beteiligt. Bezugnehmend auf CED und die experimentelle akute DSS-Kolitis bedeutet dies, dass TGF $\beta$  in die Bildung von Stenosen und Fisteln involviert sein könnte, da es bei chronischen Darmerkrankungen zu einem herunterregulierten

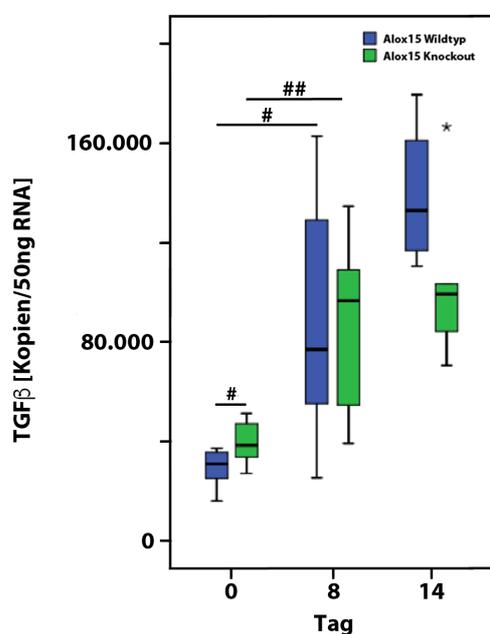


Abb. 3.5-7: Expression von TGF $\beta$  bei Wildtyptieren (blau) und Alox15-defizienten Tieren (grün) an den Tagen 0, 8 und 14. Die Expression von TGF $\beta$  befand sich am Tag 0 bei beiden tierexperimentellen Gruppen auf einem mittleren Niveau. Unter DSS-Applikation stieg die Expression bei beiden Tiergruppen signifikant an. Nachdem DSS abgesetzt wurde, stieg die TGF $\beta$ -Expression in den Wildtypmäusen weiterhin an, die Alox15-defizienten Tiere blieben auf einem ähnlichen Niveau wie am Tag 8. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , die Sternchen stehen für Extremwerte (Werte größer als das 3-fache des Interquartilabstandes).

die letzten Endes zur Fistelbildung führen.

Bei dem Vergleich zweier Normalisierungsmethoden (Normalisierung auf multiple Referenzgene und Normalisierung auf die Menge eingesetzter RNA) zeigt sich kein

Heilungsmechanismus kommt (Scharl et al., 2016). Die Ergebnisse können in zwei Richtungen interpretiert werden. Einerseits kann die erhöhte TGF $\beta$ -Expression in Wildtypmäusen darauf hindeuten, dass durch die stärkere Entzündung mehr TGF $\beta$  sezerniert werden muss, um die intestinale Homöostase wiederherzustellen. Andererseits ist auch denkbar, dass die schwere Entzündung der Wildtypmäuse fibrotische Veränderungen im Sinne von Stenosen oder Fisteln durch TGF $\beta$  induziert hat. Der Mechanismus dahinter wird von Scharl et al. (2016) wie folgt beschrieben. Die Hochregulation von TGF $\beta$  triggert die Expression und Sekretion von IL-13 und  $\beta$ 6-Integrin. Eine daraufhin erhöhte Aktivität von membranständigen Metalloproteasen fördert die Transformation intestinaler Epithelzellen zu invasiven Myofibroblasten,

signifikanter Unterschied des Expressionsverlaufes von TGF $\beta$ .

**Zusammenfassung:** Verglichen mit den klassischen pro-inflammatorischen Zytokinen konnte TGF $\beta$  im gesunden Kolon am Tag 0 in relativ hoher Konzentration nachgewiesen werden. Auf DSS-Gabe reagierten beide Tiergruppen mit einer Hochregulation der TGF $\beta$ -Expression, die während der Resolutionsphase bestehen blieb, und bei Wildtyptieren etwas stärker ausgeprägt war als bei Alox15-defizienten Mäusen.

### 3.5 Veränderung des NF $\kappa$ B-Signalweges

Bei der Aktivierung von Entzündungszellen spielt der NF $\kappa$ B-Signalweg eine wichtige Rolle, da NF $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor für die Expressionsregulation einer Vielzahl von pro-inflammatorisch wirkenden Genen bedeutsam ist (Mitchell et al., 2016). So induzieren

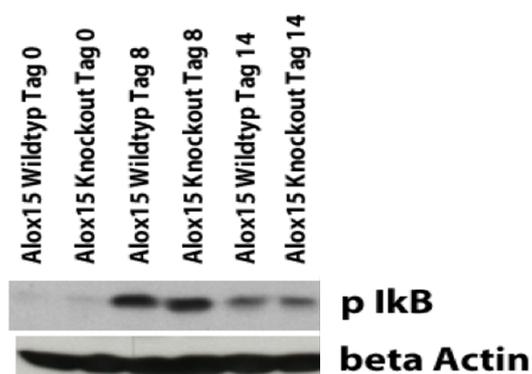


Abb. 3.6-1: Immuno-Blot vom phosphorylierten I $\kappa$ B und  $\beta$ -Actin als Referenzgen. Die ersten beiden schwachen Banden zeigen pI $\kappa$ B ohne Einfluss von DSS. Unter DSS-Gabe wurden die Banden bei den Wildtypmäusen und Alox15-defizienten Mäusen deutlich sichtbar, was für eine starke Zunahme von pI $\kappa$ B spricht. Nach Absetzen des DSS wurden die Banden schwächer, waren aber noch gut zu erkennen. Zwischen Wildtyptieren und Alox15-defizienten Tieren war zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied der Bandenstärke zu sehen.  $\beta$ -Actin war in allen Proben gleichmäßig vorhanden.

beispielsweise TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  die intrazelluläre Aktivierung von NF $\kappa$ B, was unter anderem zur gesteigerten Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen wie COX2, IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  führt (N. Li et al., 2016). Um die Aktivität von NF $\kappa$ B während der akuten DSS-Kolitis zu untersuchen, wurde die zelluläre Expression von phosphoryliertem I $\kappa$ B (pI $\kappa$ B) im Darmgewebe mithilfe eines Immunoblots aus Kolonhomogenaten von Wildtypmäusen und Alox15-

defizienten Tieren analysiert (Abb. 3.6-1). Phosphoryliertes I $\kappa$ B eignet sich für diese Analyse gut, da es den Aktivitätszustand des NF $\kappa$ B widerspiegelt – je höher pI $\kappa$ B ist, desto mehr NF $\kappa$ B ist ungebunden und aktiv. Entsprechend ergab sich, dass phosphoryliertes I $\kappa$ B am Tag 0, sowohl bei Wildtypmäusen als auch bei Alox15-

defizienten Tieren, nur in kleinen Mengen nachgewiesen werden konnte. DSS als Auslöser der Kolitis führte erwartungsgemäß dazu, dass das pI $\kappa$ B-Signal sich intensivierte. Diese Intensivierung war bei beiden Mauslinien zu beobachten und es gab keinen sichtbaren Unterschied zwischen beiden Tiergruppen. Am Tag 14, nachdem sich die Tiere sieben Tage vom DSS erholt hatten, war das Signal von pI $\kappa$ B deutlich schwächer als am Tag 8, aber auch deutlich intensiver als am Tag 0. Im Vergleich der beiden Tiergruppen im Verlauf der DSS-Kolitis, zeigten sich keine Unterschiede in der Kinetik oder Intensität von pI $\kappa$ B.

Die DSS-Behandlung von Wildtypmäusen und Alox15-defizienten Mäusen hat die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges zur Folge, was durch die Signalverstärkung von pI $\kappa$ B belegt wird. Diese Beobachtung stimmt mit experimentellen Daten von Liu et al. (2016) überein, die bei ihren Versuchen zu MALT1-Inhibitoren bei DSS-Kolitis ähnliche Ergebnisse bei den Wildtyptieren erhalten hatten. Als Folge der Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges werden vermehrt pro-inflammatorische *Downstream*-Gene, wie TNF $\alpha$ , iNOS und IL-1 $\beta$ , exprimiert. Bereits die annähernd gleiche TNF $\alpha$ -Kinetik von Wildtyp- und Alox15<sup>-/-</sup>-Tieren lässt vermuten, dass eine Alox15-Defizienz keinen Einfluss auf den NF $\kappa$ B-Signalweg hat. Dazu passend war anhand des untersuchten Verlaufes von pI $\kappa$ B keinerlei Unterschied zwischen Wildtypmäusen und Alox15-defizienten Tieren auszumachen, sodass der NF $\kappa$ B-Signalweg nicht von der Alox15-Expression abhängig zu sein scheint.

**Zusammenfassung:** Um die Rolle des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B bei der experimentellen DSS-Kolitis zu identifizieren, wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Kinetik der phosphorylierten Form des Inhibitors von NF $\kappa$ B (pI $\kappa$ B) untersucht. Es zeigte sich, dass die Applikation von DSS generell einen Einfluss auf die Aktivität von NF $\kappa$ B hat, jedoch spielt eine systemische Inaktivierung der Alox15 keine weitere Rolle.

