

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I  
(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,  
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie)

**Der Einfluss von Teduglutid auf die epitheliale Homöostase  
im Dün- und Dickdarm**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Bernhard, Simon Friedrich**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. N. P. Malek  
2. Berichterstatter: Professor Dr. J.-S. Frick

Tag der Disputation: 10.01.2023

## **Widmung**

**Meiner lieben Familie:**

**Dr. med. Alfons Bernhard**

**Renate Bernhard**

**Valerie Bernhard**

**Dr. med. Lukas Bernhard**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der humane Gastrointestinaltrakt.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Der Dünndarm .....	3
1.1.2 Der Dickdarm.....	4
1.1.3 Die Homöostase des Intestinaltrakts .....	5
1.1.4 Das spezialisierte Darmepithel .....	6
<b>1.2 Das multimodale Abwehrsystem des Gastrointestinaltrakts.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Die mechanische Barriere aus Mukus und Epithel.....	7
1.2.2 Die angeborene, biologische Immunantwort .....	8
1.2.3 Defensine in Mensch und Maus .....	10
1.2.4 Die Erkennung von Bakterien durch den Gastrointestinaltrakt.....	10
<b>1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen als Darmbarrierestörung.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Morbus Crohn .....	12
1.3.2 Colitis ulcerosa .....	13
<b>1.4 Glucagon-like peptide 2.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Der Glucagon-like peptide 2 Rezeptor (GLP-2R).....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Das GLP-2 Analogon Teduglutid .....	18
1.5.2 Die Sucrase-Isomaltase.....	19
<b>1.6 Intestinale Organoide als 3D-Modell.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>21</b>
<b>2 Material und Methodik .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Kits, Enzyme und Antikörper .....	23
2.1.4 Medien und Puffer .....	26
2.1.5 Primersequenzen und Plasmide.....	29
2.1.6 Zell-Linien, Mausgewebeproben.....	31
2.1.7 Patientenkollektive und Patientenprobenmaterial.....	33
2.1.8 Software.....	36
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>36</b>

2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	36
2.2.2	Zellbiologische Methoden .....	45
2.2.3	Proteinmethoden .....	54
2.2.4	Statistische Methoden .....	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur Lokalisation und Quantifizierung von Enzym-, Rezeptor- und Hormongenen im gesunden und erkrankten humanen Darmtrakt .....</b>	<b>57</b>
3.1.1	Signifikante Unterschiede der Expression von GLP-2R, hGCG und Sucrase-Isomaltase im Dün- und Dickdarm gesunder Probanden.....	58
3.1.2	Expression von GLP-2R, hGCG und Sucrase-Isomaltase im Gewebe von Morbus Crohn Patienten .....	63
3.1.3	Expression von GLP-2R, hGCG und Sucrase-Isomaltase in Patienten mit Colitis ulcerosa .....	70
<b>3.2</b>	<b>Der Einfluss von Teduglutid auf die Viabilität von Tumorzellen.....</b>	<b>72</b>
3.2.1	Quantitativer Nachweis des GLP-2R in Tumorzellen .....	73
3.2.2	Erhöhte Zellviabilität in Tumorzellen nach 72h Inkubation mit Teduglutid.....	73
<b>3.3</b>	<b>Der Einfluss der Teduglutid-Behandlung auf die epitheliale Homöostase bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom.....</b>	<b>79</b>
3.3.1	Teduglutid nimmt Einfluss auf die Expression seines Zielrezeptors GLP-2R und weitere intestinaler Zell- und Transkriptionsfaktoren im GI-Trakt bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom .....	79
3.3.2	Zytokin-, intestinale Stammzell- und Villinreduktion aber tendenzieller Proliferationsanstieg im GI-Trakt bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom unter Teduglutidbehandlung.....	84
<b>3.4</b>	<b>Die Auswirkungen der Teduglutidbehandlung auf die Genexpression in Mausorganoiden.....</b>	<b>88</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression und Lokalisation des GLP-2R, des hGCGs und der Sucrase-Isomaltase im gesunden und erkrankten GI-Trakt.....</b>	<b>93</b>
4.1.1	Der GLP-2 Rezeptor: Lokalisation, Quantifizierung und Expression im gesunden und erkrankten Gewebe .....	93
4.1.2	Das humane Proglucagon im gesunden und erkrankten Magen-Darm-Trakt	96
4.1.3	Die Expression der Sucrase Isomaltase in Patienten mit CED .....	98
<b>4.2</b>	<b>Tumorzellen, Kurzdarmpatienten und Mausorganotide - Welchen Einfluss nimmt Teduglutid auf die epitheliale Homöostase? .....</b>	<b>99</b>
4.2.1	Auswirkungen von Teduglutid auf die Karzinogenese.....	99

4.2.2	Teduglutid in Patienten mit Kurzdarmsyndrom.....	101
4.2.3	Mausorganoide nach Stimulation mit Teduglutid.....	105
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>129</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AMP</b>	Ampicillin
<b>AMPs</b>	Antimikrobielle Peptide
<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>cDNA</b>	complementary desoxyribonucleic acid
<b>CED</b>	chronisch entzündliche Darmerkrankung
<b>CHMM</b>	complete human minigut medium
<b>CP</b>	crossing point
<b>CU</b>	Colitis ulcerosa
<b>DMEM</b>	Dulbecco´s modified eagle medium
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>dNTP</b>	deoxyribonucleotide triphosphate
<b>EB-Buffer</b>	elution buffer
<b>EDTA</b>	ethylenediamine tetraacetic acid
<b>EGF</b>	epidermal growth factor
<b>eNOS</b>	endothelial nitric oxide synthase
<b>ErbB</b>	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit Homologie zum EGF-Rezeptor)
<b>ERK 1/2</b>	extracellular-signal regulated kinase 1/2
<b>FCS</b>	fetal calw serum
<b>DPP4</b>	Dipeptidyltransferase 4
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like peptide 1
<b>GLP-2</b>	Glucagon-like peptide 2
<b>GLP-2R</b>	Glucagon-like peptide 2 Receptor
<b>GI-Trakt</b>	Gastrointestinaltrakt
<b>GRPP</b>	Glicentin-related pancreatic polypeptide
<b>h</b>	hour
<b>HBD</b>	humane $\beta$ -Defensine
<b>HD</b>	humane $\alpha$ -Defensine
<b>HeLa</b>	Hernrietta Lacks Cervixcarinom Zelllinie
<b>hGCG</b>	humanes Proglucagon (Präkursorprotein von GLP-2)
<b>hGCG (Gen)</b>	humanes Proglucagon Gen
<b>HMM</b>	human minigut medium



<b>HNP 1-4</b>	humane neutrophile Peptide 1-4
<b>IBD</b>	inflammatory bowel disease
<b>IGF1/2</b>	Insulin-like growth factor 1/2
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IP-1/ 2</b>	intervening Peptide 1/ 2
<b>Kbp</b>	Kilobasenpaar
<b>KR</b>	Kontrollreagenz
<b>KGF</b>	keratinocyte growth factor
<b>Lgr</b>	leucine-rich-repeat-containing G-Protein coupled receptor
<b>Lsg</b>	Lösung
<b>MC</b>	Morbus Crohn
<b>m-crypt-1</b>	Maus-cryptidine-1
<b>m-crypt-4</b>	Maus-cryptidine-4
<b>mGLP-2</b>	murines Glucagon-like peptide 2
<b>min</b>	Minuten
<b>MPGF</b>	Major Proglucagon Fragment
<b>mTOR</b>	mechanistic target of rapamycin
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NEAS</b>	Nicht essenzielle Aminosäuren
<b>NLRs</b>	NOD-like Rezeptoren
<b>NODs</b>	nucleotid oligodimerisation domain
<b>ns</b>	nicht signifikant
<b>PAMPs</b>	pathogen-associated molecular patterns
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	polymerase-chain-reaction
<b>Pen/ Strep</b>	Penicillin/ Streptomycin
<b>pH</b>	Potentia hydrogenii
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>qPCR</b>	quantitative real-time PCR
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RSPO</b>	R-Spondin

<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>sec.</b>	second
<b>SD</b>	standard deviation
<b>SEM</b>	standard error auf the mean
<b>SI</b>	Sucrase-Isomaltase
<b>SOC</b>	super optimal broth medium with catabolite repression
<b>SRB</b>	Sulforhodamin B
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	TRIS-buffered-saline
<b>TCA</b>	trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
<b>TLRs</b>	Toll-like Rezeptoren
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
<b>TRIS</b>	Trishydroxymethylaminomethane
<b>TSB</b>	tryptic soy broth
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>V</b>	Volt
<b>VIP</b>	vasoaktives intestinales Polypeptid
<b>vs.</b>	versus
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<b>Y-27632</b>	rho-associated kinase inhibitor
<b>ZK</b>	Zellkultur

# 1 Einleitung

## 1.1 Der humane Gastrointestinaltrakt

Anatomisch gesehen setzt sich der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) aus Mundhöhle, Pharynx, Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm zusammen. Funktionell lässt er sich in drei Abschnitte gliedern:

Der obere GI-Trakt reicht von der Mundhöhle über den Ösophagus und Magen bis zum Duodenum (Zwölffingerdarm) und dient vor allem dem Transport, der Zerkleinerung sowie der enzymatischen Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen.

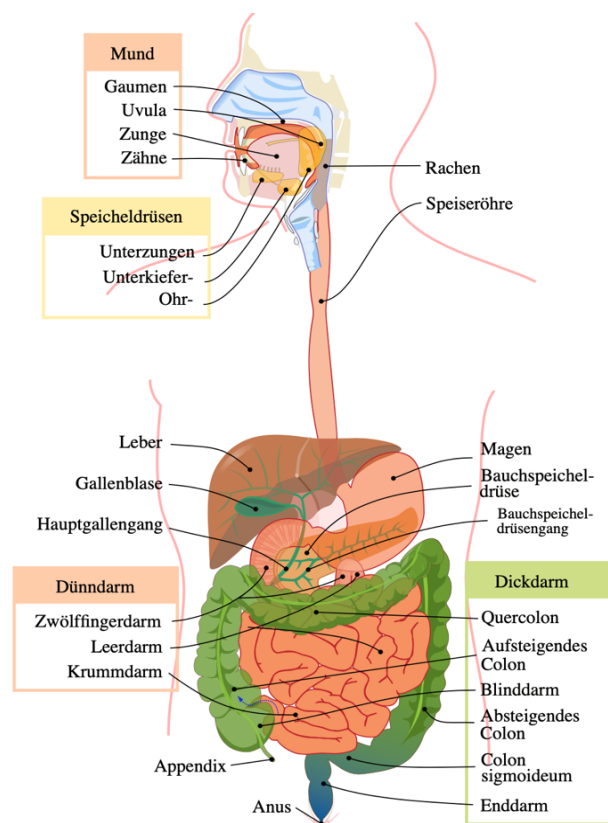
Jejunum und Ileum als Organe des Dünndarms sind maßgeblich für die Resorption der Nährstoffe sowie die Neutralisierung des sauren Milieus zuständig.

Die dritte funktionelle Einheit, bestehend aus Colon, Rektum und Analkanal, sorgt für die Rückresorption von Wasser und stellt als Reservoir- und Kontinenzorgan einen entscheidenden Bestandteil unseres Verdauungssystems dar.

Der gesamte Magen-Darm-Trakt des Menschen misst eine Oberfläche von etwa 30 m<sup>2</sup>, was ungefähr der Hälfte eines Badminton-Feldes entspricht und besitzt eine Länge von ca. 5m (Helander and Fändriks, 2014).

Die Darmschleimhaut befindet sich im Regelfall in einem physiologischen Gleichgewicht mit dem bakteriellen Mikrobiom, welches aus mehr als 400 verschiedenen Bakterienspezies und Subspezies besteht, wobei diese Zahlen durch zunehmend bessere Technologien zur Charakterisierung der bakteriellen Mikrobiota einem ständigen Wandel unterworfen sind. Diese bakterielle Mikrobiota spielt von Geburt an eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des Immunsystems und bei verschiedenen Stoffwechselprozessen (Chistiakov et al., 2015). Die humane Darmflora birgt selbstverständlich auch invasive Gefahren, welche durch das körpereigene Immunsystem unter Kontrolle gehalten werden müssen. Der histologische Grundaufbau dieser Oberfläche - auch Darmwand genannt - findet sich in allen Darmabschnitten wieder. Die Tunica mucosa als innerste Schicht der Darmwand besteht aus der Lamina epithelialis mucosae, der Lamina propria mucosae sowie einer dünnen Muskelschicht, der Lamina muscularis mucosae. Mit Ausnahme von Mundhöhle, Ösophagus und Analkanal besteht die Lamina epithelialis mucosae

aus einschichtigem Zylinderepithel. Dieses ermöglicht eine effiziente Nahrungsaufnahme und stellt zugleich eine biologische und physikalische Abwehrschanke für potenzielle Pathogene dar. An die Tunica mucosa schließt sich der Tela submucosa an, in welchem Blut- und Lymphgefäße sowie ein Teil des enterischen Nervensystems als Plexus submucosus (Meissner-Plexus) und vereinzelt Drüsen zu finden sind. In der Tunica muscularis als weiteren Bestandteil der Wandschicht verläuft eine Ring- und eine Längsmuskelschicht. Beide Muskelschichten umgeben den sogenannten Plexus myentericus (Auerbach-Plexus), ein Nervengeflecht, das für die propulsive Darmperistaltik verantwortlich ist. Die äußerste Wandschicht wird durch die Tunica adventitia oder Tunica serosa gebildet (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). In der nachfolgenden Abbildung 1 sind die anatomischen Einheiten des GI-Traktes schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Die anatomischen Einheiten des Gastrointestinaltraktes.**

Mit freundlicher Genehmigung von Mariana Ruiz, Jmarchn, Eigenes Werk, Gemeinfrei.

### 1.1.1 Der Dünndarm

Der Dünndarm stellt den stoffwechselaktivsten Bereich des GI-Trakts dar und reicht vom Duodenum (Zwölffingerdarm) über das Jejunum bis zum Ileum, welches durch die Bauhin-Klappe vom Dickdarm abgegrenzt wird.

Die oral aufgenommene Nahrung erreicht über den Ösophagus den Magen, welcher durch die Sekretion von Magensäure ( $\text{pH} < 2$ ) eine bakterizide Wirkung auf den ankommenden Nahrungsbrei ausübt. Dies sorgt dafür, dass lediglich  $10^1 - 10^5$  Bakterien pro ml Mageninhalt enthalten sind, sodass eine Fehlbesiedelung oder pathologische Übersiedelung durch Bakterien unterbunden wird (Autenrieth, 2003). Der Chymus erreicht anschließend über einen verdickten Ringmuskel, den Musculus sphincter pylori, das Duodenum, in welchem eine Vielzahl an Pankreasenzymen und Gallensäuren für den Fortgang der Verdauung und Resorption sorgen. Über den Ductus choledochus münden die Gallensäuren, über den Ductus pancreaticus die Pankreasenzyme in die Ampulla hepatopancreatica, von wo aus diese über die Papilla duodeni major dem Duodenum zugeführt werden (Lippert, 2000).

Die verschiedenen Dünndarmabschnitte sind auf unterschiedliche Resorptionsmechanismen spezialisiert. Duodenum und Jejunum sind vorwiegend an der Aufnahme von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren beteiligt, wohingegen das Ileum die Resorption von Gallensäuren und Vitamin B12 sicherstellt (Jeejeebhoy, 2002). Dieser intestinalen Resorptionsfunktion trägt auch die enorme mukosale Oberfläche im Dünndarm Rechnung. Sowohl die Einstülpungen der Darmschleimhaut, welche als Lieberkühn-Krypten bezeichnet werden, als auch die Ausstülpungen der Darmschleimhaut, welche Zotten genannt werden und mit Mikrovilli bedeckt sind, sorgen für eine 60 bis 120-fache Oberflächenvergrößerung (Helander and Fändriks, 2014). Unter Mikrovilli versteht man die im Dünndarm vorkommenden fadenförmigen Zellfortsätze der Enterozyten.

Die Bakteriendichte nimmt von oral zu anal beträchtlich zu und beträgt im Bereich des proximalen Dünndarms etwa  $10^3 - 10^4$  Bakterien pro ml Flüssigkeit oder Gewebe und im Bereich des distalen Dünndarms etwa  $10^8 - 10^9$  Bakterien pro ml Flüssigkeit oder Gewebe. Autenrieth (Autenrieth, 2003) führt diese signifikanten Unterschiede der Bakteriendichte im Dünndarm auf die „geringere Peristaltik sowie das niedrige Oxidations-Reduktions-Potential“ in den distalen Anteilen sowie auf den niedrigeren

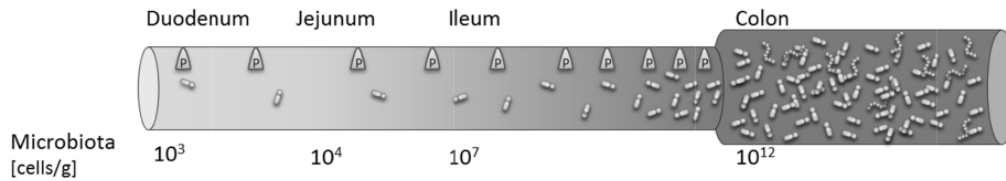
pH in den proximalen Dünndarmanteilen zurück. Bestimmte antibakterielle Stoffe wie beispielweise Defensine, die unter anderem von den Paneth-Körnerzellen sezerniert werden, erhalten die intestinale Integrität und sind für die lokale Immunantwort essenziell (Elphick et al., 2008). Das Ileum endet am Ostium ileale, das von der sog. Bauhin-Klappe umschlossen wird und mechanisch einen Rückfluss von Faeces und Bakterien verhindert.

### **1.1.2 Der Dickdarm**

Beginnend mit dem Caecum setzt sich der Dickdarm über den Colonrahmen, bestehend aus pars ascendens, pars transversum, pars descendens und pars sigmoideum, bis zum Rektum und letztlich dem Analkanal zusammen. Unterhalb des Caecums befindet sich die Appendix vermiformis (Wurmfortsatz), deren Funktion nicht abschließend geklärt ist. Es wird vermutet, dass der Appendix vermiformis eine immunologische Funktion zukommt (Laurin et al., 2011).

Die Hauptaufgabe des Dickdarms liegt in der Resorption von Wasser und Elektrolyten, wodurch der Stuhl eingedickt wird. Zudem dient der Dickdarm als Auffangbecken für unverdauliche Nahrungsbestandteile, die durch das dort angesiedelte Mikrobiom weitgehend fermentiert werden (Blaut and Clavel, 2007).

Im Gegensatz zum Dünndarm verfügt der Dickdarm lediglich über eine mukosale Oberfläche von etwa  $2\text{m}^2$  und misst eine Länge von ca. 1,5m. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass der Dickdarm nicht über Zotten und Mikrovilli verfügt. Im Dickdarm finden sich keine Paneth-Zellen, dafür aber eine Vielzahl an Becherzellen, die Schleim (Mucus) sezernieren. Dadurch wird eine zusätzliche mechanische Barriere zwischen Dickdarmschleimhaut und intestinalem Lumen gebildet, welche eine Vielzahl an Bakterien bei gesundem Zustand fernhält (Stange, 2015). Zudem legen neuere Erkenntnisse nahe, dass der intestinale Mucus der Speicherung von antimikrobiellen Peptiden dient (Dupont et al., 2014). Der Dickdarm verfügt mit  $10^{11} - 10^{12}$  Bakterien pro Gramm Darminhalt über die mit Abstand dichteste bakterielle Besiedelung des GI-Trakts (Autenrieth, 2003). Guarner und Malagelada (Guarner and Malagelada, 2003) stellten fest, dass etwa 60% der trockenen Stuhlmasse im Enddarm durch Bakterien gebildet wird. Die nachfolgende Abbildung 2 visualisiert die Verteilung der Bakteriendichte im GI-Trakt.