## 4 Diskussion

Als Nicht-Hämeisen-enthaltende Dioxygenasen katalysieren Lipoxygenasen die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA). Sie sind ein wichtiger Bestandteil von zellulären Differenzierungsprozessen, der Biosynthese linearer Eicosanoide (z.B. LTs) und spielen bei Entzündungsreaktionen eine große Rolle. Zu Beginn der vorliegenden Forschungsarbeit gab es Literaturnachweise zu Untersuchungen zur Rolle der Alox15 in anderen entzündlichen Krankheitsmodellen wie der Arthritis (Kronke et al., 2009), der Arteriosklerose (L. Zhao et al., 2004) und der Glomerulonephritis (Munger et al., 1999). Dabei wurden gegensätzliche Funktionen des Enzyms deutlich. Es gab auch Untersuchungen in denen die Effekte verschiedener Alox15-Produkte auf die Pathogenese einer Kolitis untersucht wurden (Bento et al., 2011; C. Y. Chiu et al., 2012). C. Y. Chiu et al. (2012) beschrieben einen anti-inflammatorischen Effekt von Produkten der  $\Omega$ 3- und  $\Omega$ 6-FS, insbesondere der Resolvine und 17-Hydroxydocosahexaensäure (17-HDHA), auf die Schwere einer DSS-Kolitis. Da sowohl  $\Omega$ 3- als auch  $\Omega$ 6-FS Substrate der Alox15 darstellen, könnten die gebildeten Produkte eine Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielen. Eine ähnliche experimentelle Strategie verfolgten Bento et al. (2011). In dieser Studie wurden die Effekte von RvD1 und seinen Vorläufern bei einer DSS- bzw. TNBS-Kolitis untersucht. Da die Alox15 an der Biosynthese von RvD1 beteiligt ist (Abb. 1.3-1), deuten die beschriebenen Ergebnisse beider Forschungsgruppen darauf hin, dass die Alox15 pathophysiologisch bei entzündlichen Prozessen bedeutsam sein könnte. Diese Daten liefern indirekte Hinweise auf die Bedeutung der Alox15 bei der experimentellen Kolitis. Es gab aber bislang keine Arbeit, in der die direkte Beteiligung des Enzyms bei der experimentellen DSS-Kolitis untersucht worden ist. Weiterhin wurde die Rolle der Alox15 auf die Expression von Zytokinen und auf die intestinale Permeabilität im Verlauf der DSS-Kolitis noch nicht untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden Alox15-defiziente Mäuse genutzt, um die Rolle des Enzyms bei der DSS-induzierten Kolitis zu charakterisieren.

### 4.1 Interpretation klinischer Parameter bei der akuten DSS-Kolitis

Unter den chemisch-induzierten Kolitismodellen sind die TNBS- und DSS-induzierten Kolitismodelle (Perse et al., 2012; te Velde et al., 2007; Wirtz et al., 2007), aufgrund ihrer Einfachheit und des umfangreichen Wissens über den Induktionsmechanismus, die am häufigsten genutzten enteralen Krankheitsmodelle (Wirtz et al., 2007). Um die

Entscheidung für DSS als Agens zu erklären, muss zunächst der Mechanismus beider Agenzien bekannt sein. TNBS fungiert als enterales Hapten, welches durch intrarektale Applikation eine T-Zell-Antwort gegen Hapten-modifizierte autologe Proteine induziert (Kazi et al., 2009; te Velde et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist DSS toxisch für die Kolonepithelzellen und induziert primäre epitheliale Läsionen (Chassaing et al., 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine systemische Alox15-Defizienz die Entstehung von entzündlichen Darmläsionen durch DSS stark reduziert. Um zu testen, ob der protektive Effekt des *Alox15-Knockouts* im TNBS-Modell bestätigt werden kann, wurde ein Pilotexperiment (mit jeweils n = 5 Mäusen) durchgeführt. Hier wurde die Symptomschwere der Kolitis in weiblichen Wildtypen und Alox15-defizienten Tieren nach intrarektaler Gabe von TNBS quantifiziert. Die erhaltenen Daten (nicht gezeigt) deuten darauf hin, dass Alox15-Defizienz keinen Einfluss auf die T-Zell-Antwort hat.

Das Modell der experimentellen DSS-Kolitis der Maus kann zur Analyse der Mechanismen, die der akuten Kolitis des Menschen zugrunde liegen, aber auch für Untersuchungen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), angewendet werden. Dabei ist die aufgenommene DSS-Menge vom Volumen des aufgenommenen Trinkwassers abhängig. Vorbereitende Recherchen haben ergeben, dass DSS wenig Einfluss auf den Geschmack des Trinkwassers hat und somit der Zusatz von DSS die Trinkwasseraufnahme bei Wildtyptieren nicht beeinflusst (Schnabel, 2010). Nach unseren Erfahrungen ist die Bandbreite der verwendeten DSS-Konzentration von verschiedenen Parametern, wie z.B. der Jahreszeit und der verwendeten DSS-Charge, abhängig. Das wird deutlich, wenn man sich die in der Literatur verwendeten DSS-Konzentrationen anderer Arbeitsgruppen ansieht. Die Spannweite reicht von 2 bis 5 % DSS im Trinkwasser, bei gleichem Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere. Aufgrund dessen wurde die DSS-Konzentration in einem Vorversuch unmittelbar vor dem Hauptversuch ermittelt. Somit ist davon auszugehen, dass die ermittelte Konzentration von 2,5 % DSS aus dem Vorversuch für den darauffolgenden Hauptversuch ausreicht, um eine ebenso ausgeprägte Kolitis zu induzieren. Um den Unsicherheitsfaktor Jahreszeit so gering wie möglich zu halten, wurde die Zeit zwischen Vor- und Hauptversuch so kurz wie möglich gehalten.

Die DSS-Kolitis ist geprägt von einer Gewichtsabnahme, von Diarrhoe, von blutigem Stuhlgang, sowie von einer Reduktion der Kolonlänge. Viele Autoren, die das DSS-Modell anwenden, nutzen die Gewichtsveränderungen zur direkten Verlaufskontrolle der

DSS-Wirkung. Weitere geeignete experimentelle Kontrollparameter sind die Verkürzung der Kolonlänge und der DAI (Cooper et al., 1993). Die detaillierte Beschreibung und Anwendung dieser Parameter wurde bereits im Kapitel 3.2.1 ausgeführt. Als histochemischer bzw. biochemischer Parameter für den Schweregrad der DSS-Kolitis kann die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) in Gewebeschnitten oder Gewebestücken verwendet werden (Zou et al., 2016). Diese Parameter gelten als Marker für die Gewebsinfiltration mit neutrophilen Granulozyten. Bei der rein histologischen Untersuchung des entzündlich veränderten Kolongewebes werden, wie im Abschnitt 2.3-8 bereits beschrieben, folgende Parameter berücksichtigt (Dieleman et al., 1998):

- i. Schweregrad der Entzündung gemessen am Ausmaß der Infiltration des Gewebes durch Entzündungszellen.
- ii. Dicke des entzündlich befallenden Gewebes (Entzündungsödem).
- iii. Charakter der epithelialen Schädigung.
- iv. Ausmaß der entzündlichen Läsionen.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen sind bei Kroschwald et al. (2018) dargestellt.

Zusätzlich zu den vorliegenden Experimenten, wurden notwendige Vor- bzw. Wiederholungsversuche durchgeführt. Mit dieser größeren n-Zahl von insgesamt 29 Wildtyp- und 36 Alox15-defizienten Mäusen, die klinisch die gleiche Symptomausprägung präsentierten, konnte unterstützend gezeigt werden, dass ein systemischer *Knockout* der Alox15 zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptomatik bzw. zum Schutz vor einer DSS-Kolitis führt. Diese Schlussfolgerung gilt unabhängig davon, welcher der aufgeführten Parameter (klinisch oder histologisch) quantifiziert wurde. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Alox15 im Mausmodell der akuten DSS-Kolitis einen pro-inflammatorischen Einfluss haben muss, dessen Mechanismus weiterer Forschung bedarf.