**Abbildung 2: Die Verteilung des Mikrobioms und der Paneth-Körnerzellen (P) im Darmtrakt.**

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Courth, Lioba; Zeichnung anhand von Daten (Sekirov et al., 2010)

### 1.1.3 Die Homöostase des Intestinaltrakts

Auf jede menschliche Zelle kommen im Durchschnitt 10 Bakterien, welche vorwiegend im Magen-Darm-Trakt angesiedelt sind. Das bedeutet eine Gesamtzahl von etwa  $10^{14}$  Bakterien pro menschlichen Organismus. Gerade in den letzten Jahren entflammte eine Diskussion über das „kritische ökologische Gleichgewicht“ zwischen der menschlichen Darmflora und seinem Wirt, dem Gastrointestinaltrakt. Sowohl im gesunden als auch im kranken Organismus spielt die intestinale Homöostase eine maßgebende Rolle. Kommt es hierbei zu einer Dysbalance mit konsekutivem Anstieg pathogener Keime im Darm, so steigt das Risiko für schwere Infektionen bis hin zu einem möglichen Multiorganversagen (Latorre, 2015; McDonald et al., 2016). Die unterschiedliche individuelle Zusammensetzung von Bakterienspezies im GI-Trakt hängt von diversen Faktoren wie beispielweise Alter, geografischer Herkunft und genetischer Disposition ab (Yatsunenko et al., 2012). Ebenso entscheidend sind exogene Faktoren wie Ernährung, Diät oder Medikamenteneinnahme (David et al., 2014). Das intestinale Mikrobiom unterliegt daher einem dynamischen Wandel und unterscheidet sich wie in Abbildung 2 visualisiert auch innerhalb der verschiedenen Darmabschnitte beträchtlich (Lozupone et al., 2013). Neben der Interaktion zwischen Bakterien und Wirt gibt es auch ein Zusammen- oder Gegenspiel zwischen den verschiedenen Bakterienspezies. Existiert eine physiologische Balance, so wirkt sich die Darmflora protektiv auf den Wirtsorganismus aus, indem es den Epithelstoffwechsel, die Darmperistaltik, die Stimulation des darmassoziierten Immunsystems und die Kolonisierungsresistenz fördert (Autenrieth, 2003; O’Hara and Shanahan, 2006). Unter Kolonisierungsresistenz versteht man die Tatsache, dass die physiologische Darmflora eine An- oder Übersiedelung durch potentiell pathogene Bakterien und Mikroorganismen verhindert, indem sie Rezeptoren für bakterielle Adhäsine an den Enterozyten besetzt, für andere Bakterien toxische Eiweiße - auch

Bakteriozide genannt - produziert und um Wachstumsfaktoren und Nahrungsmittel konkurriert (Lupp et al., 2007; Sekirov and Finlay, 2009; Sprunt and Leidy, 1988).

Das darmassoziierte Immunsystem, auch als GALT (gut associated lymphoid tissue) bezeichnet, beinhaltet über 25% aller Lymphozyten des menschlichen Organismus und besteht aus den sog. Peyerschen Plaques und dem diffusen lymphatischen System. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass keimfreie Tiere lediglich atrophische Peyer Plaques aufwiesen. Es liegt daher nahe, dass die Darmflora ein entscheidender Faktor für die Ausbildung des darmassoziierten Immunsystems ist (Imaoka et al., 1996). Es gibt eine Vielzahl an Erkrankungen, die mit einem krankhaft veränderten Mikrobiom einhergehen. Hierzu zählen beispielweise Krebserkrankungen, Fettleibigkeit, Autismus-Spektrum Störungen, Typ-2-Diabetes und allen voran chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Bäckhed et al., 2004; Ley, 2010; Matsuoka and Kanai, 2015; Morgan et al., 2012; Perry et al., 2016; Sekirov et al., 2010; Uronis et al., 2009; Wang et al., 2012). Letztere weisen häufig eine deutlich verminderte Vielfalt an Bakterien auf und gehen z.B. unter anderem mit einem Anstieg von Proteobakterien und zugleich einem Abfall an Firmicuten einher. Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass Therapien zur Wiederherstellung eines intakten Mikrobioms, beispielweise durch Probiotika oder Stuhltransplantationen, vielversprechend sein können (Matsuoka and Kanai, 2015).

#### **1.1.4 Das spezialisierte Darmepithel**

Das einschichtige Zylinderepithel des Darmtrakts besteht aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellen, die in ihrem Zusammenspiel die Funktionen des GI-Trakts ermöglichen. Die Stammzellen, welche für die Entstehung des Darmepithels verantwortlich sind, befinden sich am Boden der Lieberkühn-Krypten (Crosnier et al., 2006). Diese differenzieren sich zu verschiedenen Zelltypen des Dünndarmepithels aus, wovon die vier wichtigsten durch Enterozyten, Paneth-Körnerzellen, Becherzellen und Enteroendokrine Zellen abgebildet sind.

Enterozyten bedecken etwa 80% der Darmoberfläche und sind vorwiegend für die Absorption von Nährstoffen zuständig. Darüber hinaus sind sie an der Erkennung und Prozessierung von Antigenen beteiligt, womit sich ihre wichtige Funktion für die intestinale Immunabwehr erklärt. Paneth-Körnerzellen zeichnen sich durch ihren



hohen Gehalt an Granula aus, welche neben der antimikrobiellen Abwehr auch eine wesentliche Funktion in der Regulation der Darmarchitektur sowie der Stammzellnische einnehmen (Langlands et al., 2016; Sato et al., 2011). Zu den antimikrobiellen Peptiden der Paneth-Körnerzellen gehören beispielweise alpha-Defensine (siehe unter 1.2.2). Studien von Marshman et al. (2002) und Wehkamp und Stange (2010) konnten aufzeigen, dass LGR5- (leucine-rich-repeat-containing G-Protein coupled receptor 5) positive Stammzellen und Paneth-Körnerzellen in unmittelbarer Nachbarschaft vorkommen und die Paneth-Körnerzelle durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) und dem Wnt-Liganden Wnt3a Einfluss auf den Erhalt der Stammzellen nehmen (Marshman et al., 2002; Wehkamp and Stange, 2010). Weitere Epithelzellen des Darmtrakts mit sekretorischer Funktion sind die Becherzellen. Diese produzieren Vesikel, die mit Muzin gefüllt sind, um den Mukusfilm im Darmlumen zu bilden (Johansson et al., 2013). Die in ihrer Anzahl geringer vorkommenden Enteroendokrinen Zellen sind ein weiterer sekretorischer Zelltyp des Darmepithels. Ihre Funktion ist vor allem endokriner Natur und sie sind mitverantwortlich für die Regulation des intestinalen Stoffwechsels (Engelstoft et al., 2013; Reimann and Gribble, 2013). Hierzu zählen beispielweise die L-Zellen, welche die Hormone GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) und GLP-2 (Glucagon-like peptide 2) produzieren (siehe Kapitel 1.5).

## **1.2 Das multimodale Abwehrsystem des Gastrointestinaltrakts**

Die große Oberfläche des Magen-Darm-Trakts stellt zum einen ideale Bedingungen für die Nahrungsaufnahme dar, zum anderen ermöglicht sie eine große Kontaktfläche zwischen Mikroorganismen und Schleimhaut. Um diese potentielle Angriffsfläche vor mikrobieller Invasion zu schützen verfügt der Gastrointestinaltrakt über anpassungsfähige Abwehrmechanismen, die sich im Wesentlichen aus unspezifischer, angeborener Immunantwort und erworbener, spezifischer Immunantwort zusammensetzen (Medzhitov and Janeway, 2000).

### **1.2.1 Die mechanische Barriere aus Mukus und Epithel**

Eine erste angeborene, unspezifisch-mechanische Barriere entsteht durch den Mukus, der von den Becherzellen sezerniert wird. Dieser Mukus, eine visköse Schleimschicht

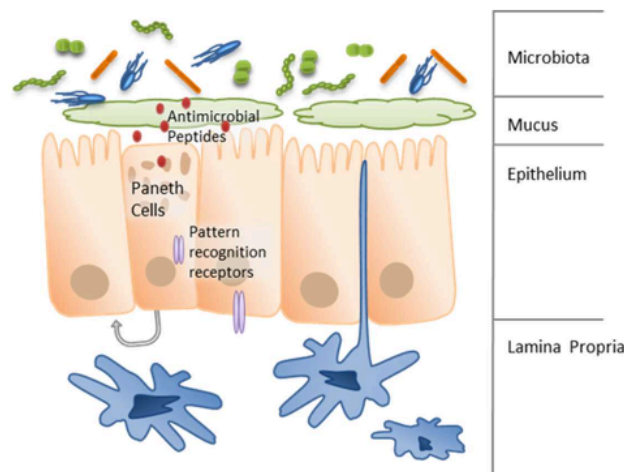
auf dem Darmepithel, besteht aus Glykoproteinen und dient als Reservoir für die kommensale Darmflora sowie die antimikrobiellen Peptide (AMPs) und Antikörper (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012; Ramanan and Cadwell, 2016). Interessanterweise besteht der Mukus im Dickdarm aus zwei Schichten: Der innere Film ist praktisch impermeabel für Bakterien und schützt so vor einer bakteriellen Invasion. Der äußere Film sitzt dem inneren Film locker auf und dient als Habitat für das kommensale Mikrobiom (Johansson et al., 2013, 2011). Im Gegensatz hierzu bietet der einschichtige Mukus des Dünndarms ebenfalls eine physikalische Barriere, ermöglicht aber zugleich eine suffiziente Nahrungsaufnahme (Ermund et al., 2013). Eine weitere mechanische Barriere stellt das einschichtige Epithel der Darmoberfläche dar. Die Epithelzellen sind untereinander durch sog. Tight junctions verknüpft, wodurch eine kontinuierliche und für Bakterien undurchdringbare Zellebene entsteht (Peterson and Artis, 2014).

### **1.2.2 Die angeborene, biologische Immunantwort**

Neben der mechanischen Barriere reihen sich chemische, biologische und zelluläre Komponenten zur angeborenen Immunabwehr ein (Elphick and Mahida, 2005). Hierzu gehören im Wesentlichen die oben erwähnten antimikrobiellen Peptide (AMPs), welche von Paneth-Körnerzellen im Dünndarm sowie von Enterozyten im Dickdarm synthetisiert und ausgeschüttet werden (Sina et al., 2018). AMPs sind nicht nur im GI-Trakt zu finden, sondern ebenso auf den Epithelien von Haut, Urogenitaltrakt oder Lunge. In ihrer Funktion ähneln sie in gewisser Weise lokalen, körpereigenen Antibiotika, indem sie auf bestimmte Bakterien einen toxischen Effekt ausüben (White et al., 1995). Zu den AMPs des GI-Trakts gehören beispielweise Lysozym, Phospholipase A2, humane Defensine, Cathelicidin und S100-Protein (Wehkamp and Stange, 2010). Die Geschichte der AMPs geht bis auf Alexander Fleming im Jahr 1922 zurück, der erstmals das Lysozym mit seiner antibiotischen Wirkung beschrieb (Fleming and Wright, 1922). Betrachtet man die Phylogenese der Eukaryonten, so lassen sich AMPs in allen bisher bekannten Eukaryonten nachweisen (Wehkamp et al., 2005; Zasloff, 2002). Mutmaßlich war und ist diese biologisch angeborene Immunantwort ein entscheidender Faktor in der Evolution der Eukaryonten hinsichtlich der Abwehr von einzelligen Mikroorganismen.

Die humanen Defensine werden gemäß ihrer Sekundärstruktur sowie der Position der Disulfidbrücken in  $\alpha$ -Defensine (HD) und  $\beta$ -Defensine (HBD) eingeteilt (Lehrer and Ganz, 2002; Szyk et al., 2006). Zusätzlich zu ihrem antimikrobiellen Wirkspektrum wirken einige Defensine auch chemotaktisch (Dürr and Peschel, 2002).

Der menschliche Organismus verfügt über 6 verschiedene  $\alpha$ -Defensine, wovon 4 hauptsächlich durch neutrophile Granulozyten synthetisiert werden (HNP 1-4). Die anderen 2  $\alpha$ -Defensine mit den Namen HD5 und HD6 werden nur von den Paneth-Körnerzellen der intestinalen Krypten synthetisiert (Jones and Bevins, 1993; Ouellette and Selsted, 1996). Ihre Hauptfunktion besteht darin, antimikrobiellen Einfluss auf Bakterien (gram-positive und gram-negative) sowie auf Mikroorganismen wie Pilze, Protozoen und Viren auszuüben (Ouellette, 2011).  $\beta$ -Defensine werden primär von Leukozyten und Epithelzellen synthetisiert und sezerniert und lassen sich in die  $\beta$ -Defensine HBD1-4 einteilen (Selsted and Ouellette, 2005). Neben einer konstitutiven Synthese von HBD1 unterliegen die  $\beta$ -Defensine HBD2 und HBD3 einer Induktion durch Entzündungssignale oder Kontakt zu bakteriellen Strukturen wie beispielweise Muramyl-Dipeptid (Inohara et al., 2005; Stange, 2015). In Studien von Harder et al. konnte gezeigt werden, dass HBD3 eine antimikrobielle Wirkung gegen multiresistente Keime aufweist (Harder et al., 2001). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr des Dünndarms.



**Abbildung 3: Die unspezifische, angeborene Immunabwehr im Dünndarm**

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Courth, Lioba (2015)

### **1.2.3 Defensine in Mensch und Maus**

Viele Faktoren des Immunsystems unterscheiden sich zwischen Mensch und Maus, insbesondere auch die humanen  $\alpha$ -Defensine, welche weitestgehend den murinen Cryptidinen entsprechen (Mestas and Hughes, 2004). Zum einen werden murine Cryptidine nur von der Paneth-Körnerzelle exprimiert und nicht auch von neutrophilen Granulozyten wie dies bei humanen Defensinen der Fall ist (Eisenhauer and Lehrer, 1992). Zum anderen unterscheiden sie sich in ihrer Anzahl an antimikrobiellen Peptiden deutlich. Murine Cryptidine und deren verwandte Sequenzen (sog. cryptidin related sequences) übersteigen die Anzahl an humanen  $\alpha$ -Defensinen deutlich (Andersson et al., 2012; Ouellette et al., 1994). Die Aktivität und Anzahl muriner Paneth-Zellen hängt außerdem stark von Umweltfaktoren wie Kalorienaufnahme sowie genetischen Faktoren ab (Gulati et al., 2012; Yilmaz et al., 2012). Der direkte Vergleich zwischen Maus und Mensch hinsichtlich antimikrobieller Peptide gestaltet sich daher schwierig und lässt sich nicht eins zu eins übertragen.

### **1.2.4 Die Erkennung von Bakterien durch den Gastrointestinaltrakt**

Die unspezifische, angeborene Immunantwort auf Zellebene geschieht unmittelbar nach Kontakt zu bestimmten Strukturen von Mikroorganismen, den sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Diese werden unter anderem von den Epithelzellen des Darmtraktes mittels sog. Toll-like Rezeptoren (TLRs) und nucleotid oligodimerisation domain Rezeptoren (NODs) erkannt und führen zu einer proinflammatorischen Antwort (Abreu, 2010). Die NOD-like Rezeptoren (NLRs) sind intrazelluläre Rezeptoren, welche von den Paneth-Körnerzellen sowie den Makrophagen exprimiert werden (Ogura et al., 2003a, 2003b). Der intrazelluläre NOD2-Rezeptor wird ausschließlich in den Paneth-Körnerzellen sowie den Stammzellen der intestinalen Krypten exprimiert. Ein genetischer Defekt des NOD2-Gens erhöht das Risiko für die Entstehung von Morbus Crohn (Stange, 2015), da es in der Folge zur fehlerhaften Synthese der Rezeptoren für die Erkennung von PAMPs kommt (Bonen et al., 2003; Ogura et al., 2003a). Es findet eine gestörte Bildung der antimikrobiellen Peptide statt, was neben einer insuffizienten Abwehrfunktion des Magen-Darm-Trakts auch eine Dysbiose des Mikrobioms zur Folge hat (Al Nabhani et al., 2016; Couturier-Maillard et al., 2013; Rehman et al., 2011).

TLRs hingegen befinden sich transmembran vor allem an der basolateralen Seite der intestinalen Epithelzellen und werden daher erst aktiviert, wenn pathogene Mikroorganismen die Epithelschicht bereits durchquert haben (Abreu, 2010).

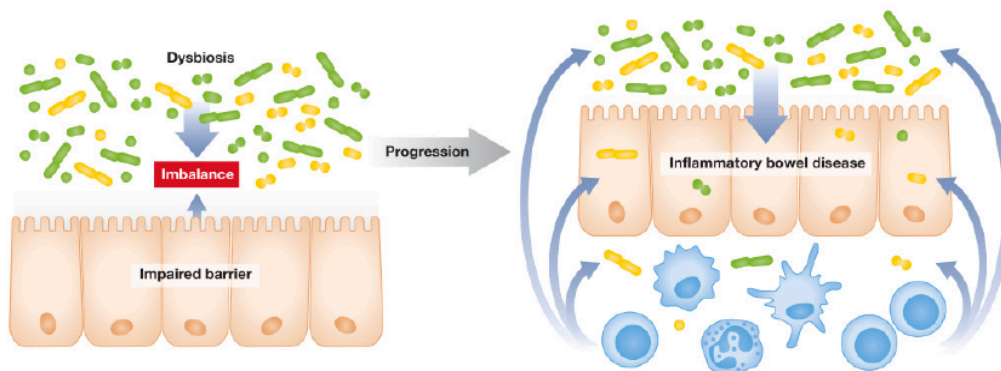
Im Gegensatz zur schnellen, angeborenen Immunabwehr benötigt die erworbene, spezifische Immunantwort deutlich mehr Zeit. T- und B-Zelllymphozyten müssen erst mittels Kontakt zu einem Antigen sensibilisiert und aktiviert werden, bevor spezifische Antikörper gebildet werden können. Die schnelle, angeborene und unspezifische Immunantwort sorgt einerseits dafür, dass unser Organismus von krankhaften Keimen nicht „überrannt“ wird und andererseits für die nötige Zeit, damit das erworbene Immunsystem zielgerichtet Antikörper synthetisieren kann (Elphick and Mahida, 2005).

### **1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen als Darmbarrierestörung**

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) versteht man Erkrankungen des Darmtrakts, die mit einer chronischen und schubweise verlaufenden Entzündung der Darmschleimhaut einhergehen. In diesem Zusammenhang kommt es zur Infiltration der Darmschleimhaut durch Lymphozyten und Monozyten. Typischerweise gehen CEDs mit chronisch-rezidivierenden Bauchschmerzen, Durchfällen, intestinalen Blutungen und extraintestinalen Symptomen wie beispielweise Arthritiden, dem Erythema nodosum oder Abszessen einher (Gerd Herold und Mitarbeiter, n.d.; Podolsky, 2002). Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) als die zwei häufigsten Vertreter der CEDs unterscheiden sich vor allem durch ihr klinisches Erscheinungsbild. MC kann den gesamten Intestinaltrakt betreffen, tritt diskontinuierlich und segmental auf und weist eine transmurale Entzündung auf. CU hingegen tritt ausschließlich im Dickdarm auf und ist durch eine kontinuierliche Entzündung der Mucosa charakterisiert. Die Pathogenese der CEDs ist noch nicht vollständig aufgeklärt und bedarf zum besseren Verständnis einer Analyse von Umweltfaktoren, genetischen und epigenetischen Einflüssen, bakteriellen Interaktionen sowie immunologischen Faktoren (Sartor, 2006; Van Limbergen et al., 2014; Ventham et al., 2016). Wehkamp et al. stellten fest, dass NOD2-Genmutationen mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Entstehung von MC einhergehen (Wehkamp et al., 2004). Eine zentrale Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion wird mittlerweile der Dysbiose zwischen Mikrobiom und intestinaler Schleimhaut zugeschrieben, wobei dies nicht abschließend geklärt ist. Die

aktuell favorisierte Hypothese der Krankheitsentwicklung geht davon aus, dass es sich bei CEDs um eine Darmbarrierestörung handelt. In einem gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen dem intestinalen Mikrobiom und der Darmbarriere. Bei Patienten mit einer CED entsteht durch eine geringere Produktion von AMPs und Mukus ein Defekt in der Darmbarriere, wodurch Bakterien das Darmepithel durchdringen können und eine Entzündungsreaktion im Sinne einer übermäßigen Immunantwort hervorrufen. Diese Immunantwort richtet sich zwar in erster Linie gegen die eindringenden Pathogene, führt aber letztlich auch zu einem Defekt der Darmmukosa (Duchmann et al., 1999; Ostaff et al., 2013; Wehkamp and Stange, 2010).

Kurative Therapien existieren derzeit noch nicht, sodass symptomatische Therapien wie konservative Ernährungstherapien, medikamentöse Immunsuppression und chirurgischen Verfahren im Vordergrund stehen. Für erfolgsversprechende kausale Therapien fehlen derzeit noch wichtige Erkenntnisse der Krankheitsentstehung. Eine Visualisierung zur Hypothese der Krankheitsentstehung bei CEDs ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Hypothese zur Entstehung von CEDs**

Durch einen Mangel an antimikrobiellen Peptiden kommt es zu einer Dysbalance zwischen dem intestinalen Mikrobiom und der Darmbarriere. Bakterien durchdringen in der Folge das Darmepithel und rufen eine Entzündungsreaktion hervor.

Mit freundlicher Genehmigung von (Ostaff et al., 2013)

### 1.3.1 Morbus Crohn

Mit einer Inzidenz von 0,3- 12,7/ 100.000 Personen pro Jahr und einer Prävalenz von 322 von 100.000 Personen stellt Morbus Crohn ein häufiges Krankheitsbild dar

(Molodecky et al., 2012). Eine Einteilung erfolgt anhand der Montreal Klassifikation gemäß Manifestationsalter (A), Lokalisation (L) und biologischem Verhalten (B). Die Lokalisation lässt sich in L1 für Ileumbefall, L2 für Colonbefall, L3 für Ileum und Colonbefall sowie L4 für den Befall des oberen GI-Trakts einteilen (Silverberg et al., 2005). Das Manifestationsalter variiert individuell stark und lässt vermuten, dass eine genetische Disposition von Relevanz ist (Koslowski et al., 2012). Zudem unterscheiden sich die verschiedenen Manifestationslokalisationen der Erkrankung auch auf molekularer Ebene, was die unterschiedliche Expression von AMPs sowie die Zusammensetzung des Mikrobioms in Dün- und Dickdarm implizieren (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Liu et al., 1998; Swidsinski et al., 2005). Bei ausgeprägtem, therapierefraktärem Befall durch eine chronisch entzündliche Darmerkrankung sollte immer auch die Indikation zur chirurgischen Intervention geprüft werden (S3-Leitlinie 2021 DGVS zu Morbus Crohn und Colitis ulcerosa). Bei rezidivierenden oder ausgeprägten chirurgischen Eingriffen besteht das Risiko für die Entwicklung des Krankheitsbildes Kurzdarmsyndrom (siehe hierzu Kapitel 1.4) (Koffeman et al., 2003).