#### **4.2 Störung der Integrität der Darmbarriere durch DSS**

Der funktionelle Status der Darmbarriere spielt bei der Pathogenese von CED eine entscheidende Rolle (R. Suzuki et al., 2016). Die Darmbarriere ist die natürliche Grenze zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Dadurch wird der Austausch von Nährstoffen, Mikroorganismen oder Noxen stark kontrolliert. Ist die Darmbarriere gestört, kann es durch Eindringen von toxischen Stoffen oder Mikroorganismen zu einer

exzessiven Immunantwort und somit auch zu einer Entzündungsreaktion kommen (T. Suzuki, 2013). Wichtigste Komponente für die Integrität der epithelialen Darmbarriere sind die TJ-Proteine. Die Verabreichung von DSS führt zu einer massiven Schädigung der intestinalen Barriere (T. Suzuki, 2013). Somit wird der Komplex, den die TJ-Proteine bilden, gestört und die Permeabilität der Darmschleimhaut erhöht, was den Zugang für Pathogene und andere schädigende Einflüsse ermöglicht. Somit kann DSS in der Darmschleimhaut die Synthese verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine (z.B.  $\text{TNF}\alpha$ ) auslösen, welche ihrerseits zu einer lokalen Entzündungsreaktion führen und zusätzlich die TJ-Proteine in ihrer Barrierefunktion schädigen (Gilani et al., 2016). Die zugrundeliegenden Schädigungsmechanismen, die zur Funktionsuntüchtigkeit des TJ-Komplexes führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass extrazelluläre Proteasen (Chymase, Trypsin), die von Entzündungszellen freigesetzt werden, die TJ-Komplexe abbauen und dadurch die epitheliale Barriere für schädigende Stoffe durchlässig machen (Bankova et al., 2014; Groschwitz et al., 2013; Wilcz-Villega et al., 2013). Es ist denkbar, dass auch Antigene aus dem Darmlumen (bspw. Nahrungsbestandteile, Bakterien) die Darmbarriere überwinden, was ebenfalls zu einer Immunreaktion in der Darmwand führt (T. Suzuki, 2013). Mithilfe von FITC-Dextran, einem fluoreszierenden Makromolekül, wurde die Permeabilität der epithelialen Barriere *ex vivo* untersucht. Ist die Darmbarriere geschädigt, können auch Makromoleküle wie das FITC-Dextran aus dem Darmlumen über die epitheliale Barriere in den Organismus übertreten. Unter physiologischen Bedingungen wäre FITC-Dextran aufgrund des Molekulargewichts von 4 kDa zu groß um die Darmbarriere zu überwinden. Diesen Mechanismus macht man sich bei der *ex vivo*-Untersuchung der intestinalen Permeabilität zunutze. Aufgrund der Schädigung der Darmbarriere durch DSS ist es möglich, dass FITC-Dextran die intestinale Barriere überwindet und als Messgröße der Schädigung der intestinalen Barriere verwendet werden kann.

Die Arbeitsgruppe um T. Suzuki (2013) konnte zeigen, dass Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  die Permeabilität der intestinalen Barriere erhöhen, da sie die Expression von Occludin herunterregulieren. In unseren Experimenten wurde mittels qRT-PCR die Expression von Occludin und Claudin-1 genauer untersucht und es konnte bestätigt werden, dass ein entzündlicher Prozess, in dem pro-inflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  involviert sind, zur Verringerung der Occludin-Expression führt. Die Expression von

Occludin in gesunden Alox15-defizienten Tieren war signifikant höher als in den Kontrollen der Wildtypiere. Im Verlauf der akuten DSS-Kolitis wurde Occludin in beiden Tiergruppen herunterreguliert. Im Gegensatz zu Occludin war bei Claudin-1 in der Phase der akuten Entzündung ein Anstieg der Expression zu beobachten. Poritz et al. (2011) berichteten über ähnliche Ergebnisse zur Claudin-1-Expression in Entzündungsmodellen und formulierten zwei mögliche Erklärungen für diesen beobachteten Effekt:

- i) Claudin-1 selbst hat einen disruptiven Effekt auf die Darmbarriere, da ein Überschuss an Claudin-1 die reguläre Anordnung der TJ-Proteine stört.
- ii) Claudin-1 steuert keinen wesentlichen Teil zur Barrierefunktion bei, sodass der Verlust der Barrierefunktion fast ausschließlich auf die Reduktion von Occludin und anderen TJ-Proteinen (JAM-A) zurückzuführen ist.

Letzteres halten Poritz et al. (2011) für wahrscheinlich, da sie kaum Claudin-1 im TJ-Komplex auf Proteinebene nachweisen konnten. Diese Ergebnisse sind überraschend, da Claudin-1 mehrfach als TJ-Protein in Epithelzellen beschrieben wurde (Hering et al., 2012). Sollte Claudin-1 regulärer Bestandteil des TJ-Komplexes enteraler Epithelzellen sein, lassen die vorliegenden Daten dreierlei Sachverhalte vermuten:

- i) Die Erhöhung der Expression von Claudin-1 spricht für den von Poritz et al. (2011) vermuteten disruptiven Charakter dieses Proteins;
- ii) Die systemische Inaktivierung der Alox15 verleiht den Tieren durch die höhere Expression von Occludin die Fähigkeit die intestinale Barriere, trotz beginnender Schädigung, über längere Zeit aufrecht zu erhalten;
- iii) Die Erhöhung der Claudin-1-Expression kann als frustranter Kompensationsmechanismus auf den Abfall von Occludin angesehen werden.

#### **4.3 Pro-inflammatorischer Effekt der Alox15 bei der intestinalen Inflammation**

Unabhängig von der Art des entzündungserregenden Reizes läuft eine Entzündung immer nach den gleichen Prinzipien ab. Auf einen inflammatorischen Reiz reagiert der Organismus mit einer bestimmten Abfolge der Expression verschiedener Zytokine, unter anderem die Expression der untersuchten Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , COX1 und 2 und  $\text{TGF}\beta$ . Um zunächst den inflammatorischen Reiz (pathogene Mikroorganismen, Fremdkörper) unschädlich zu machen und zu isolieren, werden pro-inflammatorische Zytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  oder NO gebraucht. Anschließend muss die Entzündungsreaktion durch anti-inflammatorische Zytokine, wie  $\text{TGF}\beta$  oder Resolvine beendet werden. DSS fungiert in diesem Krankheitsmodell als inflammatorischer Reiz, da es, wie schon in Abschnitt 1.2

besprochen, die Integrität der Darmbarriere stört und somit der Eintritt von schädigenden Mikroorganismen und Fremdkörpern von der Darmbarriere nicht aufgehalten werden kann. Dadurch fällt die mechanische Schutzfunktion der Darmbarriere aus und es kommt zu einer exzessiven zellulären Immunantwort (T. Suzuki, 2013).

Um Aussagen zur Rolle der Alox15 bei der DSS-Kolitis zu erhalten, wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Alox15-Expression bei Wildtypmäußen quantifiziert. Diese Untersuchung zeigte, dass die Alox15-Expression erst sehr stark in der Resolution der Entzündung ansteigt. Dieser Verlauf der Alox15-Expression lässt vermuten, dass die Alox15 am Ende des entzündlichen Geschehens oder erst in der Resolution eine wesentliche Rolle spielt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Expression dieses Enzyms zwar in der akuten Entzündungsphase induziert wird, aber erst zeitlich verzögert eine Wirkung zeigt. Damit kann die Expressionskinetik der Alox15 die Frage nach der pathophysiologischen Rolle des Enzyms (pro- oder anti-inflammatorisch) nicht zweifelsfrei beantworten.

Ein weiterer potentieller Mechanismus, über den die Alox15 den klinischen Verlauf der DSS-Kolitis beeinflusst, wäre die Beteiligung des Enzyms an der Expressionsregulation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. Die Alox15 könnte ebenfalls an der Regulation der Aktivität von Enzymen (iNOS, COX1, COX2) beteiligt sein, deren Reaktionsprodukte pro- oder anti-inflammatorische Wirkung entfalten. Deshalb wurde im Rahmen unserer Untersuchungen zunächst die Expression klassischer pro-inflammatorischer Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ) vergleichend in Alox15-defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtypmäußen untersucht. Die Ergebnisse zeigten zunächst keinen grundlegenden Unterschied in der Reaktion auf die Applikation von DSS. Sowohl die Wildtypmäuse als auch die Alox15-defizienten Tiere reagierten mit einer signifikanten Erhöhung der Expression pro-inflammatorischer Parameter. In der anschließenden Resolution der Entzündungsreaktion war die Expression dieser klassisch pro-inflammatorischen Gene in Alox15-defizienten Tieren signifikant herunterreguliert, was bei den Wildtypmäusen nicht in vergleichbarem Ausmaß zu beobachten war (Abb. 3.5-6).

Weitergehende Untersuchungen auf Lipidebene zeigten in Alox15<sup>-/-</sup>-Mäusen niedrigere Level an 12-HETE, ein Stoffwechselprodukt der Alox15, dem eine pro-inflammatorische Wirkung zugesprochen wird (Faulkner et al., 2015; Kroschwald et al. 2018). Aufgrund des entzündlichen Stimulus durch DSS kam es erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der 12-HETE vor allem bei den Wildtypmäußen und im geringen Maß in den Alox15-defizienten

Tieren. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der vorher benannten pro-inflammatorischen Wirkung der Alox15 in der DSS-Kolitis.