### **1.3.2 Colitis ulcerosa**

Im Gegensatz zum MC manifestiert sich die CU ausschließlich im Dickdarm. Typischerweise geht die CU mit blutig-schleimigen Diarrhoen einher und betrifft die oberflächlichen Schleimhautschichten. Extraintestinale Symptome treten ebenfalls auf, allerdings seltener als beim MC. Obwohl die Ätiopathogenese nicht vollständig geklärt ist, wird ein Zusammenhang zwischen dem nicht intakten Mukus des Dickdarms und der Erkrankung vermutet. Es konnte eine dünnere Mukusschicht sowie eine geringere Dichte an Becherzellen bei Patienten mit CU nachgewiesen werden (Strugala et al., 2008).

## **Das Kurzdarmsyndrom**

Unter einem Kurzdarmsyndrom versteht man die insuffiziente Funktion des Dünndarmtraktes infolge von Resektion, Darmanomalien oder Untergang von Resorptionsfläche durch bestimmte Erkrankungen. Es ist gekennzeichnet durch eine unzureichende Aufnahme von Nährstoffen und Flüssigkeit und folglich einer Abhängigkeit von parenteraler Ernährung um eine ausreichende Nährstoff- und Flüssigkeitsversorgung zu gewährleisten (Jeppesen and Mortensen, 2000; O’Keefe et al., 2006). Die Ursache dieses Darmversagens liegt in einer zu geringen Anzahl an Enterozyten, welche im gesunden Darmtrakt die Aufnahme von Nährstoffen und Flüssigkeit bewerkstelligen. Die Evaluierung der verbliebenen resorptionsfähigen Darmschleimhaut spielt eine entscheidende Rolle hinsichtlich Therapie und Prognose des Kurzdarmsyndroms (Koffeman et al., 2003). In der Literatur wird eine durchschnittliche Dünndarmlänge von 400cm im gesunden humanen Organismus beschrieben (B. Messing et al., 2006). Reduziert sich die Länge auf weniger als 200cm, so ist ein funktionelles Kurzdarmsyndrom zu erwarten (Buchman, 2006). Hinsichtlich der Ursachen der Erkrankung muss zwischen angeborenen und erworbenen Faktoren unterschieden werden. In absteigender Häufigkeit sind dies folgende Grunderkrankungen im Erwachsenenalter: Mesenterialinfarkt, Morbus Crohn und Strahlenenteritis. Eine untergeordnete Rolle spielen zudem hochgradige Abdominaltraumata, Resektionen bei Abdominaltumoren sowie intestinale Pseudoobstruktion (Koffeman et al., 2003).

Mit einer Prävalenz von 10-34 pro 1.000.000 Menschen handelt es sich um ein seltenes Krankheitsbild, das allerdings mit einem hohen Leidensdruck und einer signifikant geringeren Lebensqualität einhergeht (Howard et al., 1995; Jeppesen et al., 1999; von Websky et al., 2014).

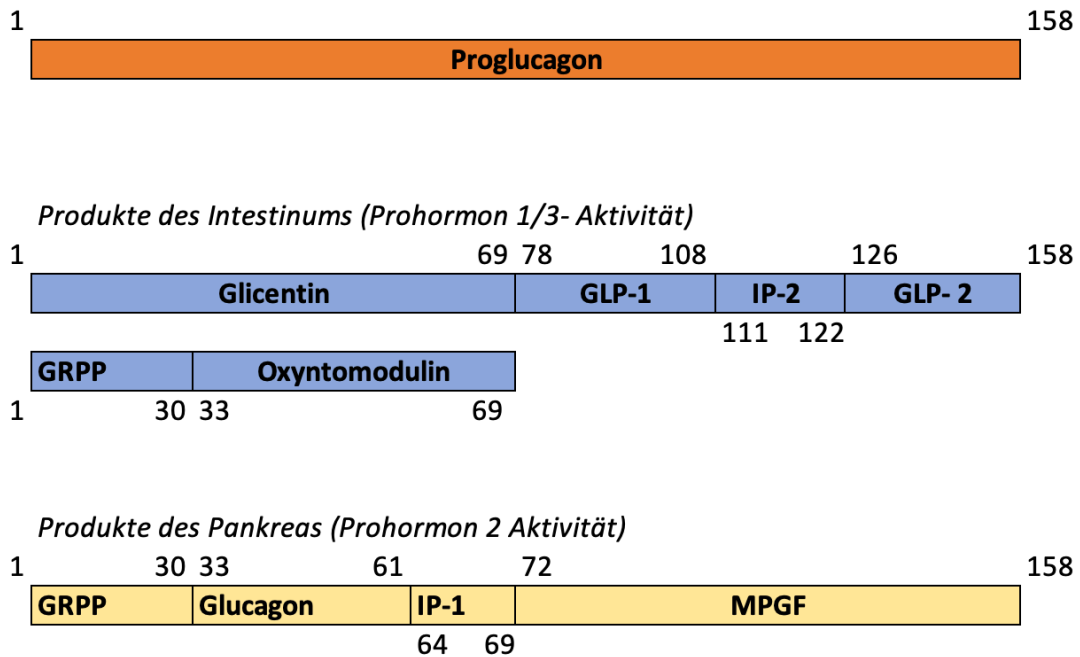
Trotz wegweisender therapeutischer Fortschritte während der letzten Dekaden in der Behandlung des Kurzdarmsyndroms sind die Patienten nach wie vor einer hohen Mortalität und Morbidität ausgesetzt. Zudem verursacht die Behandlung hohe finanzielle Kosten (Dibb et al., 2017; Hofstetter et al., 2013; Howard, 2006; Messing et al., 1998; Schalamon et al., 2003). Die etablierten Therapiekonzepte beinhalten die symptomatische Behandlung mit Opiaten, Somatostatin-Analoga und parenteraler Ernährung. Ferner gewann die Darmtransplantation seit den 1990er Jahren an Bedeutung, die allerdings im Hinblick auf die hohe Morbidität und Mortalität nach



Operation nicht flächendeckend eingesetzt werden kann (Nightingale, 2001; O'Keefe et al., 1994; Pironi et al., 2016). Seit 2012 ist mit dem Medikament Teduglutid, einem GLP-2 Analogon, eine weitere Therapieoption zugelassen. In der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkmechanismen von GLP-2 sowie von Teduglutid auf die epitheliale Homöostase untersucht und eine mögliche therapeutische Indikation für chronisch entzündliche Darmerkrankungen eruiert werden.

#### **1.4 Glucagon-like peptide 2**

Das Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) entsteht als eines von 7 verschiedenen Peptiden aus dem Vorläufermolekül Proglukagon, welches wiederum durch das Proglucagon-Gen codiert wird (Bell et al., 1983; Holst et al., 1994; Tager and Steiner, 1973). GLP-2 besitzt eine Halbwertszeit von 7min (Hartmann et al., 2000). Das Präkusorprotein wird überwiegend in den A-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, den Enteroendokrinen L-Zellen des Darmtrakts sowie den Neuronen von Hypothalamus und Hirnstamm exprimiert. Es findet eine gewebespezifische, posttranslationale Modifikation statt. Im Pankreas wird das Vorläufermolekül Proglukagon durch das Enzym Prohormon Convertase 2 zu Glucagon und Major Proglucagon Fragment (MPGF) gespalten. Im Darmtrakt hingegen wird das Präkusorprotein durch die beiden Enzyme Prohormon Convertase 1 und 3 in die Hormone GLP-1, GLP-2, IP-2, Glicentin und Oxyntomodulin gespalten (Janssen et al., 2013; Patzelt and Schiltz, 1984). Eine schematische Darstellung zu den Produkten des Proglukagon-Gens und seinen posttranslational entstehenden Peptiden findet sich in der nachfolgenden Abbildung 5.



**Abbildung 5: Aufbau des Proglukagon-Gens und den daraus posttranslational entstehenden Peptiden**

GRPP= Glicentin-related pancreatic polypeptide; IP1=intervening peptide 1; GLP-1= Glucagon-like peptide 1; IP2= intervening peptide 2; GLP-2= Glucagon-like peptide 2; MPGF= Major Proglucagon Fragment.

Im Darmtrakt posttranslational entstehende Peptide: Glicentin, Oxyntomodulin, GRPP, GLP-1, IP-2, GLP-2.

Im Pankreas posttranslational entstehende Peptide: GRPP, Glucagon, IP-1 und MPGF.

Die Zahlen in der schematischen Darstellung markieren die jeweiligen Aminosäurestellen innerhalb des Proglukagon Moleküls, die für die Modifikation der entstehenden Peptide relevant sind.

Eigenes Werk nach Daten von Drucker et al. 2003, Molecular Endocrinology

Es konnte festgestellt werden, dass die Zerlegung des Vorläufermoleküls in die verschiedenen Peptide gewebespezifisch stattfindet. Während im Pankreas die Hormone Glucagon und MPGF vorherrschen, findet im Dünndarm eine posttranslationale Modifikation in die Peptide Glicentin, Oxyntomodulin, IP-2 sowie GLP-1 und GLP-2 statt (Mojsov et al., 1986). Die Sekretion von GLP-2 hängt stark von der Nahrungsaufnahme ab und wird primär durch langkettige Fettsäuren im Dünndarm induziert (Brubaker and Anini, 2003; Xiao et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass GLP-2 die Sekretion von Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) aus den Fibroblasten der Lieberkühn-Krypten sowie von keratinocyte growth factor (KGF) der Myofibroblasten der Submukosa induziert. Der Signalweg über Insulin-like growth factor I stellt mutmaßlich den Stimulus für eine gesteigerte Proliferationsrate in den Lieberkühn-Krypten sowie eine erhöhte Aufnahmekapazität des Dünndarmepithels nach GLP-2 Sekretion dar (Dubé et al., 2006; Ørskov et al., 2005). Drucker et al. fanden 1996 neben der

proliferativen Wirkung von GLP-2 heraus, dass das Hormon einen antiapoptotischen Effekt auf das Darmepithel ausübt. Zudem zeigen mikroskopische Aufnahmen, dass es unter GLP-2 zu einer erhöhten Mitoserate der Epithelzellen und vergrößerten Darmzotten kommt. Es zeigte sich weiterhin, dass diese proliferationsfördernden Effekte auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt sind (Drucker et al., 1996; Tsai et al., 1997b, 1997a). Erstmals durch Jeppesen et al. wurde der Einfluss von GLP-2 an Patienten mit Kurzdarmsyndrom untersucht. Hier zeigte sich eine verbesserte intestinale Absorption von Nährstoffen, die sich positiv auf den Ernährungszustand der Patienten mit Darmversagen auswirkte (Jeppesen et al., 2001). Des Weiteren steigert das Peptidhormon den mesenterialen Blutfluss und inhibiert die Motilität des Darmtraktes, sodass mehr Zeit zur Verdauung und Aufnahme der Nährstoffe vorhanden ist (Amato et al., 2009; Bremholm et al., 2011; Guan et al., 2012, 2006). Neben diesen intestinotropen Einflüssen wird die Darmbarriere durch GLP-2 verstärkt, indem die Durchlässigkeit des Darmepithels verringert wird. Im Hinblick auf CEDs, welche mit einer gestörten intestinalen Barrierefunktion und dem Eindringen von bakteriellen Antigenen einhergehen, stellt dies einen interessanten und vielversprechenden Aspekt dar (Benjamin et al., 2000).

### **1.5 Der Glucagon-like peptide 2 Rezeptor (GLP-2R)**

Der GLP-2R gehört zur Gruppe der Secretinrezeptoren und ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen. Eine Expression des Rezeptors konnte bisher nur im Dünndarm, Dickdarm, Magen sowie Gehirn nachgewiesen werden (Munroe et al., 1999; Yusta et al., 1999). Es wird angenommen, dass der GLP-2R im GI-Trakt durch Zellen des enterischen Nervensystems sowie Myofibroblasten exprimiert wird (Cinci et al., 2011; El-Jamal et al., 2014a; Guan et al., 2006; McDonagh et al., 2007). Außerdem konnte festgestellt werden, dass der GLP-2R in Schlüsselregionen des Gehirns wie Hypothalamus und Hippocampus ebenfalls exprimiert wird. Im Hypothalamus wird ein Einfluss auf das Melanocortin-System postuliert, da eine verlangsamte Magenentleerung bei Aktivierung des Rezeptors beobachtet werden konnte. (Guan et al., 2012; Tang-Christensen et al., 2000; Wang and Guan, 2010). Der GLP-2R ist durch eine hohe Selektivität gegenüber dem Hormon GLP-2 gekennzeichnet und spricht nur schwach auf strukturelevante Hormone wie GLP-1 oder Glucagon an (DaCampa et al., 2000).

### 1.5.1 Das GLP-2 Analogon Teduglutid

Im Jahr 2012 wurde das GLP-2 Analogon Teduglutid (Revestive ©/ Gattex©) für den europäischen und amerikanischen Markt zugelassen. Es handelt sich hierbei um ein Peptidhormon, bestehend aus 33 Aminosäuren. Im Gegensatz zum körpereigenen GLP-2 wurde Glycin anstelle von Alanin an der zweiten Position des N-Terminus ausgetauscht, sodass eine Resistenz gegenüber dem Abbau durch die Dipeptidyltransferase 4 (DPP4) besteht und damit eine deutlich längere Halbwertszeit von ca. 2h erreicht wird (Nørhølk et al., 2012; Yazbeck, 2010). Bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom und parenteraler Ernährung konnte gezeigt werden, dass Teduglutid die Abhängigkeit von parenteraler Ernährung signifikant verringerte. Einige Patienten waren nicht mehr auf die parenterale Ernährung angewiesen (Jeppesen et al., 2012, 2011, 2005). Die intestinotrophen Effekte gleichen denen des GLP-2: Vergrößerung der intestinalen Oberfläche durch eine gesteigerte Proliferation der Krypten und Enterozyten, erhöhter mesenterialer Blutfluss sowie Verlangsamung der intestinalen Motilität (Bremholm et al., 2009; Høyerup et al., 2013). Die Eliminierung von GLP-2 sowie von Teduglutid erfolgt hauptsächlich renal (Nave et al., 2013), sodass die Dosis bei niereninsuffizienten Patienten angepasst werden muss. Die European Medicines Agency kam zu dem Schluss, dass der „Nutzen von Teduglutid gegenüber den Risiken überwiegt“. An Risiken und Nebenwirkungen werden vor allem respiratorische Infekte, Kopfschmerzen, Abdominalschmerzen, Übelkeit sowie Stomaschwellung bei Patienten mit Stoma beschrieben. Diese seien aber in der Mehrzahl der Fälle leicht bis mäßig aufgetreten. Darüber hinaus darf Teduglutid nicht bei Patienten mit aktiver Tumorerkrankung oder Tumorerkrankungen des Intestinaltrakts in den letzten 5 Jahren angewendet werden (European Medicines Agency, 2017).

Welche Rolle Teduglutid bei langjähriger therapeutischer Anwendung auf die Karzinogenese verschiedener Tumoren im Gastrointestinaltrakt spielt kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Auf der einen Seite konnte ein direkt proliferativer Effekt von GLP-2 auf transformierte Zellen trotz eindeutigem Fehlen des GLP-2R nachgewiesen werden. Zudem wurde eine geringe Expression von GLP-2R in Tumorzelllinien nachgewiesen, darunter auch Tumorzellen des Adeno-Karzinoms des Colons. Auf der anderen Seite zeigten Koehler et al., dass GLP-2R transfizierte Colon-

Karzinom-Zelllinien keine GLP-2 abhängige Proliferation aufwiesen. Außerdem konnte kein Progress der Karzinogenese in Tumortragenden Apc Min/+ Mäusen nachgewiesen werden (Koehler et al., 2005, 2008a).

Um eine sichere und langfristige Anwendung mit Teduglutid gewährleisten zu können, bedarf es weiterer Studien in Bezug auf mögliche Einflüsse auf die Karzinogenese. Ebenso wird sich zeigen, ob Indikationen beispielweise im Rahmen von CEDs in absehbarer Zeit in Frage kommen.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkweise von Teduglutid in gesundem und krankem Organismus zu liefern.

### **1.5.2 Die Sucrase-Isomaltase**

Hierbei handelt es sich um eine im Bürstensaum des GI-Traktes lokalisierte Disaccharidase, welche beinahe ausschließlich in den Enterozyten des Dünndarms sowie vereinzelt im Dickdarm vorkommt (Gorvel et al., 1991; Naim et al., 1991, 1988). Die Hauptfunktion der Sucrase-Isomaltase besteht in der enzymatischen Spaltung von Saccharose und Stärke. Skovbjerg et al. sowie Rana et al. lokalisierten das höchste Vorkommen der Sucrase-Isomaltase im proximalen Jejunum, gefolgt von weiter distalen Anteilen des Dünndarms (Rana et al., 2001; Skovbjerg, 1981). Defekte oder reduzierte Expression der Sucrase-Isomaltase führen zu verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. dem kongenitalen Sucrase-Isomaltase Mangel und gehen mit Malidigestion und Malabsorption einher (Alfalah et al., 2009; Gericke et al., 2016; Heymann et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression der Sucrase-Isomaltase im Hinblick auf veränderte Enterozytenproliferation und Lokalisation untersucht.

### **1.6 Intestinale Organoide als 3D-Modell**

Der Großteil der angewandten Methoden in der Zellkultur basiert auf 2D-Modellen. Eine Limitation von 2D-Modellen liegt darin, dass die Zellen nicht im Zellverband untersucht werden können und sich daher recht homogen verhalten. Zudem ist keine räumliche Architektur gegeben und eine Interaktion mit anderen Zelltypen sowie der extrazellulären Matrix ist nicht gegeben. In 3D-Modellen hingegen ist es möglich Zellpolarität, Zelldifferenzierung sowie ein komplexes Gewebe nachzubilden und somit

eine Annäherung an die Komplexität von Organsystemen zu ermöglichen (Bissell et al., 2002; Pampaloni et al., 2007). Sato et al. entwickelten 2009 ein neuartiges in vitro Modell zur Kultivierung von Organoiden. Darunter versteht man „künstliche Minidärme“, welche als 3D-Modell in Zellkultur gehalten werden können (Sato et al., 2009). Dabei werden isolierte Dünndarmkrypten oder Lgr5+ Stammzellen in Matrigel gegeben. Das Matrigel soll dabei die Extrazellulärmatrix darstellen und beinhaltet unter anderem Strukturelemente wie Kollagen IV, Laminin und Entactin. Das Medium zur Kultivierung der Organoiden beinhaltet dabei Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie N2, B27, R-Spondin, EGF, Noggin uvm. R-Spondin ist beispielweise ein Wnt3A-Signalweg-Agonist, welcher ein Ligand für Lgr5 ist. Außerdem kann R-Spondin auch an Lgr4 und Lgr6 binden (Carmon et al., 2011; de Lau et al., 2011; Schuijers and Clevers, 2012). Während Noggin die Differenzierung durch einen Antagonismus des BMP-Signalweges inhibiert, spielt EGF eine wichtige Rolle in der Differenzierung intestinaler Stammzellen (Al-Nafussi and Wright, 1982; Biteau and Jasper, 2011; Groppe et al., 2003; Lim et al., 2000). Sato et al. konnten nachweisen, dass sämtliche Zelltypen des intestinalen Epithels wie Enterozyten, Paneth-Körnerzellen, Enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Stammzellen Bestandteile der Organoiden sind und somit die Funktionalität der Mukosa erhalten bleibt. Neuerdings konnten auch Organoiden von anderen Organsystemen wie beispielweise Leber, Pankreas und Magen etabliert werden (Barker et al., 2010; Boj et al., 2015; Huch et al., 2013).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die molekularen Wirkmechanismen von Teduglutid auf die Homöostase im Dün- und Dickdarm untersucht werden. Zunächst soll geklärt werden, in welchen Darmbereichen der GLP-2R exprimiert wird und ob es eine unterschiedliche Verteilung in Dün- und Dickdarm gibt, um Rückschlüsse auf ein unterschiedliches therapeutisches Ansprechen zu ziehen. Zudem soll beleuchtet werden, ob die quantitative Expression des Zielrezeptors bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zu gesundem Gewebe Unterschiede aufweist.

Der direkte Einfluss des GLP-2-Analogons Teduglutid auf die verschiedenen Zelltypen im Dünndarm soll mittels muriner Organoide als 3D-Zellkulturmethode genauer analysiert werden.

Darüber hinaus sollen mögliche proliferative und apoptotische Effekte auf ausgewählte Tumorzellen mit nachgewiesener Expression des GLP-2R in Zellkulturen eruiert werden.

Das Universitätsklinikum Tübingen behandelt eine größere Anzahl an Patienten mit Kurzdarmsyndrom mit dem seit 2012 zugelassenen Medikament Teduglutid. Anhand von Biopsien dieser Patienten, welche vor und während der Behandlung mit Teduglutid entnommen wurden, sollen erstmals in vivo Erkenntnisse gesammelt werden, welchen Einfluss das Medikament auf die epitheliale Homöostase des Dün- und Dickdarms ausübt. Zudem sollen mögliche weitere Indikationsstellungen für die Anwendung des GLP-2-Analogons anhand der gewonnenen Daten diskutiert werden.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

Alle verwendeten Hilfsmittel sowie Verbrauchsmaterialien, die nicht in der Liste aufgeführt sind, gehören zur Standardlaborausstattung.

#### 2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
16R Megafuge	Thermo Scientific, USA
Dampfgarer	Braun, Deutschland
Elektronenmikroskop	Olympus, Deutschland
Elektrophorese Power Supply	Peqlab, Deutschland
Geldokumentationssystem	Intras Science Imaging, Deutschland
Heracell vios 160i Brutschrank	Thermo Scientific, USA
LightCycler® 480	Roche, Deutschland
Nanodrop 1000	Peqlab, Deutschland
Plattenreader	Tecan Group, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf, Deutschland
Wärmeschrank	Witeg, Deutschland

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Multiwell Plate 96, weiß für LightCycler® 480	Sarstedt, Deutschland
Zellsieb 70µm	Greiner-BioOne, Deutschland



## 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Kits, Enzyme und Antikörper

### 2.1.3.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
100bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
1kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, USA
Agarose NEE0	Roth, Deutschland
A-83-01	Tocris Bioscience, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Advanced DMEM/F12 Medium	Life Technologies, USA
Benzimide H33342 trihydrochloride	Sigma-Aldrich, Deutschland
BSA/albumin Fraktion V	Roth, Deutschland
Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich, USA
B27 supplement	Invitrogen, USA
10x Citratpuffer pH 6	Zytomed, Deutschland
CHIR99021	Stemgent, USA
Dampfgarpuffer pH 6/ pH 9	Dako, Dänemark
DMEM (hoher Glukosegehalt, HEPES)	Life Technologies, USA
DPBS-Puffer	Life Technologies, USA
EDTA	Roth, Deutschland
Endogene Peroxidase Blockinglösung	Dako, Dänemark
Ethanol 99%	VWR, USA
Ethidiumbromid Lösung 0,025 %	Roth, Deutschland
FCS	Biochrom, Deutschland
Fluoreszens Mounting Medium	Dako, Dänemark
Gentamicin/ Amphotericin	Life Technologies, USA
Glutamaxx	Life Technologies, USA
Glycerol	VWR, Deutschland

Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II, 25%	Merck, Deutschland
HEPES Buffer 1M	Invitrogen, Deutschland
Human recombinantes Wnt3A	R&D Systems, Deutschland
Human recombinantes EGF	Sigma-Aldrich, Deutschland
Human (Leu)15-Gastrin-1	Sigma-Aldrich, Deutschland
NatriumPyruvat (100nM)	Life Technologies, USA
Luria Agar	Roth, Deutschland
Luria Broth Agar	Roth, Deutschland
Matrigel	Corning, Deutschland
Microclear®	Merck, Deutschland
Murine EGF	Invitrogen, Deutschland
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich, Deutschland
Neo-Mount®	Merck, Deutschland
N2 supplement	Invitrogen, Deutschland
Nicht essenzielle Aminosäuren (100x)	Life Technologies, USA
Nicotinamide	Sigma-Aldrich, Deutschland
Noggin	Peprtech, USA
Penicillin/ Streptomycin	Life Technologies, USA
RPMI-1640 Medium	Merck Millipore, Deutschland
R-spondin-1	Peprtech, USA
Saccharose	Roth, Deutschland
SB202190	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sorbitol	Fisher Scientific, Deutschland
Sulfortrodamine B	Sigma-Aldrich, Deutschland
TBS	Roth, Deutschland
Thiazovivin	Stemgent, USA
TRIS	Roth, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, USA

TRizol	Life Technologies, USA
TrypLE-Express	Life Technologies, USA
Trypsin-EDTA	Roth, Deutschland
Tween 20	Merck, Deutschland
Tween 80	Merck, Deutschland
X-Gal	Roth, Deutschland
XyloI	VWR, Deutschland
Y-27632	Sigma-Aldrich, Deutschland
Zytomed Block Solution	Zytomed, Deutschland

### 2.1.3.2 Antikörper, Kits und Enzyme

Antikörper, Kits, Enzyme	Hersteller
Anti-GLP-2 (polyclonal,Rabbit)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Anti-HD5: Anti-DEFA5	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dako Real en Vision	Dako, Dänemark
Direct-zol™ RNA Miniprep	Zymo-Research, Deutschland
dNTP Mix, PCR Grade	Qiagen, Deutschland
Eco RI Restriktionsenzym	New England Biolabs, USA
HotStarTaq Mastermix Kit	Qiagen, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, USA
IgG Alexa Fluor 488 (goat anti mouse)	Jackson/ Dianova, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Deutschland
Quick-RNA™ Miniprep	Zymo-Research, Deutschland
SybrGreen Masterkit	Roche, Deutschland
Synaptophysin (monoclonal, Mouse)	DCS Diagnostics, Deutschland
Topo® TA Cloning® Kit	Invitrogen, USA

## 2.1.4 Medien und Puffer

### 2.1.4.1 Zellkulturmedien

Medium	Komponenten	Menge
Wnt3a Medium	DMEM FCS Pen/ Strep Zeocin	445ml 50ml 5ml 1,25µl/ml
Caco-2 Medium	DMEM FCS Natrium-Pyruvat NEAA Pen/ Strep	435ml 50ml 5ml 5ml 5ml
HepG2 Medium	DMEM FCS Glutamaxx	445ml 50ml 5ml
A549, HuCCT1, HeLa Medium	DMEM FCS	450ml 50ml
ENR-Medium	Ad-DF*** B27 Supplement N2 Supplement Noggin EGF n-Acetylcystein (500mM) R-Spondin	14ml 400µl 200µl 4ml 20ml 50µl 2ml
RPMI-full-Medium	RPMI AddR (20x) FCS	500ml 29ml 50ml
AddR (20x) Medium	Pen/ Strep	100ml

	$\beta$ -Mercaptoethanol HEPES-Puffer(1M) Natrium-Pyruvat Glutamaxx NEAS Asparagin (10mg/ml)	100ml 100ml 100ml 100ml 60ml 20ml
Kryptenkultivierungsmedium für Mausorganoide (Ad-DF <sup>***</sup> )	Advanced DMEM Glutamaxx HEPES Puffer(1M) Pen/ Strep	485ml 5ml 5ml 5ml

Chelation Puffer (für 200ml)	DPBS mit 2% Sorbitol 1% Sucrose 1%BSA 1x Gentamycin/ Amphotericin	
Wnt3A Supplements für konditioniertes Medium	2mM Glutamin 10mM HEPES 100ml Pen/Strep N2 Supplement B27 Supplement 1% BSA	
human minigut medium (HMM)	Advanced DMEM/F12 mit 2mM Glutamin 10mM HEPES 100U/ml Pen/Strep N2 Supplement B27 Supplement 1%BSA	
complete human minigut medium (CHMM)	50% HMM, 50% Wnt3A konditioniertes Medium 1 $\mu$ g/ml RSPO-1	

	100ng/ml Noggin 50ng/ml EGF 500µM A-83-01 10µM SB202190 10nM Gastrin-1 10mM Nicotinamid 1mM n-Acetylcystein 2,5µM (1,25µl auf 5ml Medium) CHIR99021 2,5µM (1,25µl auf 5ml Medium) Thizovivin
Kryptenisolationspuffer	50ml PBS+ 200µl 0.5M EDTA
Spüllösung für Mausorganoide	45ml PBS+5ml FCS

#### 2.1.4.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

<b>Puffer/ Lösung</b>	<b>Menge/ Herstellung</b>
EDTA-Stammlösung 0,5M pH 8.0	186,1g EDTA in 700ml Wasser lösen, pH-Wert einstellen mit ca. 50ml NaOH, anschließend auf 1l Wasser auffüllen und autoklavieren
LB-Platten	40g Luria-Agar ad 500ml Wasser, autoklavieren, Zugabe von 0,5ml Ampicillin-Stammlösung, Platten gießen
LB-Medium	20g Luria Brothad 500ml Wasser, autoklavieren, Zugabe von 0,5ml Ampicillin-Stammlösung
Ladungspuffer für Agarosegele	40g Saccharose+ 0,25g Bromphenolblau bzw. Xylencanol ad 50ml Wasser
Ampicillin-Stammlösung	0,05g Ampicillin in 1ml Wasser lösen= 50mg/ml
1%/ 1,5% Agarosegel	1g /1,5g Agarose NEE0 ad 100ml TAE-Puffer (1x)

TAE-Puffer (50x)	242g TRIS+ 57,1ml Eisessig+ 100ml 0,5M EDTA pH 8.0 ad 1L Wasser
TAE-Puffer (1x)	40ml TAE-Puffer (50x) ad 2L Wasser
TBS-Waschpuffer (10x)	30g TRISBase+2gKCL+5,6g TRIS (Base)+ 80g NaCl ad 1L Wasser, mit HCL auf pH 7.4 einstellen
TBS-T Waschpuffer (1x)	100ml 10x TBS-Waschpuffer mit 900ml Wasser mischen+ 1ml Tween 20
SRB	4g Sulforhodamin B in 1% Essigsäure
10% Trichloressigsäure (TCA)	100g Trichloressigsäure in 1L Wasser

### 2.1.5 Primersequenzen und Plasmide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von Biomers Deutschland synthetisiert, high purity salt free (HPSF) aufgereinigt und lyophilisiert geliefert. Sie wurden dann in Nuklease-freiem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Für die vorliegende Arbeit wurden GLP-2, Sucrase-Isomaltase, hGCG und m-GLP-2 neu etabliert. Alle weiteren für die durchgeführten Genexpressionsmessungen aufgeführten Primer und Plasmide waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden und wurden zur Verfügung gestellt.

Die mRNA-Sequenzen für die humanen Gene, die für die quantitative real-time PCR Analyse verwendet wurden, entstammen der „Nucleotide“-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Nachfolgend sind die mRNA-Sequenzen dieser Primer aufgelistet:

Tabelle 1: Verwendete Primer für die qRT-PCR-Analyse von humanen Genen

Gen	Sense-Primer (5'-3')	Antisense-Primer (3'-5')	Produktgröße (Bp)
<b>β-Actin</b>	GCC AAC CGC GAG AAG ATG A	CAT CAC GAT GCC AGT GGT A	120
<b>HD5</b>	GCC ATC CTT GCT GCC ATT C	AGA TTT CAC ACA CCC CGG AGA	241
<b>HD6</b>	CCT CAC CAT CCT CAC TGC TGT TC	CCA TGA CAG TGC AGG TCC CAT A	266
<b>IL-10</b>	AAG CCT GAC CAC GCT TTC TA	ATG AAG TGG TTG GGG AAT GA	193
<b>IL-8</b>	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GC	TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TC	292
<b>Ki-67</b>	GAG AAG AAC CTC TGC TCC CCA	TTT GCT GCA TTC TGT GCA CTG	73
<b>TNF-α</b>	TCT GGC CCA GGC AGT CAG ATC	TCA GCT TGA GGG TTT GCT ACA A	81
<b>Villin</b>	AGC CAG ATC ACT GCT GAG GT	TGG ACA GGT GTT CCT CCT TC	169
<b>β-Actin</b>	GCC AAC CGC GAG AAG ATG A	CAT CAC GAT GCC AGT GGT A	120
<b>GLP-2R</b>	ACC TTG GTG GAG TGA AGA GAG	CAT TCG GAG TCA TCC TGC CA	111
<b>SI (Sucrase-Isomaltase)</b>	TCA GAT GGC ACA GGG TTC TC	GTG CTT GTT AAG GTG GTC TGG	114
<b>hGCG</b>	GAG GAA GGC GAG ATT TCC CA	CCC TGG CGG CAA GAT TAT CA	117
<b>Lgr5</b>	TGC TGG CTG GTG TGG ATG CG	AGA ACC CAC GCT CCA GGG CT	159
<b>Sox9</b>	AAG CTC TGG AGA CTT CTG AAC G	CGT TCT TCA CCG ACT TCC TCC	133



**Tabelle 2: Verwendete Primer für die qRT-PCR-Analyse von murinen Genen**

<b>Gen</b>	<b>Sense-Primer (5'-3')</b>	<b>Antisense-Primer (3'-5')</b>	<b>Produktgröße (Bp)</b>
<b>m-β-Actin</b>	GCT GAG AGG GAA ATC GTG CGT G	CCA GGG AGG AAG AGG ATG CGG	100
<b>m-Lysozym</b>	GCC AAG GTC TAC AAT CGT TGT GAG TTG	CAG TCA GCC AGC TTG ACA CCA CG	88
<b>m-Crypt-1</b>	TCA AGA GGC TGC AAA GGA AGA GAA C	TGG TCT CCA TGT TCA GCG ACA GC	93
<b>m-Crypt-4</b>	GCT GTG TCT ATC TCC TTT GGA GGC	CGT ATT CCA CAA GTC CCA CGA AC	131
<b>m-Ki67</b>	CCT TTG CTG TCC CCG AAG A	GGC TTC TCA TCT GTT GCT TCC T	104
<b>m-Lgr5- ex12se/ ex14as</b>	GGC TTC TCA TCT GTT GCT TCC T	GCA TTG GGG TGA ATG ATA GCA	160
<b>m-GLP-2R</b>	CTG TCA GAG ATT TCT GCC TCC T	TCA GGA AGC ACT GTT GGC TC	131

## **2.1.6 Zell-Linien, Mausgewebeproben**

### **2.1.6.1 Herkunft der Zelllinien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Zytotoxizitätsexperimente folgende Zelllinien verwendet. Die Herkunft und Bezugsquellen der Zellen wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

- 1) A-549 Zellen: Diese Zellreihe stammt aus einem Adenokarzinom der Lunge eines 58-jährigen europäischen Amerikaners (Lieber et al., 1976).
- 2) Caco-2 Zellen: Diese Zellreihe stammt aus einem Adenokarzinom des Colons eines 72-jährigen Kaukasiers. Häufig differenzieren sich Caco-2 Zellen spontan zu Enterozyten. Der TC7-Subklon wurde von der paternalen Zelllinie isoliert und

zeichnet sich durch mehr Homogenität und Proliferation sowie spezifische Charakteristika hinsichtlich der Sucrase-Isomaltase Expression, Proliferation und Transportkapazität aus (Chantret et al., 1994, 1988; Fogh et al., 1977).

- 3) HepG2 Zellen: Diese Zellen wurden aus einem hepatozellulären Karzinom isoliert und stellen ein etabliertes in vitro Modell dar (Knowles et al,1980).
- 4) Hela Zellen: Es handelt sich hierbei um humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms einer afro-amerikanischen Patientin (Scherer et al.,1953). Die TLR-Expression dieser Zellreihe ist vergleichbar mit der TLR-Expression von intestinalen Epithelzellen (Nishimura and Naito, 2005).
- 5) HuCCT1 Zellen: Dies sind humane Epithelzellen eines Cholangiocellulären-Carzinoms (CCC), welche in Japan isoliert und in der Riken Zellbank in Japan etabliert wurden (Miyagiwa et al., 1989).

**Tabelle 3: Herkunft der Zelllinien und Bezugsquellenangaben**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Quelle</b>
A 549	Lungenkarzinomzellen	AG Bitzer. Quelle DSMZ
Caco-2 TC7	Colonkarzinomzellen	AG Wehkamp: Quelle: DSMZ
HeLa	Cervixkarzinomzellen	AG Bitzer: Quelle: MPI München
HepG2	Leberkarzinomzellen	AG Bitzer: Quelle DSMZ
HuCCT 1	Leber-Gallengangkarzinomzellen	AG Bitzer Quelle: Riken Zellbank, Japan

Zudem wurden die beiden Proteine Noggin und R-Spondin 1 verwendet, welche 2014 in unserer Arbeitsgruppe durch HEK 293T-Zellen hergestellt wurden. Diese wurden zur Herstellung des konditionierten Mediums verwendet, welches für die Kultivierung von Organoiden benötigt wurde.

Die Zelllinie wurde von Vanesa Dikistra-Muncan vom Academic Medical Center, Amsterdam (Hejmans et al.,2013) zur Verfügung gestellt. Das konditionierte Medium wurde bereits 2014 am Institut für klinische Pharmakologie in Stuttgart in größeren Mengen hergestellt und bei -20°C gelagert.

### **2.1.6.2 Mausegewebe zur Herstellung von Mausorganoiden**

Das für die murine Organoidkultivierung verwendete intestinale Gewebe stammt aus C57Bl/6 Mäusen, welche von der Arbeitsgruppe Prof. Zender (Medizinische Klinik, UKT) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Es handelte sich um männliche Mäuse im Alter von 8 Wochen.

### **2.1.7 Patientenkollektive und Patientenprobenmaterial**

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Patientengewebeproben wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Wehkamp zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Rahmen einer Studie seit 2001 am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart und seit August 2015 auch am Universitätsklinikum Tübingen gesammelt und aufgearbeitet. Ein Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor (Nr. 687/2012B01). Zudem etablierte die Arbeitsgruppe 2015 an der Universitätsklinik Tübingen ein Kurzdarmpatientenkollektiv, auf welches für die vorliegende Arbeit ebenfalls zurückgegriffen werden konnte. Das bestehende Ethikvotum wurde diesbezüglich ergänzt (Nr. 730/2015B02).

Für die Kultivierungsversuche humaner Organoide wurden Dünndarmresektate der Viszeralchirurgie der Universität Tübingen im Rahmen elektiver Eingriffe gewonnen und für die Versuche verwendet. Dies wurde durch das oben genannte Ethikvotum abgedeckt. Sämtliche Patienten und Kontrollpersonen haben eine Einverständniserklärung unterschrieben und wurden über die Durchführung, mögliche Risiken während der Probenentnahme sowie über die wissenschaftliche Verwendung der Gewebeproben aufgeklärt. Die Biopsieentnahme erfolgte während elektiver endoskopischer Untersuchungen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Gewebeproben von Morbus Crohn Patienten wurden gemäß der Lokalisation des intestinalen Befalls anhand der Montreal-Klassifikation in 3 Gruppen eingeteilt: L1 für MC Patienten mit nur Ileumbefall, L2 für MC Patienten mit nur Colonbefall und L3 für MC Patienten mit Ileum- und Colonbefall.

## 2.1.7.1 Das Patientenkollektiv aus Ileum- und Colonbiopsien von CED Patienten und Kontrollprobanden

Tabelle 4: Ileum-Biopsien, MC Patienten, Einteilung nach der Montreal-Klassifikation

Diagnose	Lokalisation und Inflammationsstatus	Anzahl n
Kontrollen		24
MC-Patienten	L1 entzündet	19
MC-Patienten	L1 nicht entzündet	10
MC-Patienten	L2 nicht entzündet	19
MC-Patienten	L3 entzündet	22
MC-Patienten	L3 nicht entzündet	7

Tabelle 5: Colon-Biopsien, MC Patienten, Einteilung nach der Montreal-Klassifikation

Diagnose	Lokalisation und Inflammationsstatus	Anzahl n
Kontrollen		25
MC-Patienten	L1 nicht entzündet	24
MC-Patienten	L2 nicht entzündet	4
MC-Patienten	L2 entzündet	16
MC-Patienten	L3 entzündet	18
MC-Patienten	L3 nicht entzündet	14

Tabelle 6: Ileum Biopsien, Colitis ulcerosa, Einteilung nach Inflammationsstatus

Diagnose	Lokalisation und Inflammationsstatus	Anzahl n
CU-Patienten	nicht entzündet	38

Tabelle 7: Colon Biopsien, Colitis ulcerosa, Einteilung nach Inflammationsstatus

Diagnose	Lokalisation und Inflammationsstatus	Anzahl n
CU-Patienten	entzündet	22
CU-Patienten	nicht entzündet	17

### 2.1.7.2 Kurzdarmsyndrom-Patientenkollektiv Tübingen, Ileum und Colonbiopsien

Für die vorliegende Arbeit wurden 14 Gewebeproben von Patienten mit Kurzdarmsyndrom, die mit Teduglutid behandelt wurden, durch das Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen unserer Studie zur Verfügung gestellt. Je nach anatomischen Gegebenheiten wurden im Rahmen von endoskopischen Kontrolluntersuchungen Colon- und/ oder Ileum- Biopsien entnommen. Von 7 Patienten wurden sowohl vor als auch während der Teduglutid Behandlung Biopsien entnommen. Hiervon konnte von allen 7 Patienten Ileum Biopsien und von 5 Patienten Colon Biopsien entnommen werden (dieselben Patienten, von denen auch Ileum Biopsien vor und während Teduglutid Gabe entnommen werden konnten). Die Nicht-Entnahme von Colon Biopsien bei 2 Patienten erfolgte gemäß Entscheidung des durchführenden Arztes. Bei 5 der 7 Patienten war Morbus Crohn die Grunderkrankung, die eine operative Darmresektion nach sich zog und bei 2 der 7 Patienten war eine operative Darmresektion aufgrund eines Mesenterialinfarkts notwendig.