#### 4.4 NF $\kappa$ B-Signalweg

Verschiedene Mechanismen, im Zusammenhang mit einer entzündlichen Reaktion im Organismus, führen zur Aktivierung von NF $\kappa$ B (Kapitel 1.6). Für die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in Entzündungszellen ist ein Stimulus z.B. in Form von TNF $\alpha$  nötig. Ist diese Signalkaskade aktiviert, wird I $\kappa$ B phosphoryliert, löst sich von NF $\kappa$ B ab und der Transkriptionsfaktor kann in den Nukleus translozieren. Dort ist er für die Aktivierung der Transkription der *Downstream*-Gene wie COX2, IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  zuständig. Im Vergleich zwischen Alox15-defizienten Mäusen und Wildtyptieren, konnte im Krankheitsmodell der akuten experimentellen DSS-Kolitis kein signifikanter Unterschied im Aktivitätszustand von pI $\kappa$ B quantifiziert werden. Der zeitliche Verlauf der I $\kappa$ B-Phosphorylierung in Wildtyptieren und Alox15-defizienten Tieren war ähnlich. Die Aktivitätskinetik des NF $\kappa$ B war bereits aus der Kinetik von TNF $\alpha$  zu schließen, da sich Wildtyptiere und Alox15-defiziente Tiere hier nicht wesentlich unterschieden. Lediglich das Expressionsniveau am Tag 14 war signifikant unterschiedlich. Somit ist davon auszugehen, dass der funktionelle Verlust der Alox15, trotz seiner anti-inflammatorischen Gesamtwirkung, keinen Einfluss auf die Aktivierung des Signalweges oder die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B hat.

#### 4.5 Rolle der Alox15 bei der akuten Entzündung und experimentellen DSS-Kolitis

Für die Alox15 werden sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften in verschiedenen tierischen Entzündungsmodellen diskutiert (Ivanov et al., 2015). Ältere Experimente zeigten, dass Lipoxygenase-Produkte (15-HpETE, 13-HpODE) eine Entzündung hervorrufen können (Kuhn, 1996). Neue Untersuchungen hingegen deuten darauf hin, dass komplexere ALOX15-Produkte (bspw. Protectin und Resolvin (Ariel et al., 2007)) anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen. Ob der Alox15 pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden können, ist offensichtlich vom verwendeten Krankheitsmodell abhängig. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die Alox15 bei der DSS-Kolitis eine pro-inflammatorische Wirkung besitzt und der Alox15-*Knockout* demzufolge anti-inflammatorisch wirkt. In ähnlichen Untersuchungen

zeigten andere Forschungsgruppen, dass Alox15-Produkte (z.B. Resolvine) eine protektive Wirkung auf die DSS-Kolitis haben (Bento et al., 2011; C. Y. Chiu et al., 2012). Chiu et al. (2012) untersuchten im murinen DSS-Kolitismodell den Effekt der Stoffwechselprodukte der  $\Omega$ 3- FS (17-HDHA) auf den Schweregrad einer DSS-Kolitis. Bento et al. (2011) führten ein Jahr zuvor ähnliche Versuche durch. Sie untersuchten jedoch den Effekt von Resolvin D1, seinem Vorläufer 17R-HDHA, und Resolvin D2 sowohl bei der DSS-induzierten als auch bei der TNBS-induzierten Kolitis. In beiden Modellen wurden protektive Effekte in Form einer Reduktion pro-inflammatorischer Mediatoren durch die verwendeten Alox15-Metabolite beschrieben. Diese Daten stehen im Widerspruch zu der von uns beschriebenen pro-inflammatorischen Wirkung der Alox15, wobei die verwendeten Modellsysteme nicht strikt vergleichbar sind. Zum einen ist bisher nicht untersucht worden, ob im Rahmen der experimentellen DSS-Kolitis überhaupt die verwendeten Alox15-Metabolite gebildet werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Alox15, unabhängig von der Bildung potentiell anti-inflammatorisch wirkender Reaktionsprodukte, pro-inflammatorische Effekte (z.B. durch erhöhte Expression pro-inflammatorischer Gene) induziert. Der Vergleich der Modelle mit Bento et al. ist insofern auch problematisch, da Bento et al. Wildtypmäuse mit zugesetzten  $\Omega$ 3-Fettsäure-Mediatoren (zeitlich begrenzte Veränderung durch externen Einfluss) und im vorliegenden Experiment *Knockout*-Mäuse (permanente Veränderung des Organismus) verwendet wurden.

Im humanen und murinen System existieren zwei unterschiedliche Lipoxygenasen, die AA zu 15-H(p)ETE umwandeln können, ALOX15 und ALOX15b. Untersuchungen der pathophysiologischen Rolle der ALOX15 und ALOX15b in Menschen und Mäusen gestalten sich jedoch kompliziert, da es tiefgreifende funktionelle Unterschiede zwischen beiden LOX-Isoformen gibt. Die murine Alox15 wandelt AA in 12-HpETE und 15-HpETE um, wobei 15-HpETE nur 10 % der Produktmischung ausmacht (Ivanov et al., 2015). Im Gegensatz dazu ist das humane Ortholog ein 15-lipoxygenierendes Enzym und produziert hauptsächlich 15-HpETE (Kuhn et al., 1993). Um die 12-lipoxygenierende murine Alox15 in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umzuwandeln, benötigt man nur einen Phe353Leu-Austausch (Borngraber et al., 1996). Will man den Einfluss von Metaboliten des Alox15-Weges im murinen Entzündungsmodell analysieren, sollte also 12-HpETE anstatt 15-HpETE appliziert werden. Im menschlichen System ist 15-HpETE das beste mimetische Agens. Eine ähnliche Situation existiert für die Alox15b. Das humane

Ortholog wandelt AA fast ausschließlich in 15-HpETE um, wohingegen die murine Alox15b vor allem 8-HpETE synthetisiert (Jisaka et al., 2000). Die einfache Mutation von zwei Schlüsselaminosäuren induziert eine komplette Konversion von der 8-lipoxygenierenden murinen Alox15b zum 15-lipoxygenierenden humanen Enzym (Jisaka et al., 2000). Somit ist 15-HpETE das am besten geeignete ALOX15B-Mimetikum beim Menschen, 8-HpETE hingegen das beste Alox15b-Mimetikum bei der Maus. Im menschlichen Darm fungiert 15-HETE als wichtiges Eicosanoid, das die intestinale Barriere durch Hemmung von AMP-aktivierten Proteinkinasen regulieren kann. Andere Studien mit enteralen Gliazellen, welche große Mengen an ALOX15B, aber keine ALOX15 exprimieren, zeigten, dass die ALOX15B der Hauptproduzent von 15-HETE im Darm zu sein scheint (Pochard et al., 2016). Im Rahmen der Untersuchungen wurde bei weiterführenden *in vitro*-Experimenten gefunden, dass 12-HETE im Unterschied zu 15-HETE und 8-HETE eine Reduktion der Permeabilität der Darmbarriere induziert (Kroschwald et al. 2018).

In vergleichenden Untersuchungen der murinen Alox15 und Alox15b im Verlauf der experimentellen DSS-Kolitis konnte beobachtet werden, dass die Alox15b bei Wildtyptieren in der Darmwand auf deutlich höherem Niveau (100-fach) exprimiert wird als die Alox15 (Kroschwald et al. 2018). Während der akuten Entzündungsphase verhält sich die Alox15b-Expression ähnlich wie die der Alox15. Auf den entzündungsstimulierenden Reiz durch DSS ist keine Änderung der Alox15b-Expression zu beobachten. Erst nach Absetzen des DSS wird die Expression der Alox15b deutlich hochreguliert. Auch wenn die Alox15b auf einem sehr viel höheren Niveau exprimiert wird als die Alox15, scheinen die vorliegenden Analysen zu zeigen, dass die Alox15 und ihr Stoffwechselprodukt 12-HETE dennoch einen größeren Einfluss auf die Permeabilität des Darmes haben als die Alox15b.

Vor kurzem wurde der murinen Alox15 auch eine Rolle bei der CU und beim Kolitis-assoziierten KRK zugeschrieben. Diese Hypothesen beruhen auf der Grundlage von *in vivo*-Inhibitorstudien durch Mangino et al. (2006). Wie schon in der Einleitung besprochen, macht es einen Unterschied, ob man Gene über- oder unterexprimiert oder ob man Enzyme durch Inhibitoren hemmt. In den Experimenten von Mangino et al. wurden Mäuse mit PD146176, einem selektiver Inhibitor der retikulozyten 15-Lipoxygenase-1 des Kaninchens (Sendobry et al., 1997) behandelt. Die intestinale Funktion der behandelten Tiere verschlechterte sich während der experimentellen Kolitis signifikant im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Mangino et al., 2006), was auf eine

anti-inflammatorische Wirkung der Alox15 hindeutete und. In der Studie von Mangino et al. wurde jedoch nicht untersucht, ob PD146176 tatsächlich die murine Alox15 hemmt und ob der schädliche *in vivo*-Effekt auf die Hemmung der Alox15 oder auf mögliche unerwünschte Nebeneffekte zurückzuführen ist. Solche direkten experimentellen Daten zur Hemmung der murinen Alox15 durch beispielsweise PD146176 sind von Bedeutung, da z.B. die Ratten-Alox15, welche eng mit der murinen Alox15 verwandt ist (Pekarova et al., 2015), nicht durch PD146176 inhibiert wird (Gregus et al., 2013). Ähnliches könnte für die Wirkung der *in vivo*-Inhibitorstudien durch Mangino et al. (2006) gelten.

## 5 Zusammenfassung

Die Alox15 zeigte in verschiedenen murinen Entzündungsmodellen wie Arthritis, Arteriosklerose und Glomerulonephritis unterschiedliche Effekte, wobei sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen beschrieben wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die Alox15 bei der akuten DSS-Kolitis der Maus spielt.

Für die Untersuchungen wurden weibliche Wildtypmäuse vom Stamm C57/BL6J mit Alox15-defizienten Tieren (identischer genetischer Hintergrund) verglichen. Nach oraler Verabreichung von DSS über das Trinkwasser wurden verschiedene klinische Parameter (Körpergewicht, Stuhlbeschaffenheit, rektale Blutungen) teilweise täglich quantifiziert. Zusätzlich wurde zu ausgewählten Zeitpunkten das Kolon der Tiere untersucht. Im Vordergrund der Analysen standen dabei die Quantifizierung der Expressionsmuster (qRT-PCR) von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen, die für die Synthese pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren verantwortlich sind.

Bei der Auswertung der klinischen Parameter ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Alox15-defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtypkontrolltieren im gesamten Zeitverlauf des Kolitisexperiments. Alox15-defiziente Tiere waren geschützter gegenüber der DSS-Kolitis, was auf eine pro-inflammatorische Wirkung der Alox15 hindeutet. Dieser Schutzeffekt äußerte sich in einem geringeren Gewichtsverlust, in einer reduzierten rektalen Blutungsneigung, in einer Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine und in einer verringerten Kolonpermeabilität bei *ex vivo*-Permeabilitätsmessungen. Die hier vorgelegten Daten belegen, dass weibliche Alox15-defiziente Mäuse vor einer experimentell-induzierten DSS-Kolitis geschützt sind. Dieser Schutz war auf einen verbesserten Erhalt der Strukturidentität der intestinalen Barriere zurückzuführen. Die Summation der experimentellen Daten deutet auf eine pro-inflammatorische Wirkung der Alox15 in diesem Modell hin.

**6 Literaturverzeichnis**

1. Ahmad, R., Sorrell, M. F., Batra, S. K., Dhawan, P., & Singh, A. B. (2017). Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol.* doi:10.1038/mi.2016.128
2. Altmann, R., Hausmann, M., Spottl, T., Gruber, M., Bull, A. W., Menzel, K., Rogler, G. (2007). 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPARgamma in human colonic epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 74(4), 612-622. doi:10.1016/j.bcp.2007.05.027
3. Ariel, A., & Serhan, C. N. (2007). Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol*, 28(4), 176-183. doi:10.1016/j.it.2007.02.007
4. Azuma, T., Shigeshiro, M., Kodama, M., Tanabe, S., & Suzuki, T. (2013). Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *J Nutr*, 143(6), 827-834. doi:10.3945/jn.113.174508
5. Bankova, L. G., Lezcano, C., Pejler, G., Stevens, R. L., Murphy, G. F., Austen, K. F., & Gurish, M. F. (2014). Mouse mast cell proteases 4 and 5 mediate epidermal injury through disruption of tight junctions. *J Immunol*, 192(6), 2812-2820. doi:10.4049/jimmunol.1301794
6. Baumgart, D. C. (2009). The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*, 106(8), 123-133. doi:10.3238/arztebl.2009.0123
7. Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet*, 380(9853), 1590-1605. doi:10.1016/S0140-6736(12)60026-9
8. Belkner, J., Wiesner, R., Kuhn, H., & Lankin, V. Z. (1991). The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett*, 279(1), 110-114.
9. Bento, A. F., Claudino, R. F., Dutra, R. C., Marcon, R., & Calixto, J. B. (2011). Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*, 187(4), 1957-1969. doi:10.4049/jimmunol.1101305
10. Biton, J., Boissier, M. C., & Bessis, N. (2012). TNFalpha: activator or inhibitor of regulatory T cells? *Joint Bone Spine*, 79(2), 119-123. doi:10.1016/j.jbspin.2011.09.017
11. Boeglin, W. E., Kim, R. B., & Brash, A. R. (1998). A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 6744-6749.
12. Boraschi, D., & Tagliabue, A. (2006). The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm*, 74, 229-254. doi:10.1016/S0083-6729(06)74009-2
13. Borngraber, S., Kuban, R. J., Anton, M., & Kuhn, H. (1996). Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases.

- J Mol Biol*, 264(5), 1145-1153. doi:10.1006/jmbi.1996.0702
14. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
  15. Brash, A. R., Boeglin, W. E., & Chang, M. S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6148-6152.
  16. Brutsch, S. H., Wang, C. C., Li, L., Stender, H., Neziroglu, N., Richter, C., Borchert, A. (2015). Expression of inactive glutathione peroxidase 4 leads to embryonic lethality, and inactivation of the Alox15 gene does not rescue such knock-in mice. *Antioxid Redox Signal*, 22(4), 281-293. doi:10.1089/ars.2014.5967
  17. Cabal-Hierro, L., & Lazo, P. S. (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*, 24(6), 1297-1305. doi:10.1016/j.cellsig.2012.02.006
  18. Chandrasekharan, N. V., & Simmons, D. L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biol*, 5(9), 241. doi:10.1186/gb-2004-5-9-241
  19. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, 104, Unit 15 25. doi:10.1002/0471142735.im1525s104
  20. Chattopadhyay, R., Dyukova, E., Singh, N. K., Ohba, M., Mobley, J. A., & Rao, G. N. (2014). Vascular endothelial tight junctions and barrier function are disrupted by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid partly via protein kinase C epsilon-mediated zona occludens-1 phosphorylation at threonine 770/772. *J Biol Chem*, 289(6), 3148-3163. doi:10.1074/jbc.M113.528190
  21. Chattopadhyay, R., Tinnikov, A., Dyukova, E., Singh, N. K., Kotla, S., Mobley, J. A., & Rao, G. N. (2015). 12/15-Lipoxygenase-dependent ROS production is required for diet-induced endothelial barrier dysfunction. *J Lipid Res*, 56(3), 562-577. doi:10.1194/jlr.M055566
  22. Chen, E. P., & Smyth, E. M. (2011). COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 96(1-4), 14-20. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.08.005
  23. Chiu, C. Y., Gomolka, B., Dierkes, C., Huang, N. R., Schroeder, M., Purschke, M., Weylandt, K. H. (2012). Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis. *Inflamm Res*, 61(9), 967-976. doi:10.1007/s00011-012-0489-8
  24. Chiu, J., & Dawes, I. W. (2012). Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol*, 22(11), 592-601. doi:10.1016/j.tcb.2012.08.002
  25. Clayburgh, D. R., Shen, L., & Turner, J. R. (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest*, 84(3), 282-291. doi:10.1038/labinvest.3700050

26. Cobanoglu, B., Toskala, E., Ural, A., & Cingi, C. (2013). Role of leukotriene antagonists and antihistamines in the treatment of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 13(2), 203-208. doi:10.1007/s11882-013-0341-4
27. Conrad, D. J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E., & Sigal, E. (1992). Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1), 217-221.
28. Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 69(2), 238-249.
29. Dahlen, S. E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Hammarstrom, S., Lindgren, J. A., & Samuelsson, B. (1981). Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6), 3887-3891.
30. Dahlen, S. E., Hedqvist, P., Hammarstrom, S., & Samuelsson, B. (1980). Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*, 288(5790), 484-486.
31. Dieleman, L. A., Palmen, M. J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A. S., Meuwissen, S. G., & Van Rees, E. P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*, 114(3), 385-391.
32. Dinarello, C. A., & Wolff, S. M. (1993). The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*, 328(2), 106-113. doi:10.1056/NEJM199301143280207
33. El Kebir, D., & Filep, J. G. (2013). Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins. *Front Immunol*, 4, 60. doi:10.3389/fimmu.2013.00060
34. Ereso, A. Q., Cureton, E. L., Cripps, M. W., Sadjadi, J., Dua, M. M., Curran, B., & Victorino, G. P. (2009). Lipoxin a(4) attenuates microvascular fluid leak during inflammation. *J Surg Res*, 156(2), 183-188. doi:10.1016/j.jss.2009.01.009
35. Faulkner, J., Pye, C., Al-Shabrawey, M., & Elmarakby, A. A. (2015). Inhibition of 12/15-Lipoxygenase Reduces Renal Inflammation and Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Diabetes Metab*, 6(6). doi:10.4172/2155-6156.1000555
36. Feuerbach, S., & Schölmerich, J. (2000). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und colitis ulcerosa. *Der Radiologe*, 40(3), 324-338.
37. Fierro, I. M., Colgan, S. P., Bernasconi, G., Petasis, N. A., Clish, C. B., Arita, M., & Serhan, C. N. (2003). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *J Immunol*, 170(5), 2688-2694.
38. Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation.