Die durchschnittliche Einnahmedauer von Teduglutid zwischen dem Zeitpunkt der ersten Probeentnahme (vor Teduglutid Einnahme) und dem Zeitpunkt der zweiten Probeentnahme (während Teduglutid Einnahme) betrug 433 Tage (n=7). Die Einnahmedauer von Teduglutid des jeweiligen Patienten 1-7 bis zur zweiten Probeentnahme findet sich in nachfolgender Tabelle:

**Tabelle 8: Einnahmedauer von Teduglutid bei Patienten mit Koloskopie vor und während der Einnahme von Teduglutid**

Patient	Einnahmedauer Teduglutid in Tagen
1	369
2	160
3	390
4	425
5	387
6	767
7	534

**Tabelle 9: Ileum-Biopsien, Kurzdarmpatienten**

<b>Therapiezeitpunkt</b>	<b>Anzahl n</b>
Vor Teduglutid-Gabe	13
Während Teduglutid-Gabe	8

**Tabelle 10: Colon-Biopsien, Kurzdarmpatienten**

<b>Therapiezeitpunkt</b>	<b>Anzahl n</b>
Vor Teduglutid-Gabe	9
Während Teduglutid-Gabe	6

## **2.1.8 Software**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
Geneious 8.1	Biomatter Ltd., New Zealand
GraphPad Prism Version 9.2.0	GraphPad Software Inc, USA
Light Cycler Software release 1.5.0	Roche, Deutschland
XFluor 4	Tecan Group, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Primer Design**

Nach intensiver Literaturrecherche wurden für die vorliegende Arbeit spezifische Zielgene ausgewählt, die möglicherweise einem Einfluss durch Teduglutid unterliegen. Die entsprechenden Sequenzen dieser Zielgene wurden der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) entnommen. Mithilfe des Softwareprogramms Geneious 8.1 wurden anschließend spezifische Primer ausgewählt. Zur Vermeidung der Amplifikation von genomischer DNA wurden die Primer so ausgewählt, dass sie eine Exon-Intron-Grenze überspannen. Eine zusätzliche Kontrolle der ausgewählten Primer fand mittels Primer Blast in der NCBI-

Datenbank statt. Die Herstellung der Primer wurde anschließend von der Firma Biomers Deutschland durchgeführt. Die Sequenzen aller verwendeten Primer finden sich im Materialteil unter 2.1.5., Tabelle 1 und Tabelle 2.

### **2.2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten und Herstellung von Plasmiden**

Die Klonierung dient in der Molekularbiologie der Vermehrung von DNA-Fragmenten sowie der Herstellung von Plasmiden, die in der vorliegenden Arbeit als Referenzgrößen für die absolute Quantifizierung der Genexpressionsmessungen eingesetzt wurden. Hierzu werden die aufgereinigten PCR-Produkte in ein ringförmiges DNA-Molekül, Plasmid genannt, eingeschleust. Diesen Vorgang nennt man Ligation. Anschließend werden Bakterienzellen mit diesem Plasmid inkubiert, welche das Ligationsprodukt aufnehmen können (Mülhardt, 2013a).

#### **HotStar Taq Thermocycler PCR**

Um die DNA-Fragmente der ausgewählten Zielgene für spätere Genexpressionsmessungen einsetzen zu können, wurden diese mittels konventioneller PCR im Thermocycler amplifiziert. Für dieses Verfahren wird eine thermostabile HotStarTaq Polymerase, die zu amplifizierende DNA-Sequenz sowie die zwei entsprechenden Primer benötigt (Mülhardt, 2009). Alle weiteren Komponenten wie dNTPs,  $MgCl_2$ , Puffer und Wasser waren im HotStar-Taq Masterkit enthalten.

Gemäß Herstellerprotokoll zur Aktivierung der HotstarTaq Polymerase wird zunächst eine 15-minütige Inkubation bei  $95^\circ C$  durchgeführt. Anschließend werden pro Zyklus drei nacheinander ablaufende Schritte durchlaufen: Zuerst findet bei einer Temperatur von  $94^\circ C$  die Denaturierung der DNA-Doppelhelix in ihre beiden Einzelstränge statt. Danach sinkt die Temperatur auf die Annealingstufe von  $50-60^\circ C$  ab, sodass sich die Primer an die Einzelstränge anlagern können. Der finale Elongationsschritt findet bei  $72^\circ C$  statt. Hierbei wird ein neuer Doppelstrang gebildet, sodass sich die DNA-Menge je Zyklus in etwa verdoppelt. Insgesamt wird dieser Vorgang 45x wiederholt (Mülhardt, 2013b).

**Tabelle 11: Mastermix für die HotStar Taq-PCR**

Mastermix für 1 Probe	Menge (in µl)
Nuclease-freies Wasser	9
Q-Solution	5
PCR Buffer	2,5
dNTP 10 mM	1,25
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1
HotStarTaq DNA Polymerase	0,25
Primer for/ rev.	Je 1
cDNA-Template	4

**Tabelle 12: PCR-Programm Thermocycler (Eppendorf)**

Temperatur	Zeit (in Minuten)	Reaktionsschritt
95 °C	15	Aktivierung der HotstarTaq Polymerase
94 °C	1	} 45 Zyklen Denaturierung Annealing Elongation
56°C	1	
72 °C	1	
72 °C	15	Finale Elongation
4 °C	∞	Abkühlung und Ende

### Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität, Richtigkeit und Effizienz der HotStar Thermocycler-PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde aus Agarose NEE0 und 1xTAE-Puffer ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Dem Gel wurden noch 3 Tropfen 0,025% Ethidiumbromidlösung zugegeben, welches sich an DNA-Fragmente anlagert und unter UV-Licht fluoresziert. Die DNA-Banden können somit detektiert und mit einer Kamera fotografisch dokumentiert werden. Nach Vorbereitung der Elektrophoresekammern wurden 5µl der amplifizierten PCR-Produkte mit jeweils 2µl 6-fachem Xylencyanol-Ladungspuffer versetzt. Als DNA-Längenstandard wurde die DNA-Leiter von Invitrogen (2µl) inklusive Ladungspuffer mitgeführt. Alle Proben wurden für 1h bei 100V auf die Gelmatrix aufgetragen, wo sie



aufgrund ihrer negativen Ladung und Größe unterschiedlich weit in Richtung Pluspol wanderten. Durch das Mitführen eines Größenstandards (100bp Leiter), der DNA-Bruchstücke im Abstand von 100bp aufwies, konnte so die Größen der einzelnen PCR-Produkte bestimmt werden.

### **DNA-Aufreinigung**

Nach der Größenüberprüfung der PCR-Produkte im Agarosegel wurden die Proben mit der stärksten Bande mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Dazu wurden 20µl des PCR-Produkts mit 100µl PB Puffer im Eppendorfgefäß gemischt und auf die im Kit enthaltenen Spinsäulen aufgetragen. Diese enthalten eine Membran, an die die DNA bindet. Nach zwei Zentrifugations- und Reinigungsschritten mit PE Puffer wurden die PCR-Produkte anschließend in 30µl EB Puffer eluiert und konnten anschließend für die Klonierung eingesetzt werden.

### **Transformation der DNA**

Damit das DNA-Fragment mit einem Vektor ligiert werden kann, wird die sog. TA-Klonierung durchgeführt (Mülhardt, 2009). Hierfür wurde der pCR2.1®-TOPO® TA Vektor aus dem TOPO®-TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet. Gemäß Protokoll wurde das DNA-Fragment in eine spezifische Stelle des Vektors kloniert, wodurch das LacZ-Gen des Vektors inaktiviert wurde. Daraufhin wurde der Vektor in sog. OneShot® TOP10 E. coli via Hitzeschock übertragen, welche eine Ampicillin-Resistenz aufweisen. Die Blockade des Lac-Gen ermöglichte die Auswahl jener Bakterienkolonien, die erfolgreich mit dem DNA-Abschnitt kloniert wurden (Koenen et al., 1982; Mülhardt, 2009). Dazu wurde der Transformationsansatz auf LB Agarplatten ausplattiert, welche zusätzlich das Antibiotikum Ampicillin und den Farbstoff X-Gal enthalten. Zum einen konnten nur jene Bakterien wachsen, die eine Resistenz gegenüber Ampicillin aufwiesen, zum anderen färbten sich Kolonien mit aktivem LacZ-Gen blau, was bedeutete, dass diese das Plasmid nicht implementiert hatten. Jene Kolonien, die weiß blieben, enthielten folglich das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Abschnitt und konnten somit selektiert werden. Diese wurden in ein LB-Medium

gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Eine solche Auswahl der Kolonien anhand der Farbe wird auch Blau-Weiß-Selektion genannt.

Durchführung:

**Tabelle 13: Ligationsansatz nach Herstellerprotokoll**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen in µl</b>
PCR-Produkt	4
Salzlösung I	1
TOPO-Vektor	1

Der Ligationsansatz wurde vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wurden anschließend 2µl des Ligationsansatzes in ein Top10-Zelltube überführt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde der Ansatz 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, hierbei erfolgte die Aufnahme der DNA in das Bakterium. Im Anschluss wurden 250µl raumtemperiertes S.O.C.-Medium zugegeben und 1h im Wärmeschüttler bei 37°C inkubiert. Davon wurden dann 100µl der Bakteriensuspension zur Selektion auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden zuvor mit jeweils 40µl X-Gal Lösung für die Blau-Weiß-Selektion sowie mit 50µl Ampicillin beimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Am Folgetag konnte die Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden. Anschließend wurden von den einzelnen Platten jeweils 2-4 weiße Kolonien mit einer Impföse gepickt und in 5ml ampicillinhaltiges TSB-Medium überführt. Über Nacht wurden die Falcons bei 37°C bei halbgeöffnetem Deckel im Wärmeschüttler für ca. 16h inkubiert und am nächsten Morgen die bewachsenen Falcons 10 Minuten bei 4000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets konnten für die Präparation der Plasmide eingesetzt werden.

### **Präparation der Plasmide:**

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll. Die im Kit enthaltenen Spinsäulen sind mit einer Membran ausgestattet, an welche die DNA binden kann. Nach verschiedenen Wasch- und

Zentrifugationsschritten wurden die Plasmide mit 30µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch im Nanodrop bestimmt.

### **Restriktionsverdau:**

Der Restriktionsverdau mittels Restriktionsenzymen dient der Kontrolle, ob die Klonierung erfolgreich war.

Die Verdauung erfolgte mit dem Enzym EcoR1-HF<sup>®</sup>, das aus dem Bakterium E. coli isoliert wurde. Der Reaktionsansatz wurde durch den Cut Smart-Puffer ergänzt und für 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese mit dem Ladungspuffer Xylencyanol auf 1%igem Agarosegel für 80min bei 100V. Als Größenstandard wurde der 1kb plus-Ladder von Invitrogen sowie die 100bp DNA-Leiter mitgeführt.

Nach erfolgtem Restriktionsverdau und Gelelektrophorese wurden die Plasmide zur Firma GATC nach Konstanz verschickt, die eine Sequenzierung vornahm. Die ermittelten Sequenzen wurden dann mit Hilfe der Geneious-8.1 Software verglichen und konnten nach Übereinstimmung als Referenz für die quantitativen Genexpressionsmessungen verwendet werden.

**Tabelle 14: Herstellung von 20µl Mastermix für den Restriktionsverdau**

Bestandteil	Volumen
Plasmid-DNA	500ngl
EcoR1-HF <sup>®</sup>	1µl
Cut Smart Puffer	1µl
Nuklease-freies Wasser	18µl

### **2.2.1.3 RNA-Extraktion aus Gewebeproben**

Nach endoskopischer Entnahme der Dünn- und Dickdarmbiopsien wurden diese unmittelbar in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -196°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert. Die hier beschriebene RNA-Extraktion wurde nach der Single-Step Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt (Chomczynski and

Sacchi, 1987). Zur Durchführung wurde das Protokoll aus dem Direct-zol™ RNA MiniPrep-Kit von Zymo Research Corp. herangezogen.

Die Biopsien wurden mit Hilfe einer gekühlten Pistille und flüssigem Stickstoff im Eppendorfgefäß pulverisiert und mit 500µl Trizol-Reagenz homogenisiert. Dies hat zur Folge, dass das im Reagenz enthaltene Guanidiniumthiocyanat die RNAasen inaktiviert sowie DNA und Proteine auflöst. Zusätzlich werden durch das Phenol im Reagenz die RNA-Bestandteile gelöst (Farrell, 2017). Nach Zugabe von 500µl 100%igem Ethanol wurden die Proben zentrifugiert und über die im Kit enthaltenen Zymo-Spin-Säulen nach vorliegendem Herstellerprotokoll in verschiedenen Wasch- und Zentrifugierschritten aufbereitet. Zuletzt wurde die RNA mit Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.4 Analytik der RNA**

Die Bestimmung der Konzentration der aufgereinigten RNA wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 von Peqlab durchgeführt. Dies erfolgte anhand der Bestimmung der Absorption von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260nm. Dabei ist die Höhe der Absorption proportional zur Konzentration und Dicke der RNA-Probe (Strong, 1952). Eine Schlussfolgerung bezüglich der Reinheit der RNA lässt sich treffen, wenn die Absorptionswerte bei zwei verschiedenen Wellenlängen (260nm und 230nm bzw. 260nm und 280nm) in ein Verhältnis zueinander gesetzt werden. Eine zufriedenstellende Reinheit der RNA ist bei Werten von 1,8- 2,2 als gegeben (Mülhardt, 2009).

#### **2.2.1.5 cDNA-Synthese**

Die komplementäre DNA (cDNA) wird im Rahmen der quantitativen Genexpressionsmessung mittels qRT-PCR als Template benötigt. Für die Synthese der cDNA wird das Enzym Reverse Transkriptase eingesetzt.

Jeweils 500ng der gemessenen Gesamt-RNA wurden für die cDNA-Synthese verwendet. Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des iscript-cDNA-SynthesisKit von BioRAD durchgeführt.

Gemäß Herstellerprotokoll wurde je Probe ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20µl aus 4µl iscript-Reactionmix, 1µl iscript Reverse Transcriptase, X µl der

Gesamt-RNA (Volumen von der Konzentration abhängig) und Nuklease-freiem Wasser hergestellt.

Die Synthese der cDNA fand im Thermocycler wie nachfolgend dargestellt statt:

**Tabelle 15: Thermocycler Ablaufschritte**

Temperatur	Zeit (in Minuten)
25 °C	5
42 °C	30
85 °C	5

Schließlich wurde die cDNA für 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

Zuletzt wurde jede Probe mit Nuklease-freiem Wasser auf 50µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

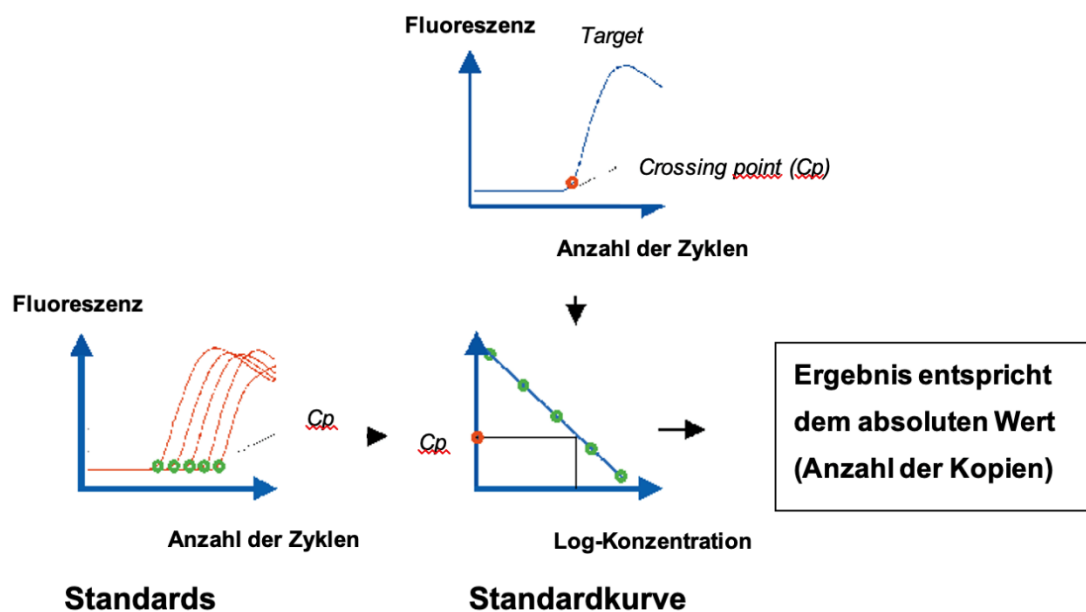
### **2.2.1.6 Quantitative real-time PCR**

Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde die mRNA-Expression der für die vorliegende Arbeit relevanten Zielgene in allen angegebenen Patienten- bzw. Versuchsproben mittels quantitativer real-time PCR im LightCycler 480® von ROCHE analysiert. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der Genexpression auf RNA-Ebene. Man nutzt hierbei die mathematische Tatsache, dass die Amplifikation der cDNA in der Zeit zwischen dem ersten und dritten Zyklus exponentiell verläuft (Mülhardt, 2009).

Die Quantifizierung erfolgt über den fluoreszierenden DNA-Farbstoff SYBR Green I von Roche, mit dem die PCR-Produkte detektiert werden können. Die Fluoreszenz durch die PCR-Produkte verhält sich dabei proportional zur Menge der vervielfältigten cDNA (Cardullo et al., 1988; Tyagi and Kramer, 1996). Das Erreichen des sog. „Crossing Point“ (Cp-Wert) kennzeichnet jene Zykluszahl, bei der sich die Fluoreszenz erstmals von der Hintergrundstrahlung abhebt und messbar wird (Mülhardt, 2009). Mit Hilfe der LightCycler-Software wird eine Kalkulation des Cp-Wertes automatisch durchgeführt. Die Höhe des Cp-Wertes korreliert dabei mit der Höhe der Ausgangskonzentration der zu messenden Proben. Bei jeder

Genexpressionsmessung wird eine definierte Menge DNA des entsprechenden Plasmidstandards mitgeführt, welche ebenfalls vervielfältigt wird. Die Herstellung dieser Verdünnungsreihe erfolgt in Zehnerpotenzen, ausgehend von einer Plasmidkonzentration von 1ng/μl, welche zuvor photometrisch bei 260nm Wellenlänge bestimmt wurde.

Verbindet man die Cp's der einzelnen Plasmidstandardverdünnungen, so erhält man eine Standardkurve in Abhängigkeit der logarithmischen Konzentration. Vergleicht man die Menge der PCR-Produkte des Standards mit der Menge der PCR-Produkte der zu untersuchenden Probe, so kann man eine zuvor unbekannte Konzentration daraus errechnen. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte dann mit dem Prism-Auswerteprogramm (s. Ergebnisteil).



**Abbildung 6: Absolute Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR**

Bezieht man den „Crossing-Point“ einer unbekannt Probe auf diejenigen einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen, so erhält man einen absoluten Wert für die gemessenen Probe (Abbildung zur Verfügung gestellt durch Roche, Mannheim).

**Tabelle 16: Genspezifische real-time PCR Programme für die durchgeführten Expressionsanalysen**

Zielgen	Denaturierung	Amplifikation	Schmelz- kurve
Lgr5 (human/ murin) Lysozym (murin) IL8 (human) β-actin (murin) Ki67 (human/ murin) TNF-α (human) GLP-2R (human/ murin) Sucrase-Isomaltase hGCG Sox9 (human)	96°C- 5 min	96°C- 10s 62°C – 5s 72°C- 10s	95°C- 1s 60°C- 15s 95°C- ∞
β-Actin (human)	95°C – 10min	95°C – 15s 60°C – 5s 72°C – 10s	95°C – 1s 65°C – 15s 95°C – ∞
HD5, HD6	95°C – 5min	95°C – 10s 66°C – 5s 72°C – 10s	95°C – 1s 65°C – 15s 95°C – ∞
IL10 (human)	96°C – 5min	96°C – 10s 60°C – 5s 72°C – 10s	95°C – 1s 58°C – 15s 95°C – ∞
Cryptidin-1 (murin) Cryptidin-2 (murin)	97°C – 5min	96°C – 10s 64°C – 5s 72°C – 10s	95°C – 1s 62°C – 15s 99°C – ∞
Villin (human)	96°C – 5min	95°C – 10s 60°C – 5s 72°C – 10s	95°C – 1s 65°C – 15s 95°C – ∞

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Etablierungsversuch von humanen Organoiden als ex vivo Zellmodell

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Wirkmechanismen von Teduglutid auf die Homöostase im Dünndarm untersucht. Ein direkter Effekt auf die verschiedenen Zelltypen im Dünndarm sollte vor allem mittels Zellkulturmethoden genauer analysiert werden. Da Dünndarmgewebe mit konventionellen Methoden schwer zu untersuchen ist, sollten unter anderem humane Organoide zum Einsatz kommen. Es handelt sich hierbei um eine Methode, welche es ermöglicht aus Dünndarmkrypten „Minidärme“ in Zellkultur zu züchten und für einen längeren

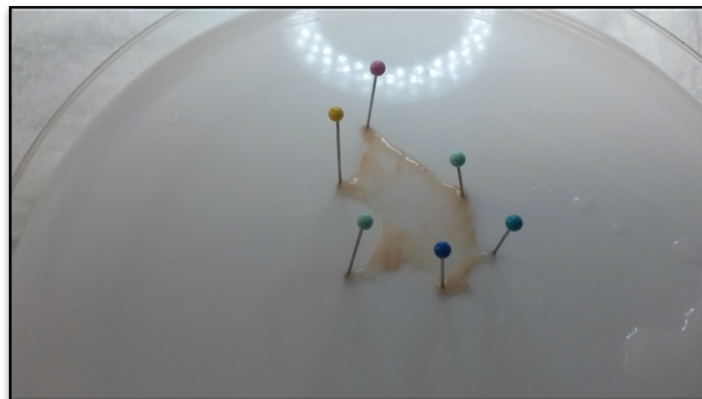
Zeitraum stabil zu halten. Der Vorteil dieser Zellkulturmethode ist, dass humane Organoide alle Zellen des humanen Dünndarmepithels abbilden (Date and Sato, 2015; Sato et al., 2009). Das Ziel war die Erforschung des direkten und langfristigen Einflusses von Teduglutid auf das Zusammenspiel der intestinalen Zellen (siehe Kapitel 1.6).