---

*Periodontol* 2000, 63(1), 149-164. doi:10.1111/prd.12034

39. Funk, C. D., Chen, X. S., Johnson, E. N., & Zhao, L. (2002). Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 303-312.
40. Funk, C. D., Furci, L., & FitzGerald, G. A. (1990). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythrocyte cell 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15), 5638-5642.
41. Funk, C. D., Hoshiko, S., Matsumoto, T., Radmark, O., & Samuelsson, B. (1989). Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8), 2587-2591.
42. Gilani, S., Howarth, G. S., Kitessa, S. M., Tran, C. D., Forder, R. E., & Hughes, R. J. (2016). New biomarkers for increased intestinal permeability induced by dextran sodium sulphate and fasting in chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. doi:10.1111/jpn.12596
43. Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007
44. Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Seguin, M. C., Klotz, F. W., Slayter, M., Nacy, C. A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett*, 43(1-2), 87-94.
45. Green-Mitchell, S. M., Tersey, S. A., Cole, B. K., Ma, K., Kuhn, N. S., Cunningham, T. D., Morris, M. A. (2013). Deletion of 12/15-lipoxygenase alters macrophage and islet function in NOD-Alox15(null) mice, leading to protection against type 1 diabetes development. *PLoS One*, 8(2), e56763. doi:10.1371/journal.pone.0056763
46. Gregus, A. M., Dumlao, D. S., Wei, S. C., Norris, P. C., Catella, L. C., Meyerstein, F. G., Dennis, E. A. (2013). Systematic analysis of rat 12/15-lipoxygenase enzymes reveals critical role for spinal eLOX3 hepoxilin synthase activity in inflammatory hyperalgesia. *FASEB J*, 27(5), 1939-1949. doi:10.1096/fj.12-217414
47. Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I. R., Dunn, M., & Laniado Schwartzman, M. (2005). A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J Biol Chem*, 280(15), 15267-15278. doi:10.1074/jbc.M410638200
48. Groschwitz, K. R., Wu, D., Osterfeld, H., Ahrens, R., & Hogan, S. P. (2013). Chymase-mediated intestinal epithelial permeability is regulated by a protease-activating receptor/matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304(5), G479-489. doi:10.1152/ajpgi.00186.2012
49. Haeggstrom, J. Z., & Funk, C. D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev*, 111(10), 5866-5898. doi:10.1021/cr200246d
50. Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune

- response. *Oncogene*, 25(51), 6758-6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943
51. Hemler, M., & Lands, W. E. (1976). Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem*, 251(18), 5575-5579.
52. Hering, N. A., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol*, 590(Pt 5), 1035-1044. doi:10.1113/jphysiol.2011.224568
53. Herold, G. e. a. (2014). *Innere Medizin* (Auflage 2014) Köln: Herold; 475-482, 488-493
54. Hicks, A., Monkarsh, S. P., Hoffman, A. F., & Goodnow, R., Jr. (2007). Leukotriene B4 receptor antagonists as therapeutics for inflammatory disease: preclinical and clinical developments. *Expert Opin Investig Drugs*, 16(12), 1909-1920. doi:10.1517/13543784.16.12.1909
55. Higuchi, S., Wu, R., Zhou, M., Marini, C. P., Ravikumar, T. S., & Wang, P. (2008). Gut hyperpermeability after ischemia and reperfusion: attenuation with adrenomedullin and its binding protein treatment. *Int J Clin Exp Pathol*, 1(5), 409-418.
56. Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12, 86. doi:10.1186/1476-4598-12-86
57. Horrocks, L. A., & Yeo, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res*, 40(3), 211-225. doi:10.1006/phrs.1999.0495
58. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6(4), 279-284. doi:10.1038/sj.gene.6364190
59. Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V. B., Kuhn, H., & Walther, M. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys*, 503(2), 161-174. doi:10.1016/j.abb.2010.08.016
60. Ivanov, I., Kuhn, H., & Heydeck, D. (2015). Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*, 573(1), 1-32. doi:10.1016/j.gene.2015.07.073
61. Iwaya, H., Maeta, K., Hara, H., & Ishizuka, S. (2012). Mucosal permeability is an intrinsic factor in susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237(4), 451-460. doi:10.1258/ebm.2011.011269
62. Jisaka, M., Kim, R. B., Boeglin, W. E., & Brash, A. R. (2000). Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *J Biol Chem*, 275(2), 1287-1293.
63. Jisaka, M., Kim, R. B., Boeglin, W. E., Nanney, L. B., & Brash, A. R. (1997). Molecular cloning and functional expression of a phorbol ester-inducible 8S-lipoxygenase from mouse skin. *J Biol Chem*, 272(39), 24410-24416.

64. Jobin, C., & Sartor, R. B. (2000). The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(3), C451-462.
65. Kaliner, M., Shelhamer, J. H., Borson, B., Nadel, J., Patow, C., & Marom, Z. (1986). Human respiratory mucus. *Am Rev Respir Dis*, 134(3), 612-621. doi:10.1164/arrd.1986.134.3.612
66. Karow, T. (2015). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis [Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2014; Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften; umfassende Dosierungen] (23. Aufl.). Pulheim: Selbstverl. des Verf., 177-186
67. Kazi, H. A., & Qian, Z. (2009). Crocetin reduces TNBS-induced experimental colitis in mice by downregulation of NFkB. *Saudi J Gastroenterol*, 15(3), 181-187. doi:10.4103/1319-3767.54750
68. Kinzig, A., Heidt, M., Furstenberger, G., Marks, F., & Krieg, P. (1999). cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of a novel murine epidermis-type lipooxygenase. *Genomics*, 58(2), 158-164. doi:10.1006/geno.1999.5816
69. Kiss, M., Kiss, A. A., Radics, M., Popovics, N., Hermes, E., Csiszar, K., & Mink, M. (2016). Drosophila type IV collagen mutation associates with immune system activation and intestinal dysfunction. *Matrix Biol*, 49, 120-131. doi:10.1016/j.matbio.2015.09.002
70. Kitajima, S., Takuma, S., & Morimoto, M. (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim*, 48(3), 137-143.
71. Krieg, P., & Furstenberger, G. (2014). The role of lipooxygenases in epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), 390-400. doi:10.1016/j.bbali.2013.08.005
72. Kronke, G., Katzenbeisser, J., Uderhardt, S., Zaiss, M. M., Scholtyssek, C., Schabbauer, G., Schett, G. (2009). 12/15-lipooxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol*, 183(5), 3383-3389. doi:10.4049/jimmunol.0900327
73. Kroschwald, S., Chiu, C. Y., Heydeck, D., Rohwer, N., Gehring, T., Seifert, U., Lux, A., Rothe, M., Weylandt, K.H., Kuhn, H. Female mice carrying a defective *Alox15* gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (2018) 866-880.
74. Kuhn, H. (1996). Biosynthesis, metabolism and biological importance of the primary 15-lipooxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog Lipid Res*, 35(3), 203-226.
75. Kuhn, H., Banthiya, S., & van Leyen, K. (2015). Mammalian lipooxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta*, 1851(4), 308-330.

doi:10.1016/j.bbaliip.2014.10.002

76. Kuhn, H., Barnett, J., Grunberger, D., Baecker, P., Chow, J., Nguyen, B., Sigal, E. (1993). Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 1169(1), 80-89.
77. Langkilde, A., Olsen, L. C., Saetrom, P., Drablos, F., Besenbacher, S., Raaby, L., Iversen, L. (2016). Pathway Analysis of Skin from Psoriasis Patients after Adalimumab Treatment Reveals New Early Events in the Anti-Inflammatory Mechanism of Anti-TNF-alpha. *PLoS One*, 11(12), e0167437. doi:10.1371/journal.pone.0167437
78. Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbin, B. A., Parkos, C. A. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*, 204(13), 3067-3076. doi:10.1084/jem.20071416
79. Le Bel, M., Brunet, A., & Gosselin, J. (2014). Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. *J Innate Immun*, 6(2), 159-168. doi:10.1159/000353694
80. Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J. P., Rousset, P., Chene, G., Cenac, N. (2013). LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 932, 123-133. doi:10.1016/j.jchromb.2013.06.014
81. Li, G., Ren, J., Hu, Q., Deng, Y., Chen, G., Guo, K., Li, J. (2016). Oral pirfenidone protects against fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and TGF-beta signaling in a murine colitis model. *Biochem Pharmacol*, 117, 57-67. doi:10.1016/j.bcp.2016.08.002
82. Li, L., Liu, Z., Yang, X., Yan, H., Bao, S., & Fei, J. (2013). Bioluminescence imaging for IL-1beta expression in experimental colitis. *J Inflamm (Lond)*, 10(1), 16. doi:10.1186/1476-9255-10-16
83. Li, N., Liu, B. W., Ren, W. Z., Liu, J. X., Li, S. N., Fu, S. P., Wang, W. (2016). GLP-2 Attenuates LPS-Induced Inflammation in BV-2 Cells by Inhibiting ERK1/2, JNK1/2 and NF-kappaB Signaling Pathways. *Int J Mol Sci*, 17(2), 190. doi:10.3390/ijms17020190
84. Limor, R., Sharon, O., Knoll, E., Many, A., Weisinger, G., & Stern, N. (2008). Lipoxygenase-derived metabolites are regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens*, 21(2), 219-223. doi:10.1038/ajh.2007.39
85. Liu, W., Guo, W., Hang, N., Yang, Y., Wu, X., Shen, Y., Xu, Q. (2016). MALT1 inhibitors prevent the development of DSS-induced experimental colitis in mice via inhibiting NF-kappaB and NLRP3 inflammasome activation. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.8867
86. Lomize, A., Lomize, M., & Pogozheva, I. (2005-2013). Orientation of proteins in

- membranes. Retrieved 12.11.2015  
<http://opm.phar.umich.edu/protein.php?search=2p0m>
87. Lüllmann-Rauch, R. (2003). Histologie: Verstehen - lernen - nachschlagen; 10 Tabellen ( 1. Aufl.). Stuttgart [u.a.]: Thieme; 28-36.
88. Mancini, A. D., & Di Battista, J. A. (2011). The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammostasis. *Inflamm Res*, 60(12), 1083-1092. doi:10.1007/s00011-011-0385-7
89. Mangino, M. J., Brounts, L., Harms, B., & Heise, C. (2006). Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 79(1-2), 84-92. doi:10.1016/j.prostaglandins.2005.10.004
90. Mao, F., Wang, M., Wang, J., & Xu, W. R. (2015). The role of 15-LOX-1 in colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Inflamm Res*, 64(9), 661-669. doi:10.1007/s00011-015-0852-7
91. Mao, F., Wu, Y., Tang, X., Wang, J., Pan, Z., Zhang, P., Xu, W. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate inflammatory bowel disease through the regulation of 15-LOX-1 in macrophages. *Biotechnol Lett*, 39(6), 929-938. doi:10.1007/s10529-017-2315-4
92. Marcus, R., & Watt, J. (1969). Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals. *Lancet*, 2(7618), 489-490.
93. Martin, H. (2010). Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res*, 690(1-2), 57-63.
94. Massague, J. (2012). TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(10), 616-630. doi:10.1038/nrm3434
95. Medicherla, K., Sahu, B. D., Kuncha, M., Kumar, J. M., Sudhakar, G., & Sistla, R. (2015). Oral administration of geraniol ameliorates acute experimental murine colitis by inhibiting pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB signaling. *Food Funct*, 6(9), 2984-2995. doi:10.1039/c5fo00405e
96. Melgar, S., Bjursell, M., Gerdin, A. K., Svensson, L., Michaelsson, E., & Bohlooly, Y. M. (2007). Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(1), G165-172. doi:10.1152/ajpgi.00152.2006
97. Meruvu, S., Walther, M., Ivanov, I., Hammarstrom, S., Furstenberger, G., Krieg, P., Kuhn, H. (2005). Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12R)-lipoxygenase: targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 280(44), 36633-36641. doi:10.1074/jbc.M508260200
98. Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 8(3), 227-241. doi:10.1002/wsbm.1331
99. Munger, K. A., Montero, A., Fukunaga, M., Uda, S., Yura, T., Imai, E., Badr, K. F.

- (1999). Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13375-13380.
100. Nitta, M., Hirata, I., Toshina, K., Murano, M., Maemura, K., Hamamoto, N., Katsu, K. (2002). Expression of the EP4 prostaglandin E2 receptor subtype with rat dextran sodium sulphate colitis: colitis suppression by a selective agonist, ONO-AE1-329. *Scand J Immunol*, 56(1), 66-75.
101. Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1(3), 1559-1582. doi:10.1038/nprot.2006.236
102. Nowak, J., Weylandt, K. H., Habbel, P., Wang, J., Dignass, A., Glickman, J. N., & Kang, J. X. (2007). Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis*, 28(9), 1991-1995. doi:10.1093/carcin/bgm166
103. Ohira, T., Arita, M., Omori, K., Recchiuti, A., Van Dyke, T. E., & Serhan, C. N. (2010). Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *J Biol Chem*, 285(5), 3451-3461. doi:10.1074/jbc.M109.044131
104. Okayama, M., Hayashi, S., Aoi, Y., Nishio, H., Kato, S., & Takeuchi, K. (2007). Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats. *Dig Dis Sci*, 52(9), 2095-2103. doi:10.1007/s10620-006-9597-z
105. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.
106. Ordas, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet*, 380(9853), 1606-1619. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0
107. Owczarek, D., Rodacki, T., Domagala-Rodacka, R., Cibor, D., & Mach, T. (2016). Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 22(3), 895-905. doi:10.3748/wjg.v22.i3.895
108. Peatfield, A. C., Piper, P. J., & Richardson, P. S. (1982). The effect of leukotriene C4 on mucin release into the cat trachea in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*, 77(3), 391-393.
109. Pekarova, M., Kuhn, H., Bezakova, L., Ufer, C., & Heydeck, D. (2015). Mutagenesis of triad determinants of rat Alox15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation. *Arch Biochem Biophys*, 571, 50-57. doi:10.1016/j.abb.2015.02.029
110. Perse, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 718617. doi:10.1155/2012/718617
111. Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G.,

- Rolli-Derkinderen, M. (2016). Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *150*(1), 168-180. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.038
112. Poeckel, D., & Funk, C. D. (2010). The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, *86*(2), 243-253. doi:10.1093/cvr/cvq016
113. Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., & Koltun, W. A. (2007). Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*, *140*(1), 12-19. doi:10.1016/j.jss.2006.07.050
114. Poritz, L. S., Harris, L. R., 3rd, Kelly, A. A., & Koltun, W. A. (2011). Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig Dis Sci*, *56*(10), 2802-2809. doi:10.1007/s10620-011-1688-9
115. Püschel, G., Kühn, H., Kietzmann, T., Höhne, W., Christ, B., Doenecke, D., Koolman, J. (2011). *Taschenlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG.
116. Radmark, O., & Samuelsson, B. (2010). Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, *396*(1), 105-110. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.173
117. Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., & Samuelsson, B. (2007). 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*, *32*(7), 332-341. doi:10.1016/j.tibs.2007.06.002
118. Reuter, B. K., Asfaha, S., Buret, A., Sharkey, K. A., & Wallace, J. L. (1996). Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, *98*(9), 2076-2085. doi:10.1172/JC1119013
119. Riordan, A. M., Ruxton, C. H., & Hunter, J. O. (1998). A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr*, *52*(4), 229-238.
120. Rivest, S., Lacroix, S., Vallieres, L., Nadeau, S., Zhang, J., & Laflamme, N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, *223*(1), 22-38.
121. Roebuck, K. A., Jacobs, J. J., & Glant, T. T. (1999). New horizons in orthopaedic research: elucidation of cellular signal transduction pathways. *J Bone Joint Surg Am*, *81*(5), 599-602.
122. Romano, M. (2010). Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *ScientificWorldJournal*, *10*, 1048-1064. doi:10.1100/tsw.2010.113
123. Sala, A., Folco, G., & Murphy, R. C. (2010). Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Rep*, *62*(3), 503-510.
124. Saleh, M., & Elson, C. O. (2011). Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*, *34*(3), 293-302.

doi:10.1016/j.immuni.2011.03.008

125. Savari, S., Vinnakota, K., Zhang, Y., & Sjolander, A. (2014). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(4), 968-977. doi:10.3748/wjg.v20.i4.968
126. Scharl, M., Bruckner, R. S., & Rogler, G. (2016). The two sides of the coin: Similarities and differences in the pathomechanisms of fistulas and stricture formations in irritable bowel disease. *United European Gastroenterol J*, 4(4), 506-514. doi:10.1177/2050640616635957
127. Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C., & Rapoport, S. M. (1975). A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett*, 60(1), 149-152.
128. Schnabel, F. (2010). *Charakterisierung des Modells der Dextransulfat induzierten Colitis der BALB/c-Maus*. (Dr.med.), Ludwig-Maximilians-Universität München.
129. Sendobry, S. M., Cornicelli, J. A., Welch, K., Bocan, T., Tait, B., Trivedi, B. K., Daugherty, A. (1997). Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol*, 120(7), 1199-1206. doi:10.1038/sj.bjp.0701007
130. Serhan, C. N., & Petasis, N. A. (2011). Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev*, 111(10), 5922-5943. doi:10.1021/cr100396c
131. Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, 6(12), 1191-1197. doi:10.1038/ni1276
132. Shureiqi, I., Chen, D., Day, R. S., Zuo, X., Hochman, F. L., Ross, W. A., Lippman, S. M. (2010). Profiling lipoxygenase metabolism in specific steps of colorectal tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(7), 829-838. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0110
133. Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122(3), 787-795. doi:10.1172/JCI59643
134. Singh, R. K., Tandon, R., Dastidar, S. G., & Ray, A. (2013). A review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma. *J Asthma*, 50(9), 922-931. doi:10.3109/02770903.2013.823447
135. Sklyarov, A. Y., Panasyuk, N. B., & Fomenko, I. S. (2011). Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol*, 62(1), 65-73.
136. Smith, M. J. (1981). Biological activities of leukotriene B<sub>4</sub>. *Agents Actions*, 11(6-7), 571-572.
137. Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., Kirk, S., Gardiner, K. (2010). The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative Clinical Pathology*, 19(3), 235-239. doi:10.1007/s00580-