Zur Etablierung der Herstellung von humanen Organoiden wurde das Protokoll von Mahe et al. (Mahe et al., 2015) verwendet, in welchem erstmals die Anzucht humaner epithelialer Organoide aus Biopsien und Resektaten beschrieben wurde.

Für die Anzüchtung und Kultivierung der humanen Organoide wurde frisch entnommenes Darmgewebe aus der Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Tübingen verwendet. Eine entsprechende Aufklärung wurde im Vorfeld durchgeführt und der Versuch war durch das Ethikvotum genehmigt.

#### **Durchführung:**

Das Dünndarmgewebe wurde direkt nach Entnahme mehrmals in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, bis kein trüber Überstand mehr vorhanden war. Anschließend wurde das Darmresektat wie in Abbildung 7 dargestellt mit Hilfe von Nadeln auf eine PBS-gefüllte und mit Silikon-beschichtete Petrischale gespannt, sodass das Epithel nach oben gerichtet war.



**Abbildung 7: Isolation von Krypten aus einem Dünndarmresektat**

Das Resektat wird nach dem Waschvorgang mit der Epithelseite nach oben in der Silikon-beschichteten Petrischale aufgespannt.



Mit Hilfe eines Binokulars wurde dann mit einer Schere und einer Pinzette die Mukosa von der Submukosa getrennt. Die Submukosa wurde verworfen, die isolierte Mukosa nochmals mit Nadeln aufgespannt, die Villi mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig abgekratzt und anschließend mit eiskaltem Chelations Puffer 4x gewaschen, um die Villi zu entfernen. Anschließend wurde die Mukosa zusammen mit Chelations Puffer und 2mM EDTA für 30min bei 4°C geschüttelt. Nach der Inkubationsphase wurde erneut 4x mit dem Chelations Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Krypten mit einer gebogenen Pinzette von der Mukosa vorsichtig abgekratzt, in ein neues 50ml-Falcon-Gefäß überführt und die Krypten-Suspension über ein 150µm Maschennetz gefiltert. Die entstandene Krypten-Suspension wurde daraufhin 5 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das gewonnene Pellet wurde nochmals in 5ml eiskaltem Chelations Puffer resuspendiert und für 10min bei 2000rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit Matrigel gemischt, wobei die Suspension beim Mischen zum Erhalt der Viskosität auf Eis gehalten werden musste. Danach wurden je 30µl der Matrigel-Krypten-Suspension in die vorgewärmten Wells gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Festwerden der Matrigel-Krypten-Suspension konnte diese mit 500µl complete human minigut medium überschichtet werden, welches alle 48h gewechselt werden musste.

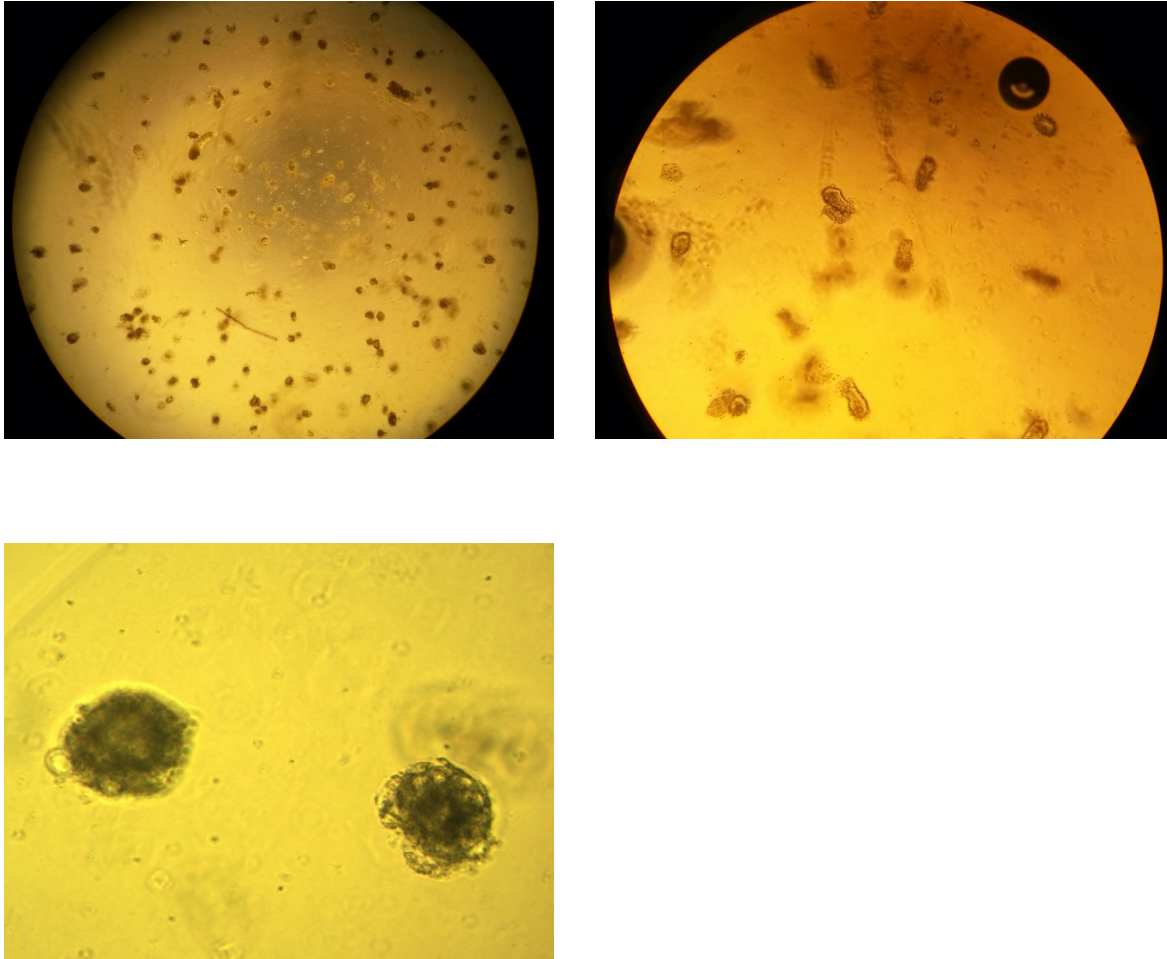
### **Passage und Splitten der Organoide:**

Sobald die Krypten nach etwa 7-10 Tagen Ausläufer gebildet hatten, wurden die entstandenen Organoide gesplittet.

### **Durchführung:**

Das aufgebrauchte Medium wurde vorsichtig abgesaugt und das Matrigel-Organoid-Gemisch in je 1ml kaltem PBS-Puffer gelöst. Dieses wurde zusammen mit 2ml human minigut medium + 5% FCS für 5 Minuten bei 200rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml cell dissociation enzyme (TrypLE Express Enzyme) + 2µl Y-27632 gelöst. Die Organoide wurden anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgebrochen, um Zellverklumpungen zu vermeiden. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 500rpm.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit je 30µl eiskaltem Matrigel pro auszuplattierendem Well gemischt und in die Wells pipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Matrigel mit complete human minigut medium überschichtet.



**Abbildung 8: Kultivierung von humanen Organoiden aus Darmresektaten**

Oben links: Tag 1 nach Isolierung der Krypten aus einem Dünndarmresektat, 10-fache Vergrößerung

Oben rechts: Tag 3 der Organoid-Kultur, 20-fache Vergrößerung

Unten links: Tag 7 der Organoid-Kultur, 40-fache Vergrößerung

Die initial geplanten Stimulationsversuche mit humanen Organoiden konnten nicht abschließend durchgeführt werden. Trotz mehrfacher Kultivierung und Passage von insgesamt vier Gewebepräparaten zeigte sich auch nach Anpassung diverser Stimulationsfaktoren und Medien kein Erfolg hinsichtlich der Anzucht humaner Organoiden. Daher wurde zeitnah mit der Kultivierung von murinen Organoiden begonnen. Diese Methode war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert.

### **2.2.2.2 Kultivierung von murinen Organoiden aus frischem Dünndarmgewebe**

Die Isolierung der Krypten sowie die Kultivierung von Mausorganoiden erfolgte nach dem Protokoll von Prof. G. van den Brink aus Amsterdam. Die zur Herstellung verwendeten murinen Dünndärme stammten von 8 Wochen alten Mäusen vom Typ C56/BL6, welche freundlicherweise von Prof. L. Zender von der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt wurden.

#### **Durchführung:**

Das Ileum der für diesen Versuch getöteten Mäuse wurde herauspräpariert und mit eiskaltem PBS-Puffer mehrmals gespült. Anschließend wurde das Ileum in einer Petrischale der Länge nach aufgeschnitten und die Villi vorsichtig mit Hilfe eines Deckglases abgelöst, sodass die intestinalen Krypten nicht verletzt wurden. Daraufhin wurde das Gewebe nochmals mit PBS gespült, in ca. 3mm große Stücke geschnitten und zusammen mit 10ml eiskaltem PBS-Puffer in einen Falcon gegeben, in welchem die Suspension mit einer 25ml Stripette gemischt wurde. Nach Absinken der Gewebestücke konnte der Überstand verworfen werden. Dieses Procedere wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar war. Anschließend wurden 25ml 2mM EDTA/PBS zugegeben und die Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das ENR-Medium zur Kultivierung der Mausorganoiden hergestellt und bei 37°C vorgewärmt. Darin sind neben Ad-DF<sup>\*\*\*</sup> Wachstumsfaktoren wie Noggin, EGF und R-Spondin enthalten. Nach der Inkubation wurde der Überstand abpipettiert, in 10ml eiskaltem PBS+ 10% FCS suspendiert und mit der Stripette mehrmals gemischt. Nach Verwerfen des ersten Überstandes wurde der vorige Schritt 3x wiederholt mit dem Unterschied, dass der Überstand nach Durchlaufen eines 70µm Filters in einem frischen Falcon gesammelt und anschließend bei 800rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10ml Ad-DF<sup>\*\*\*</sup> Medium resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet auf Eis gestellt. Nun wurde Matrigel vorsichtig auf das Pellet gegeben und gemischt, wobei die Suspension beim Mischen zum Erhalt der Viskosität auf Eis gehalten werden musste. Danach wurden je 30µl der Matrigel-Krypten-Suspension in die vorgewärmten Wells gegeben und für ca. 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach

festwerden der Matrigel-Krypten-Suspension wurden pro Well 300µl ENR-Medium zugegeben, das alle 48h gewechselt werden musste.

### **Passage und Splitten der Mausorganoide:**

Sobald die Krypten nach etwa 7-10 Tagen Ausläufer gebildet hatten, wurden die entstandenen Organoide gesplittet.

### **Durchführung:**

Das aufgebrauchte Medium aus 3-4 Wells wurde vorsichtig abgesaugt und das Matrigel-Organoid-Gemisch mit je 1ml kaltem Ad-DF\*\*\*-Medium gemischt. Die Organoide wurden daraufhin aufgebrochen, indem die Suspension mittels einer schmalen Pipette mehrfach vor- und zurück-pipettiert wurde. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit je 30µl eiskaltem Matrigel pro auszuplattierendem Well gemischt und in die Wells pipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Matrigel fest und konnte mit Medium überschichtet werden.

### **Stimulation von murinen Organoiden mit Teduglutid**

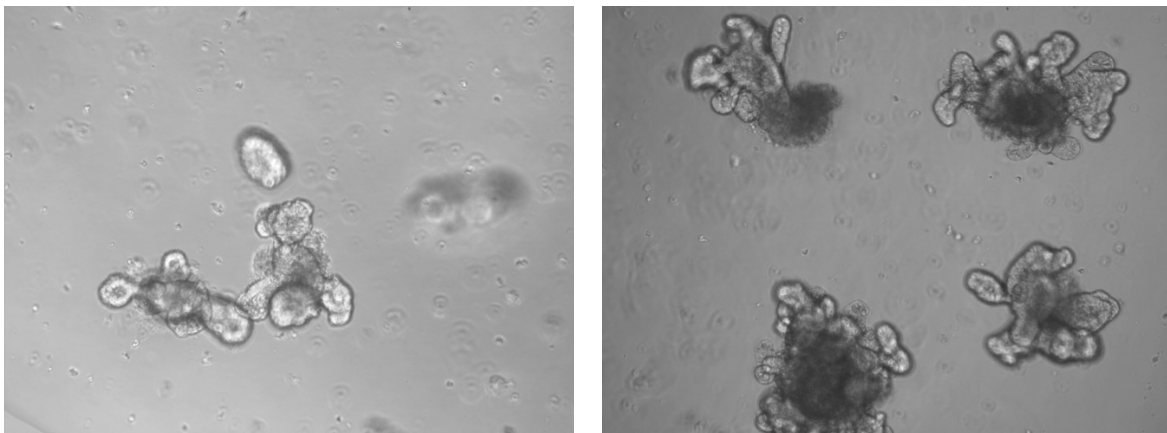
Mit diesen Versuchen wurde der Einfluss von Teduglutid auf murine Organoide untersucht, indem diese mit dem GLP-2 Analogon Teduglutid über 48h und 72h stimuliert wurden. Nach RNA-Aufarbeitung und cDNA-Synthese konnten anschließend mittels qRT-PCR die Expression bestimmter Markergene einzelner Zelltypen gemessen werden.

### **Durchführung:**

Die Stimulationsversuche mit Teduglutid konnten nach dem ersten Splitten der murinen Organoide durchgeführt werden. Vor Zugabe des ENR-Mediums wurden diesem die berechnete Menge Teduglutid bzw. Kontrollreagenz zugegeben. In dem Versuchsansatz verwendeten wir für die Stimulation der Organoide 2000nM sowie 250nM Konzentrationen von Teduglutid. Die Stimulationsdauer betrug 48h und 72h. Während eines Versuchs wurde das Medium sowie die Teduglutid- bzw.

Kontrollreagenzkonzentration alle 24h gewechselt. Für die RNA-Isolierung wurden jeweils Organoide aus maximal 4 Wells gepoolt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Durchführung beim Splitten. Das Pellet wurde mit TRIzol resuspendiert. Zur anschließenden RNA-Aufarbeitung wurde das Protokoll aus dem Direct-zol™ RNA MiniPrep-Kit von Zymo Research Corp. herangezogen (siehe 2.2.1.1).

Die nachfolgende cDNA-Synthese erfolgte mittels iScript™ cDNA synthesis kit von Bio-RAD wie unter 2.2.1.3 beschrieben.



**Abbildung 9: Kultivierung von murinen Organoiden**

Links: Tag 2 nach dem Splitten der murinen Organoid-Kultur, 40-fache Vergrößerung

Rechts: Tag 5 nach dem Splitten der murinen Organoid-Kultur, 40-fache Vergrößerung

### 2.2.2.3 Zellkultur

#### Allgemeine Kulturbedingungen

Für die durchgeführten Zytotoxizitätsassays wurden die Zelllinien HepG2, HuCCT1, Caco-2 TC7, A549 und HeLa ausgewählt. Mit Ausnahme der Caco-2 TC7 Zelllinie waren alle weiteren Zelllinien bereits in Kultur gehalten und wurden von der AG Prof. Bitzer vom Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Caco-2 TC7 Zelllinie war durch unsere Arbeitsgruppe bereits in Kultur gehalten.

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in T75-Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70% fand eine etwa 20-fache Verdünnung durch Passage der Zellkultur statt. Dies wurde durchschnittlich alle 3-4 Tage durchgeführt. Die

verschiedenen Zelllinien wurden bis auf die entsprechenden Medien gleichermaßen behandelt und für maximal 40 Passagen verwendet.

### **Durchführung der Passage und Kultivierung**

Vor der Passage wurden die Medien der einzelnen Zellreihen im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellkulturflasche vorsichtig mit 10ml DPBS gewaschen. Danach wurden 2- 3ml Trypsin auf die adhärenen Zellen gegeben und bei 37°C für 2-3 Minuten inkubiert, sodass der Zellrasen sich vom Boden der Zellkulturflasche löste. Nach Zugabe von 7ml Zellkulturmedium wurden die gelösten Zellen mehrmals resuspendiert und in ein 50ml Falcon überführt. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5ml Zellkulturmedium resuspendiert. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl bestimmt und somit die Zellen im Verhältnis 1:10 in die neuen Zellkulturflaschen ausplattiert werden. Für den SRB-Zytotoxizitätsassay wurde jeweils eine definierte Anzahl an Zellen verwendet. Zuletzt wurden die Zellen in den gewünschten Konzentrationen in Wells einer 48-Wellplatte ausgesät und mit Medium versetzt.

#### **2.2.2.4 SRB-Zytotoxizitätsassay**

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Teduglutid auf die oben genannten Zelllinien wurde der Sulforhodamin B-Test nach Skehan et al. (Skehan et al., 1990) durchgeführt. Der Sulforhodamin B-Test basiert auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Dabei verhält sich die Konzentration des aufgenommenen Farbstoffs proportional zur Anzahl der Zellen pro Well. Hierfür wurden die entsprechenden Zellzahlen wie in Tabelle 20 aufgeführt auf 12-Wellplatten ausplattiert und nach 24h mit den Testsubstanzen Teduglutid, EGF, GLP-2 und dem Kontrollreagenz behandelt. Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen sind der Tabelle 21 zu entnehmen. Die Inkubation der Zellreihen fand über einen Zeitraum von 48h und 72h statt. Nach der Behandlung wurde das Zellkulturmedium entfernt, mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und die adhärenen Zellen anschließend mit Trichloressigsäure über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend ca. 15

Minuten mit 0,5% Sulforhodamine B in 1% Essigsäure bei Raumtemperatur gefärbt. Daraufhin wurde die Well-Platte mit 1%iger Essigsäure gewaschen und schließlich für zwei Stunden getrocknet. Der Farbstoff wurde mit 10mM Tris-base (Trisaminomethan) im basischen pH-Bereich extrahiert und gelöst, sodass die anschließende quantitative Messung im Tecan-Reader bei einer Wellenlänge von 550nm durchgeführt werden konnte.

**Tabelle 17: Zelllinien und Zellaussaatmenge für den SRB-Test**

Zelllinie	Zellaussaatmenge pro Well
HepG2	20.000
Caco-2 TC7	10.000
A549	10.000
HUCCT	20.000
HeLa	6.000

**Tabelle 18: Testsubstanzen und Konzentrationen für SRB-Test**

Testsubstanz	Konzentrationen pro Well in nM/l		
Teduglutid	250	1000	2500
EGF	400	800	1600
GLP-2	20		
Kontrollreagenz	2000		

**Tabelle 19: Komponenten des gelieferten Teduglutid für die Stimulationsversuche,**

Konzentrationen bezogen auf Stocklösung mit 50µM

Bestandteil	Konzentration in mmol/l
Teduglutid (Wirkstoff)	0,05
L-Histidin	0,93
Mannitol	3,09
Natriumphosphat monohydrat monobasisch	0,17
Natriumphosphat heptahydrat dibasisch	0,48

**Tabelle 20: Komponenten des Kontrollreagenzes für die Stimulationsversuche**

Konzentrationen bezogen auf Stocklösung mit 50µM

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration in mmol/l</b>
L-Histidin	0,93
Mannitol	3,09
Natriumphosphat monohydrat monobasisch	0,17
Natriumphosphat heptahydrat dibasisch	0,48

## **2.2.3 Proteinmethoden**

### **2.2.3.1 Immunhistochemische Einfachfärbung**

Zur Lokalisation des GLP-2 Rezeptors im Darmgewebe wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, wodurch spezifische Zellproteine durch Antikörper sichtbar gemacht werden können (Chen et al., 2010). Hierfür wurden die Ileum- und Colonbiopsien über Nacht in 4,5%iger Formaldehydlösung fixiert, in Paraffin eingebettet und schließlich in 3µm dicke Scheiben geschnitten. Die anschließende Färbung erfolgte auf Basis der EnVision™-Technik nach dem Protokoll von Dako. Zu Beginn wurden die Schnitte mittels Neo-Clear vom Paraffin gelöst und anschließend mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe behandelt. Es folgte eine 30-minütige Behandlung der Biopsien im Dampfgarer in Target Retrieval Solution bei einem pH von 6 (S1699, 1:10) um die Immunreaktivität der Biopsien wiederherzustellen. Anschließend wurde mehrmals mit dem TBS-T-Puffer gewaschen, bevor mit Hilfe der Blocking Solution (S2023) die Inhibierung der endogenen Peroxidase stattfand. Dies hat zur Folge, dass unspezifische Enzymreaktionen unterbunden werden und keine artifiziellen Färbungen auftreten (Chen et al., 2010). Der Primärantikörper wurde nun in einer Verdünnung von 1:5000 zusammen mit Antikörper Diluent auf das Gewebe gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Biopsien nach mehrmaligem Waschen mit dem Sekundärantikörper und dem Komplexsystem aus Dextran und Peroxidase für 30 Minuten versetzt. Der Sekundärantikörper ist mit einer horse reddish peroxidase (HRP) konjugiert, wodurch dieser durch das DAB-Detektkit sichtbar gemacht werden kann. Die HRP zersetzt das im DAB-Detektkit enthaltene Diaminobenzidin enzymatisch und führt zu einer Färbung am



Ort des gebundenen Primär- und Sekundärantikörpers. Schließlich wurden die Zellkerne für 30 Sekunden mit Hämatoxylin 1:4 gegengefärbt und die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe sowie Neo-Clear gewaschen und entwässert. Zur Validierung der Färbungen wurde parallel eine Ileum-Biopsie-Negativkontrolle ohne Antikörperinkubation sowie eine Ileum-Biopsie-Positivkontrolle mit Ki67 und DEFA5 (1:5000) angefertigt.

### **2.2.3.2 Immunhistochemische Doppelfärbung**

Zur Bestimmung des möglichen Zelltyps, welcher den GLP-2R im GI-Trakt exprimiert, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung mit freundlicher Unterstützung vom Labor Prof. Dr. Cipros durchgeführt, in welchem die Methode bereits etabliert war. Zur Darstellung zweier unterschiedlicher Zellproteine sind zwei entsprechende Antikörper erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper gegen den GLP-2R von Sigma Aldrich sowie ein Antikörper gegen Synaptophysin von DCS verwendet. Letzterer wird in den neuroendokrinen Zellen, unter anderem im Gastrointestinaltrakt, exprimiert (Kolos et al., 2015; Wiedenmann et al., 1986a) und stellt für diesen Zelltyp einen spezifischen Marker dar. Die Biopsien wurden wie unter 2.2.3 beschrieben vom Paraffin gelöst und mit einer absteigenden Alkoholreihe behandelt. Nach einem Dampfgarschritt für 5 Minuten in Citratlösung wurden die Schnitte abgekühlt und mehrmals mit TBS-T Puffer gewaschen. Die Inhibierung der endogenen Peroxidase erfolgte mit Zytomed Block Solution für 5 Minuten, woraufhin der Primärantikörper GLP-2R zusammen mit Zytomed Diluent mit einer Verdünnung von 1:5 auf das Gewebe aufgetragen und über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde das Gewebe nach mehrmaligem Waschen mit dem Sekundärantikörper Fab-Cy3 mit einer Verdünnung von 1:100 von Jackson-Dianova für 60 Minuten versetzt, anschließend erneut gewaschen und das Präparat mit Zytomed Block Solution für 30 Minuten behandelt. Nun wurde der Primärantikörper Synaptophysin mit einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Wie schon oben beschrieben erfolgte am nächsten Morgen nach mehrmaligem Waschen die 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa 488 mit einer Verdünnung von 1:5. Zuletzt wurden die Zellkerne für 10 Minuten mit DAPI (Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt und die Schnitte dann in Dako Fluorescence Mounting Medium S3023 wässrig eingedeckt und über Nacht bei 4°C getrocknet.

## 2.2.4 Statistische Methoden

Um die gemessenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen ermitteln zu können wurde die Software GraphPad Prism verwendet. Im ersten Schritt wurde festgestellt, ob eine Gaußsche Normalverteilung vorliegt. Wenn dies der Fall war, so wurde der unpaired t-test bei Vergleich zweier Gruppen bzw. der one way ANOVA-Test bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde entweder der Mann-Whitney-Test bei Vergleich zweier Gruppen oder der Kruskal-Wallis-Test bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen eingesetzt. Um die unterschiedlichen Signifikanzwerte darzustellen, wurden folgende Sternchendarstellungen verwendet:  $p > 0,05 = \text{ns}$  (nicht signifikant);  $p \leq 0,01 = *$ ;  $p \leq 0,001 = **$ ;  $p \leq 0,0001 = **$ .

Die statistischen Auswertungen wurden dankenswerterweise von Frau Dr. Sterna vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie unter der Leitung von Prof. Martus überprüft und diskutiert.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Untersuchungen zur Lokalisation und Quantifizierung von Enzym-, Rezeptor- und Hormongenen im gesunden und erkrankten humanen Darmtrakt**

In dem vorliegenden Kapitel wurden endoskopisch gewonnene Gewebeproben aus der Schleimhaut von Ileum und Colon mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) auf die Expression von unterschiedlichen Zielgenen untersucht. Die hierfür verwendeten Gewebeproben stammen aus dem Patientenkollektiv wie unter 2.1.7.1 beschrieben. Zum einen wurde die Genexpression der Sucrase-Isomaltase und zum anderen die Expression zweier Gene, die für das Hormon GLP-2 und dessen Zielrezeptor GLP-2R codieren, untersucht.

Die Sucrase-Isomaltase dient als Enterozytenmarker, welcher in erster Linie im Bürstensaum des Dünndarms sowie vereinzelt im Dickdarm vorkommt, siehe hierzu Kapitel 1.5.2 (Gorvel et al., 1991). Dabei konnten die Expressionslevel in Biopsien von Morbus Crohn Patienten, Colitis ulcerosa Patienten sowie gesunden Probanden miteinander verglichen werden. Die Gruppe der Morbus Crohn Patienten wurde zudem nach Befallslokalisierung (L1= Ileumbefall, L2= Colonbefall, L3= Ileum- und Colonbefall), Entzündungsaktivität (entzündet und nicht-entzündet) sowie Entnahmeort der Biopsien (Ileum und Colon) aufgeteilt. Die Gruppe der Colitis ulcerosa Patienten wurde nach Entzündungsaktivität (entzündet und nicht-entzündet) und Entnahmeort der Biopsien (Ileum und Colon) aufgeteilt. Die unterschiedlichen Gruppen wurden in Bezug auf die Expression der untersuchten Gene untereinander verglichen. Dies soll Erkenntnisse über die unterschiedlichen Expressionslevel der untersuchten Gene in Gewebe gesunder Probanden sowie in Gewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liefern, um Rückschlüsse auf ein mögliches Ansprechen von Teduglutid bei diesen Patienten gewinnen zu können. Die Expression der Zielgene ist in 10ng/µl RNA angegeben.

Bei erstmaliger Quantifizierung des GLP-2 Rezeptors im Gastrointestinaltrakt erfolgte die weiterführende Detektion mittels Immunhistochemie sowie

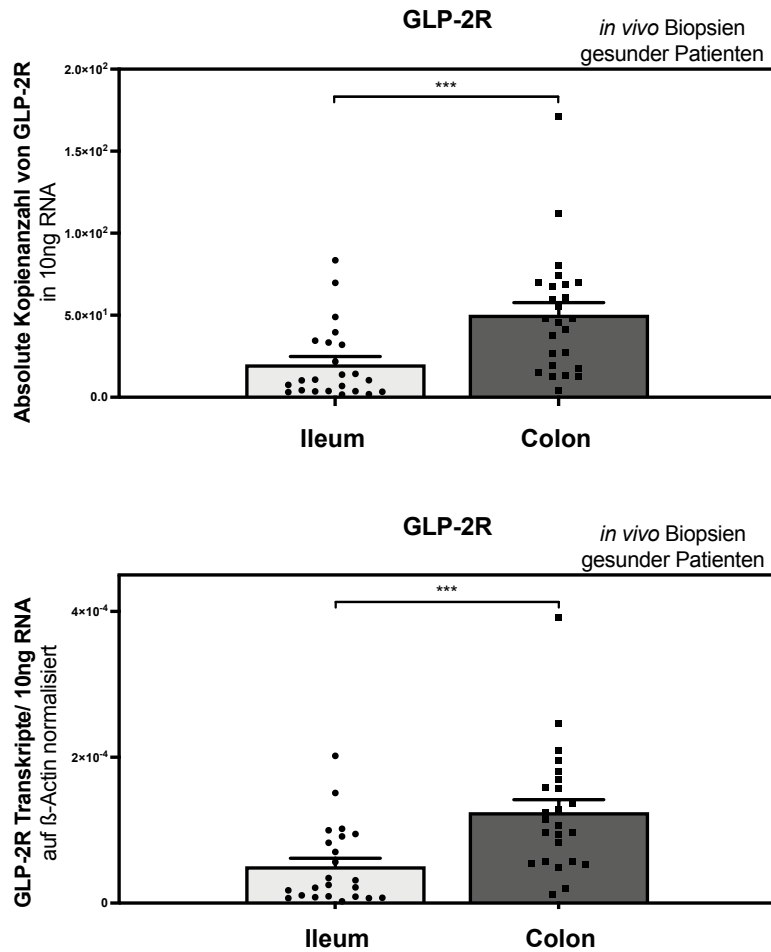
Fluoreszenzmikroskopie. Ziel hierbei war es, die Lokalisation und das Verteilungsmuster des GLP-2R auf Protein- und molekularbiologischer Ebene zu beweisen. Als zu untersuchendes Gewebe diente endoskopisch gewonnenes Dün- und Dickdarmgewebe gesunder Probanden.

### **3.1.1 Signifikante Unterschiede der Expression von GLP-2R, hGCG und Sucrase-Isomaltase im Dün- und Dickdarm gesunder Probanden**

In den Abbildungen 10, 11 und 12 sind jeweils die absoluten Kopienanzahlen (oben) und die auf das Housekeeping Gen  $\beta$ -Actin normierten Transkripte (unten) für den GLP-2 Rezeptor (Abb. 10), das humane Proglukagon hGCG als Vorläufermolekül des GLP-2 (Abb. 11) und die Sucrase-Isomaltase (Abb. 12) dargestellt. Hierfür wurden jeweils 23 Biopsien aus dem Dünndarm gesunder Probanden sowie 25 Biopsien aus dem Dickdarm gesunder Probanden untersucht.

Wie in Abbildung 10 nachfolgend dargestellt zeigten sich sowohl für die absolute Kopienanzahl ( $p=0,0002$ ) als auch die auf  $\beta$ -Actin normierte Expression ( $p=0,0002$ ) signifikant erhöhte Expressionslevel des GLP-2R im Dickdarm im Vergleich zum Dünndarm. Die gewonnenen Daten stimmen mit der bisher einzigen in der Literatur beschriebenen Quantifizierung des GLP-2R in humanem Dün- und Dickdarmgewebe überein (El-Jamal et al., 2014a).

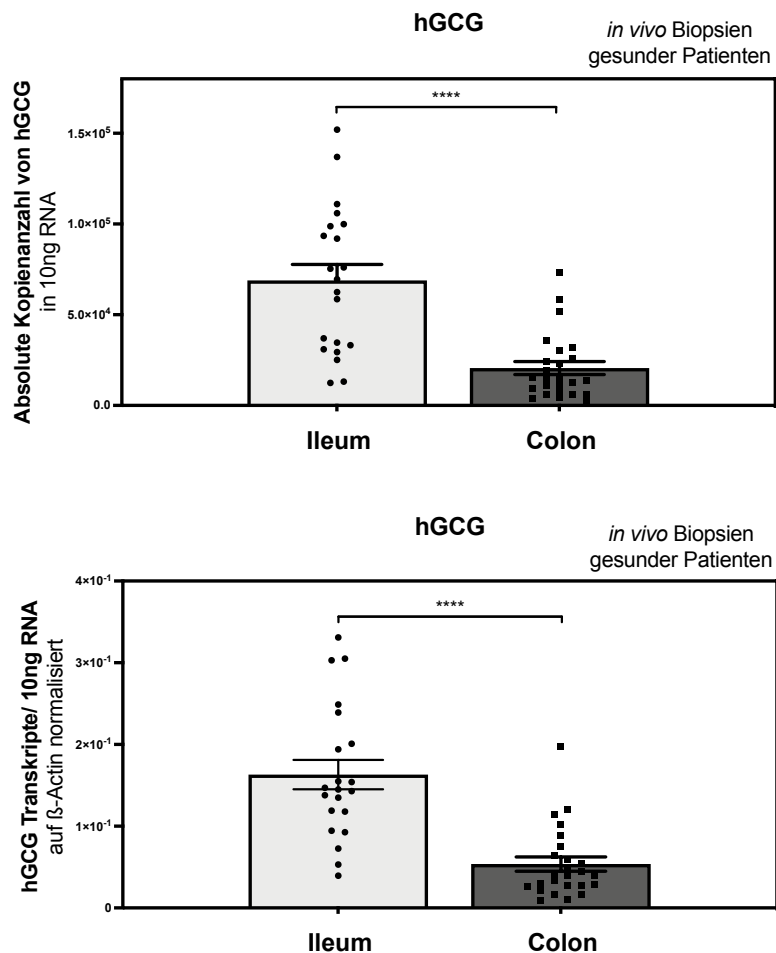
Ab Kapitel 3.1.2.1 wurden die Proben der gesunden Probanden als Kontrollgruppe verwendet.



**Abbildung 10: Expressionslevel des GLP-2R in Ileum und Colon in gesundem Darmgewebe**

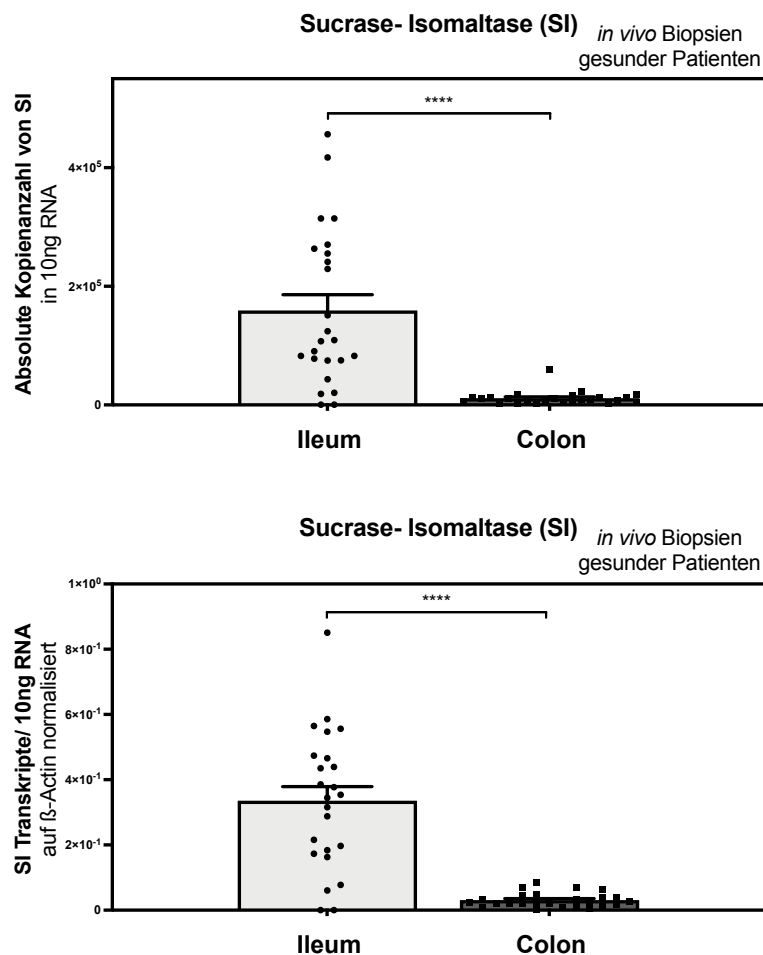
Dargestellt sind jeweils die absoluten Kopienanzahlen in 10ng RNA (oben) sowie die auf das Housekeeping Gen  $\beta$ -Actin normierten (unten) Transkriptionslevel des GLP-2R in Ileum und Colon, welche mittels qRT-PCR-Analyse gemessen wurden. Die endoskopisch gewonnenen Ileum-Gewebeprobe(n) (n=23) und Colon-Gewebeprobe(n) (n=25) stammen von gesunden Probanden. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; Unpaired t-test).

Die Expressionsanalyse des humanen Proglukagons (hGCG), welches durch das Proglukagon-Gen codiert ist, ergab sowohl für die absolute Kopienanzahl ( $p < 0,0001$ ) als auch für die auf  $\beta$ -Actin normierte Expression des hGCGs ( $p < 0,0001$ ) eine signifikant erniedrigte Genexpression im Dickdarm im Vergleich zum Dünndarm wie Abbildung 11 zu entnehmen ist.



**Abbildung 11: Expressionslevel des Proglukagons (hGCG) in Ileum und Colon in gesundem Darmgewebe**  
 Dargestellt sind jeweils die absoluten Kopienanzahlen in 10ng RNA (oben) sowie die auf das Housekeeping Gen  $\beta$ -Actin normierten (unten) Transkriptionslevel von hGCG in Ileum und Colon, welche mittels qRT-PCR-Analyse gemessen wurden. Die endoskopisch gewonnenen Ileum-Gewebeproben ( $n=23$ ) und Colon-Gewebeproben ( $n=25$ ) stammen von gesunden Probanden. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; Unpaired t-test).

Hinsichtlich der analysierten Expression der im Bürstensaum vorkommenden Disaccharidase Sucrase-Isomaltase ließ sich wie bereits in der Literatur vorbeschrieben eine signifikant erhöhte Expression im Dünndarmtrakt im Vergleich zum Dickdarmtrakt darstellen (siehe Abb. 12). Dies ließ sich sowohl in der absoluten Kopienzahl als auch in der normierten Genexpression nachweisen (jeweils  $p < 0,0001$ ).

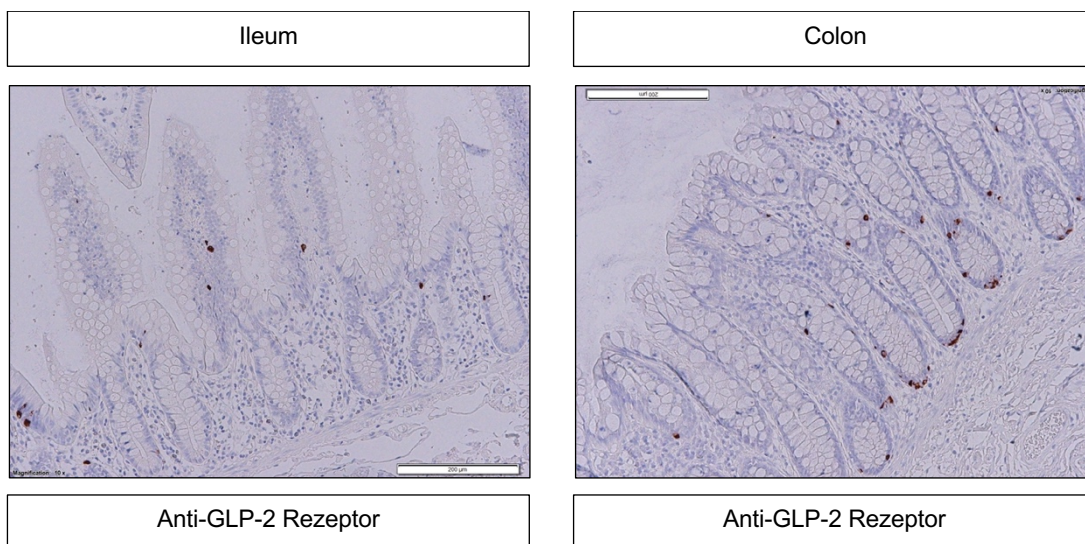


**Abbildung 12: Expressionslevel der Sucrase-Isomaltase (SI) in Ileum und Colon in gesundem Darmgewebe**

Dargestellt sind jeweils die absoluten Kopienanzahlen in 10ng RNA (oben) sowie die auf das Housekeeping Gen  $\beta$ -Actin normierten (runten) Transkriptionslevel der Sucrase-Isomaltase in Ileum und Colon, welche mittels qRT-PCR-Analyse gemessen wurden. Die endoskopisch gewonnenen Ileum-Gewebeprobe(n) (n=23) und Colon-Gewebeprobe(n) (n=25) stammen von gesunden Probanden. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; Unpaired t-test).