010-0979-4

138. Soufli, I., Toumi, R., Raza, H., & Touil-Boukoffa, C. (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 7(3), 353-360. doi:10.4292/wjgpt.v7.i3.353
139. Sun, D., & Funk, C. D. (1996). Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 271(39), 24055-24062.
140. Suzuki, R., Katakura, K., Fujiwara, T., Gunji, N., Watanabe, H., & Ohira, H. (2016). Imiquimod-induced CCR9 Ameliorates murine TNBS Colitis. *Fukushima J Med Sci*, 62(2), 90-100. doi:10.5387/fms.2015-28
141. Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*, 70(4), 631-659. doi:10.1007/s00018-012-1070-x
142. Taylor, B. S., Kim, Y. M., Wang, Q., Shapiro, R. A., Billiar, T. R., & Geller, D. A. (1997). Nitric oxide down-regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg*, 132(11), 1177-1183.
143. te Velde, A. A., de Kort, F., Sterrenburg, E., Pronk, I., ten Kate, F. J., Hommes, D. W., & van Deventer, S. J. (2007). Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13(3), 325-330. doi:10.1002/ibd.20079
144. Tian, R., Zuo, X., Jaoude, J., Mao, F., Colby, J., & Shureiqi, I. (2017). ALOX15 as a Suppressor of Inflammation and Cancer: Lost in the Link. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. doi:10.1016/j.prostaglandins.2017.01.002
145. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 3(7), research0034.1-research0034.11.
146. Virmani, J., Johnson, E. N., Klein-Szanto, A. J., & Funk, C. D. (2001). Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 162(2), 161-165.
147. Wang, C. C., Borchert, A., Ugun-Klusek, A., Tang, L. Y., Lui, W. T., Chu, C. Y., Ufer, C. (2011). Monoamine oxidase a expression is vital for embryonic brain development by modulating developmental apoptosis. *J Biol Chem*, 286(32), 28322-28330. doi:10.1074/jbc.M111.241422
148. Wasilewicz, M. P., Kolodziej, B., Bojulko, T., Kaczmarczyk, M., Sulzyc-Bielicka, V., Bielicki, D., & Ciepiela, K. (2010). Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int J Colorectal Dis*, 25(9), 1079-1085. doi:10.1007/s00384-010-0980-z
149. Watson, A. J., & Hughes, K. R. (2012). TNF-alpha-induced intestinal epithelial cell

- shedding: implications for intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*, 1258, 1-8. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06523.x
150. Wehkamp, J., Gotz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., & Stange, E. F. (2016). Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch Arztebl Int*, 113(5), 72-82. doi:10.3238/arztebl.2016.0072
151. Wen, Y., Gu, J., Chakrabarti, S. K., Aylor, K., Marshall, J., Takahashi, Y., Nadler, J. L. (2007). The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Endocrinology*, 148(3), 1313-1322. doi:10.1210/en.2006-0665
152. Wilcz-Villega, E. M., McClean, S., & O'Sullivan, M. A. (2013). Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*, 108(7), 1140-1151. doi:10.1038/ajg.2013.92
153. Williams, C. S., Mann, M., & DuBois, R. N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908-7916. doi:10.1038/sj.onc.1203286
154. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., & Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2(3), 541-546. doi:10.1038/nprot.2007.41
155. Woo, J. K., Choi, S., Kang, J. H., Kim, D. E., Hurh, B. S., Jeon, J. E., Oh, S. H. (2016). Fermented barley and soybean (BS) mixture enhances intestinal barrier function in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mouse model. *BMC Complement Altern Med*, 16(1), 498. doi:10.1186/s12906-016-1479-0
156. Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. doi:10.1038/nature06005
157. Yin, J., Wu, M., Duan, J., Liu, G., Cui, Z., Zheng, J., Yulong, Y. (2015). Pyrrolidine Dithiocarbamate Inhibits NF-KappaB Activation and Upregulates the Expression of Gpx1, Gpx4, Occludin, and ZO-1 in DSS-Induced Colitis. *Appl Biochem Biotechnol*, 177(8), 1716-1728. doi:10.1007/s12010-015-1848-z
158. Yokomizo, T. (2011). Leukotriene B4 receptors: novel roles in immunological regulations. *Adv Enzyme Regul*, 51(1), 59-64. doi:10.1016/j.advenzreg.2010.08.002
159. Yoo, S., Lim, J. Y., & Hwang, S. W. (2013). Resolvins: Endogenously-Generated Potent Painkilling Substances and their Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol*, 11(6), 664-676. doi:10.2174/1570159X11311060009
160. Yoshinaga, M., Buchanan, F. G., & DuBois, R. N. (2004). 15-LOX-1 inhibits p21 (Cip/WAF 1) expression by enhancing MEK-ERK 1/2 signaling in colon carcinoma cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 73(1-2), 111-122.
161. Yuan, H., Chen, C. Y., Chai, G. H., Du, Y. Z., & Hu, F. Q. (2013). Improved transport

- and absorption through gastrointestinal tract by PEGylated solid lipid nanoparticles. *Mol Pharm*, 10(5), 1865-1873. doi:10.1021/mp300649z
162. Zhao, H., Zhang, H., Wu, H., Li, H., Liu, L., Guo, J., Zhang, X. (2012). Protective role of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol*, 12, 57. doi:10.1186/1471-230X-12-57
163. Zhao, J., Shi, P., Sun, Y., Sun, J., Dong, J. N., Wang, H. G., Zhu, W. M. (2015). DHA protects against experimental colitis in IL-10-deficient mice associated with the modulation of intestinal epithelial barrier function. *Br J Nutr*, 114(2), 181-188. doi:10.1017/S0007114515001294
164. Zhao, L., & Funk, C. D. (2004). Lipoxygenase pathways in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 14(5), 191-195. doi:10.1016/j.tcm.2004.04.003
165. Zhou, G. X., Ding, X. L., Wu, S. B., Zhang, H. F., Cao, W., Qu, L. S., & Zhang, H. (2015). Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep*, 33(2), 661-668. doi:10.3892/or.2014.3650
166. Zou, Y., Lin, J., Li, W., Wu, Z., He, Z., Huang, G., Chi, H. (2016). Huangqin-tang ameliorates dextran sodium sulphate-induced colitis by regulating intestinal epithelial cell homeostasis, inflammation and immune response. *Sci Rep*, 6, 39299. doi:10.1038/srep39299
167. Krebsentstehung (2011), <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsentstehung.php#entzuendung> (Stand: 2016)

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuerst Frau Prof. Dr. Ulrike Seifert und Herrn Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn, nicht nur für die Überlassung und Betreuung des Themas, sondern auch für ihre Geduld, Ideen und kritischen Anmerkungen.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Dr. med. Karsten-Henrich Weylandt, durch dessen großes Interesse an der Lipoxygenaseforschung diese Kooperation erst entstanden ist und ausgebaut wurde.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen (AG Seifert, AG Kühn und AG Weylandt), die für ein gutes Arbeitsklima gesorgt und so das Entstehen meiner Dissertation positiv beeinflusst haben, insbesondere:

Frau Dr. rer. nat. Dagmar Heydeck aus der AG Kühn, die immer Zeit für meine Fragen hatte, mir grundlegende Sachverhalte und Methoden erklärt und sehr gut betreut hat.

PharmD PhD Mária Pekárová und Dr. med. Simone Hannah Brütsch aus der AG Kühn, die wunderbare Laborpartnerinnen waren und mit denen ich mich immer austauschen konnte.

Frau Cheng-Ying Chiu aus der AG Weylandt, die mir insbesondere bei den tierexperimentellen Versuchen zur Seite stand und mich durch ihren Enthusiasmus motiviert und unterstützt hat.

Frau Dr. rer. nat. Xenia Gorny aus der AG Seifert für ihre Hilfe bei den Western Blots und ihre persönliche Unterstützung in Magdeburg.

Ines Eichhorn und Nadine Rohwer aus der AG Weylandt für die histologische Aufarbeitung der Proben.

Dipl.-Math. Anke Lux aus dem Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg für die statistische Auswertung und ihre Geduld angesichts meiner Datenmengen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Dres. Alexandra und Peter Kroschwald, die vor ca. 30 Jahren am Beginn der Lipoxygenaseforschung in der AG Kühn mit ihren Forschungen beteiligt waren.

Meiner lieben Schwester Dr. des. Patricia Strohmaier möchte ich auch an dieser Stelle besonder danken, die mir trotz ihres weit entfernten Fachgebietes stets mit guten

---

Ratschlägen und motivierenden Nachrichten wie nur sie es kann zur Seite stand.

Zuletzt danke ich meinem Mann Alexander Kroschwald und allen Freunden, KommilitonInnen und Bekannten (Claudia Jözwiak, Judith Hohn, Julia Berels, Dr. med. Martin Hendrischk, Maria-Rosa Andrés Alonso), die ein offenes Ohr, aufbauende Worte, sehr viel Verständnis und Geduld für mich hatten.

---

## Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Systemische Inaktivierung des murinen 12/15-Lipoxygenase-Gens (Alox15) schützt weibliche Mäuse vor einer durch Dextran-Natriumsulfat induzierten Kolitis**  
im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie in Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Charité Berlin mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. Ulrike Seifert und Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Endy'.

Berlin, den 27.03.2019