### 3.1.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des Verteilungsmusters und der Lokalisation des GLP-2 Rezeptors innerhalb des Darmepithels

Um die erhöhte Expression des GLP-2 Rezeptors im Dickdarm wie in Abbildung 10 dargestellt auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit Anti-GLP-2 Rezeptor durchgeführt. Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigten sich im Ileum nur vereinzelt Zellen im Bereich der Zotten auf mittlerer Höhe für den GLP-2R anfärbbar. Im Vergleich hierzu ließen sich deutlich mehr Zellen im Dickdarmgewebe mit Anti-GLP-2 Rezeptor anfärben. Die spezifischen Färbungen konnten vorwiegend im Bereich der basalen Krypten lokalisiert werden. Eine definitive Aussage hinsichtlich des angefärbten Zelltyps ließ sich hieraus nicht abschließend treffen. Hiermit konnten die unter 3.1.1 beobachteten Ergebnisse jedoch insgesamt bestätigt werden.



**Abbildung 13: Mikroskopische Darstellung von Ileum- und Colongewebe nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-GLP-2 Rezeptor**

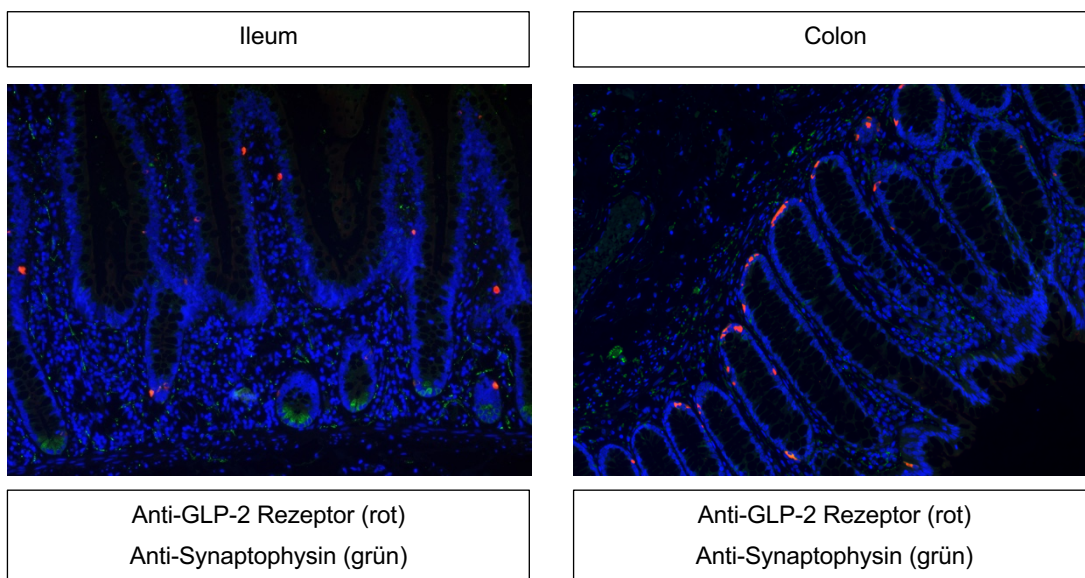
In der vorliegenden Abbildung wurde Ileum- und Colongewebe von gesunden Probanden mit dem Anti-GLP-2 Rezeptor in einer Verdünnung von 1:50 bei einem pH von 6 gefärbt.

### 3.1.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation des GLP-2 Rezeptors im Dünn- und Dickdarm

Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeigte auch die Immunfluoreszenz mit Anti-GLP-2 Rezeptor ein mit der durchgeführten Immunhistochemie (Abbildung 13) vergleichbares Bild. Eine spezifische Immunfluoreszenz ließ sich im Bereich der basalen Krypten des



Colons feststellen, wohingegen im Ileum nur vereinzelt Zellen im Bereich der Zotten anfärbbar waren. Yusta et al. vermuteten die Expression des GLP-2 Rezeptors in den Enteroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts (Yusta et al., 2000). Um dies zu untersuchen, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz von Anti-GLP-2 Rezeptor und Anti-Synaptophysin durchgeführt. Synaptophysin diente hierbei als spezifischer Marker für neuroendokrine Zellen (Wiedenmann et al., 1986b). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten im Dünn- und Dickdarm keine Übereinstimmung der neuroendokrinen Zellreihe (grün) mit jener Zellreihe, die den GLP-2 Rezeptor (rot) exprimierte. Dies konnte auch nach wiederholter Durchführung der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden.



**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Ileum- und Colongewebe nach Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-GLP-2 Rezeptor und Anti-Synaptophysin**

Die vorliegende Abbildung zeigt die Ergebnisse nach Immunfluoreszenz-Doppelfärbung: Synaptophysin ist in grün, der GLP-2 Rezeptor in rot dargestellt.

Konzentrationen und pH: Anti-GLP-2 Rezeptor in der Verdünnung 1:10 bei pH 6, Anti-Synaptophysin in der Verdünnung 1:50 bei pH 6.

### **3.1.2 Expression von GLP-2R, hGCG und Sucrase-Isomaltase im Gewebe von Morbus Crohn Patienten**

Es folgte eine Analyse mittels qRT-PCR hinsichtlich der Transkriptionslevel und des Verteilungsmusters von GLP-2R, hGCG und SI in endoskopisch gewonnenen Gewebeproben von Morbus Crohn Patienten. Besonderes Augenmerk wurde auf die

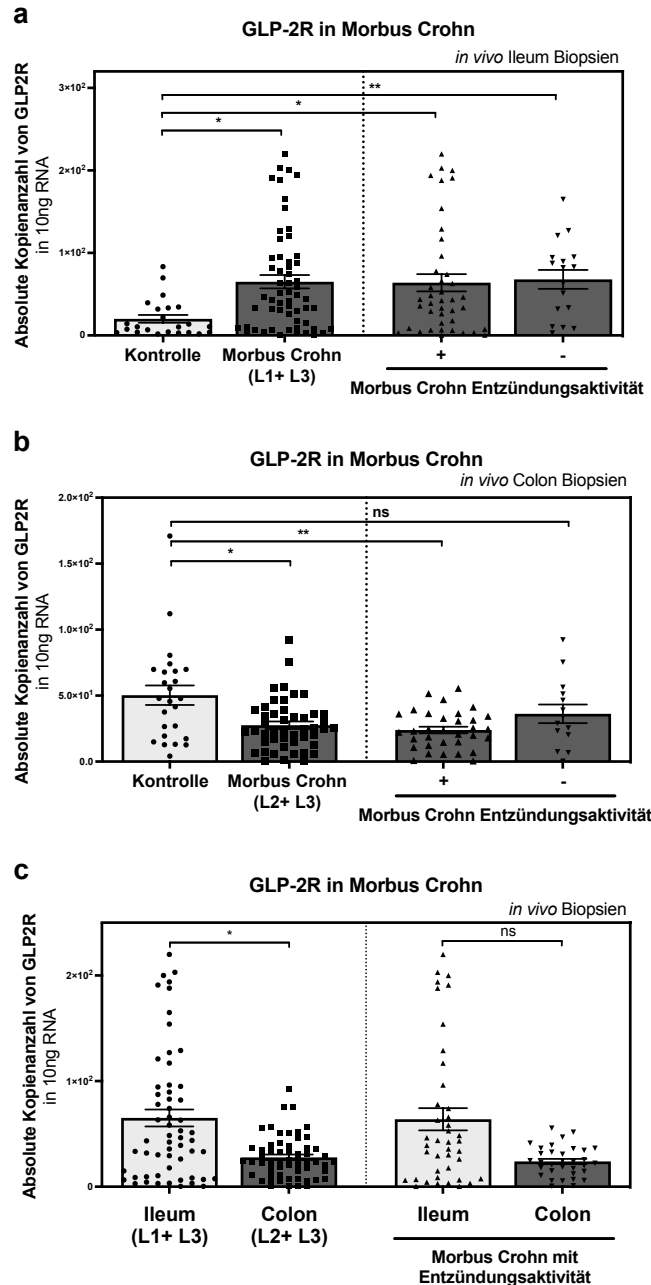
Lokalisation (Ileum oder Colon) sowie auf die Entzündungsaktivität (entzündet vs. nicht-entzündet) gelegt.

### **3.1.2.1 Signifikant erhöhte Expression von GLP-2R im Ileum von Morbus Crohn Patienten**

Abbildung 15a zeigt die absolute Kopienanzahl des GLP-2 Rezeptors in endoskopisch gewonnenen Ileum-Gewebeproben von gesunden Probanden (n=23) im Vergleich zu endoskopisch gewonnenen Ileum-Gewebeproben von Patienten mit Morbus Crohn (n=56). Die Ileum-Gewebeproben von Patienten mit Morbus Crohn wurden zudem nach ihrem Entzündungsstatus bei Probenentnahme in entzündet (n=40, als + dargestellt) und nicht entzündet (n=16, als - dargestellt) aufgeteilt. Es zeigte sich, dass die GLP-2 Rezeptor Expression im Ileum von Morbus Crohn Patienten signifikant gegenüber der GLP-2 Rezeptor Expression im Ileum gesunder Probanden erhöht war. Nach Aufteilen der Morbus Crohn Patienten in entzündet und nicht entzündet (bezieht sich auf die Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der Probenentnahme) ließ sich die Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test unabhängig vom Entzündungsstatus nachweisen.

In Abbildung 15b zeigte sich eine signifikant erniedrigte GLP-2 Rezeptor Expression im Colon von Morbus Crohn Patienten (n=48) im Vergleich zu Colon-Gewebeproben gesunder Probanden (n=25). Dies ließ sich auf eine erniedrigte GLP-2 Rezeptor Expression im Colon bei Patienten mit Entzündungsaktivität (als + dargestellt, n=34) zurückführen. Ein Vergleich zwischen der GLP-2 Rezeptor Expression im Colon gesunder Probanden (n=25) und der GLP-2 Rezeptor Expression im Colon von Morbus Crohn Patienten ohne Entzündungsaktivität (als – dargestellt n=14) zeigte keine signifikanten Unterschiede.

In Abbildung 15c stellte sich eine signifikant erhöhte GLP-2 Rezeptor Expression im Ileum von Morbus Crohn Patienten (n= 56) im Vergleich zum Colon von Morbus Crohn (n=48) Patienten dar. Die erhöhte Expression im Ileum im Vergleich zum Colon zeigte sich auch bei Analyse der Gewebeproben mit Entzündungsaktivität für das Ileum (n=40) erhöht, allerdings nicht signifikant (n=0,07). Unter Berücksichtigung der Abbildung 10 (Kapitel 3.1.1) zeigten Morbus Crohn Patienten - im Gegensatz zu gesunden Probanden - eine signifikant erhöhte GLP-2 Rezeptor Expression im Ileum im Vergleich zum Colon.



**Abbildung 15: Expressionslevel des GLP-2R in Ileum und Colon von Morbus Crohn (MC) Patienten**

a) Ileum-Gewebeproben von Patienten mit MC mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n= 23, MC L1+L3 n=56, MC mit Entzündungsaktivität n=40, MC ohne Entzündungsaktivität n=16)

b) Colon-Gewebeproben von Patienten mit MC mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n=25, MC L2+L3 n=48, MC mit Entzündungsaktivität n= 34, MC ohne Entzündungsaktivität n= 14)

c) Ileum- und Colon- Gewebeproben von Patienten mit MC (Ileum L1+ L3 n=56, Colon L2+ L3 n=48, Ileum MC mit Entzündungsaktivität n=40, Colon MC mit Entzündungsaktivität n=34)

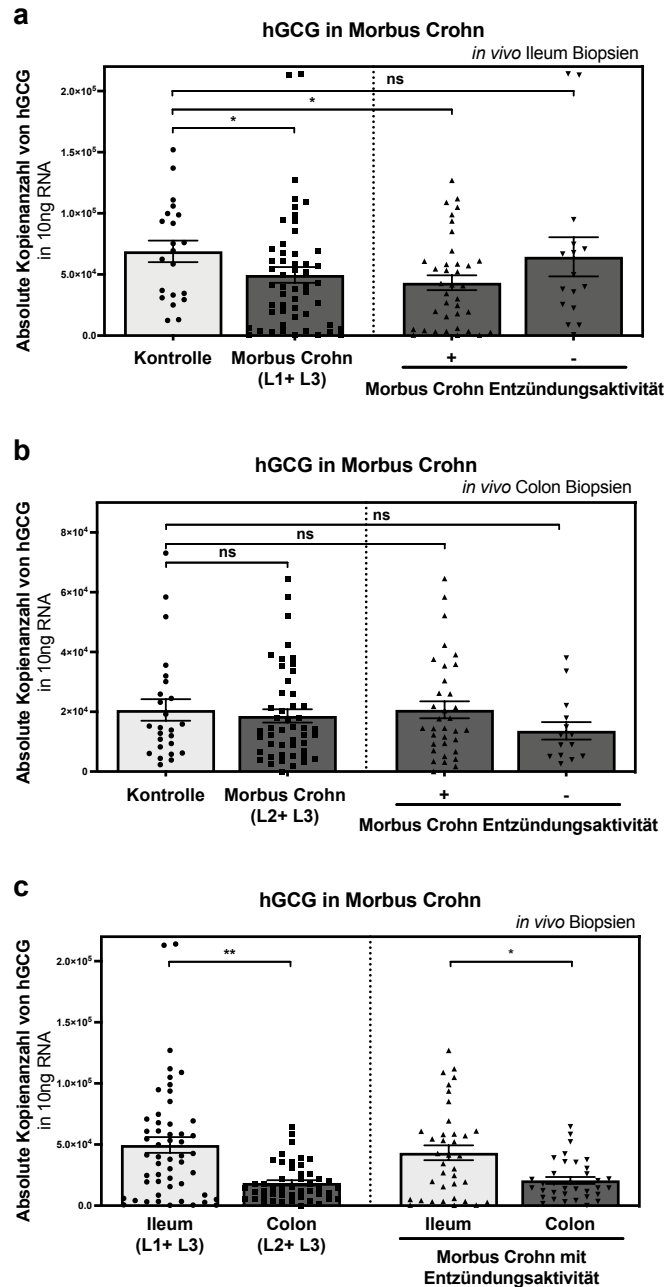
Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test).

### **3.1.2.2 Patienten mit Morbus Crohn weisen eine erniedrigte hGCG Expression im Ileum auf**

Wie in Abbildung 16a dargestellt, zeigte sich in unseren Untersuchungen eine signifikant erniedrigte Expression von humanem Proglucagon (hGCG) im Ileum von Morbus Crohn Patienten (n=56) im Vergleich zu gesunden Probanden (n=23). Nach Aufteilen der Ileum Gewebeproben von Morbus Crohn Patienten in entzündet (n=40) vs. nicht-entzündet (n=16) ließ sich der signifikante Unterschied auf jene Patienten mit Morbus Crohn zurückführen, welche einen Entzündungsaktivität aufwiesen, nicht jedoch für Morbus Crohn Patienten ohne Entzündungsaktivität.

Im Colon von Patienten mit Morbus Crohn (n=48), auch unabhängig von deren Entzündungszustand, ließ sich, wie Abbildung 16b aufzeigt, kein Unterschied im Vergleich zu gesunden Probanden (n=25) feststellen.

Wie Abbildung 16c veranschaulicht, stellte sich das Expressionslevel von hGCG im Ileum von Morbus Crohn Patienten (n=56) im Vergleich zum Colon von Patienten mit Morbus Crohn (n=48) signifikant erhöht dar. Die signifikant erhöhte Expression im Ileum im Vergleich zum Colon zeigte sich auch bei Analyse der Morbus Crohn Gewebeproben mit Entzündungsaktivität (n=40 für MC Ileum mit Entzündungsaktivität und n=34 für MC Colon mit Entzündungsaktivität). Dies entspricht den Beobachtungen (Abbildung 11 unter 2.1.1) beim Vergleich der Expression von hGCG im Ileum und Colon gesunder Probanden.



**Abbildung 16: Expressionslevel von humanem Proglucagon (hGCG) in Ileum und Colon von Morbus Crohn (MC) Patienten**

a) Ileum-Gewebeprobe von Patienten mit MC mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n= 23, MC L1+L3 n=56, MC mit Entzündungsaktivität n=40, MC ohne Entzündungsaktivität n=16)

b) Colon-Gewebeprobe von Patienten mit MC mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n=25, MC L2+L3 n=48, MC mit Entzündungsaktivität n= 34, MC ohne Entzündungsaktivität n= 14)

c) Ileum- und Colon-Gewebeprobe von Patienten mit MC (Ileum L1+ L3 n=56, Colon L2+ L3 n=48, Ileum MC mit Entzündungsaktivität n=40, Colon MC mit Entzündungsaktivität n=34)

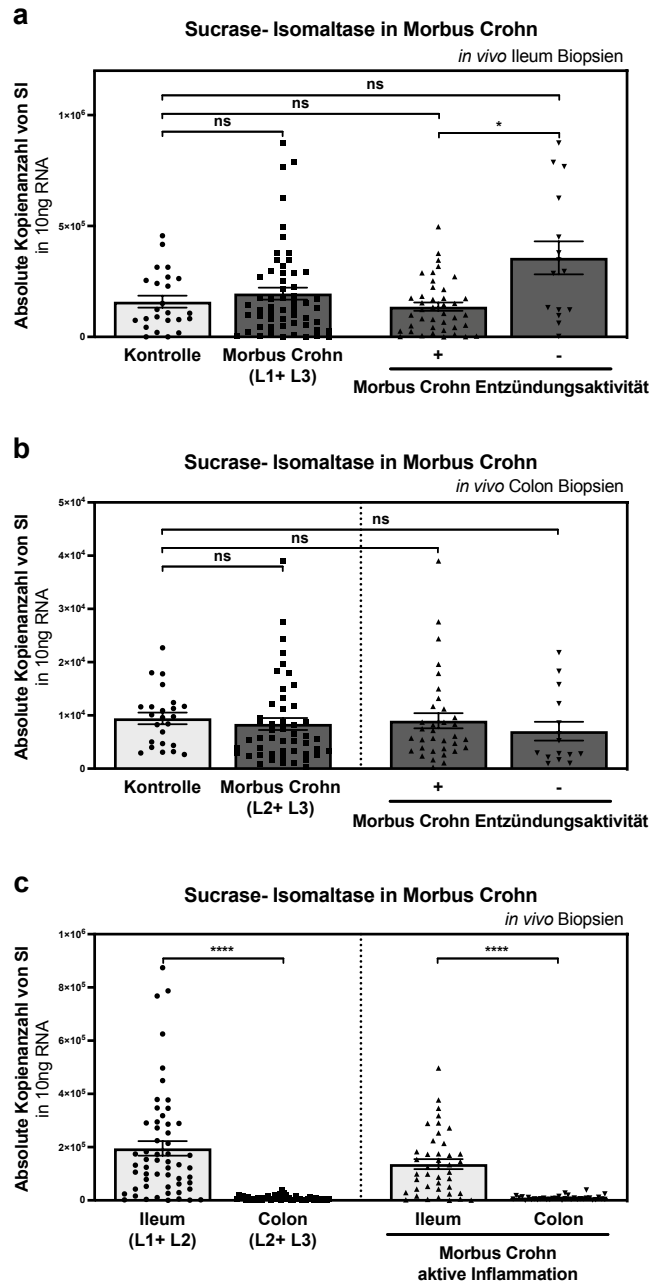
Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test).

### **3.1.2.3 Morbus Crohn Patienten mit Entzündungsaktivität im Ileum zeigen eine erniedrigte Expression von Sucrase-Isomaltase**

In der vorliegenden Abbildung 17a zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression der Sucrase-Isomaltase im Ileum bei Patienten mit Morbus Crohn (n=56) verglichen mit gesunden Probanden (=Kontrolle, n=23). Die gemessenen Expressionslevel im Ileum von Morbus Crohn Patienten mit Entzündungsaktivität (n=40) waren signifikant erhöht im Vergleich zur Gruppe der Morbus Crohn Patienten ohne Entzündungsaktivität (n=16).

Im Colon von Morbus Crohn Patienten (n=48) konnte, unabhängig von der Entzündungsaktivität im Gewebe des Patienten, kein Unterschied bezüglich der Expressionslevel der Sucrase-Isomaltase ermittelt werden (siehe Abbildung 17b).

Abbildung 17c belegt das erhöhte Expressionslevel der Sucrase-Isomaltase im Ileum von Morbus Crohn Patienten (n=56) im Vergleich zum Colon von Patienten mit Morbus Crohn (n=48). Die signifikant erhöhte Expression im Ileum im Vergleich zum Colon zeigte sich auch bei Analyse der Gewebeproben mit Entzündungsaktivität (n=40 für MC Ileum aktive Inflammation und n=34 für MC Colon aktive Inflammation). Dies entspricht den Beobachtungen (Abbildung 12 unter 2.1.1) beim Vergleich der Expression von hGCG im Ileum und Colon gesunder Probanden.



**Abbildung 17: Expressionslevel der Sucrase-Isomaltase (SI) in Ileum und Colon von Morbus Crohn (MC) Patienten**

a) Ileum-Gewebeprobe von Patienten mit MC mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n= 23, MC L1+L3 n=56, MC mit Entzündungsaktivität n=40, MC ohne Entzündungsaktivität n=16)

b) Colon-Gewebeprobe von Patienten mit MC mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n=25, MC L2+L3 n=48, MC mit Entzündungsaktivität n= 34, MC ohne Entzündungsaktivität n= 14)

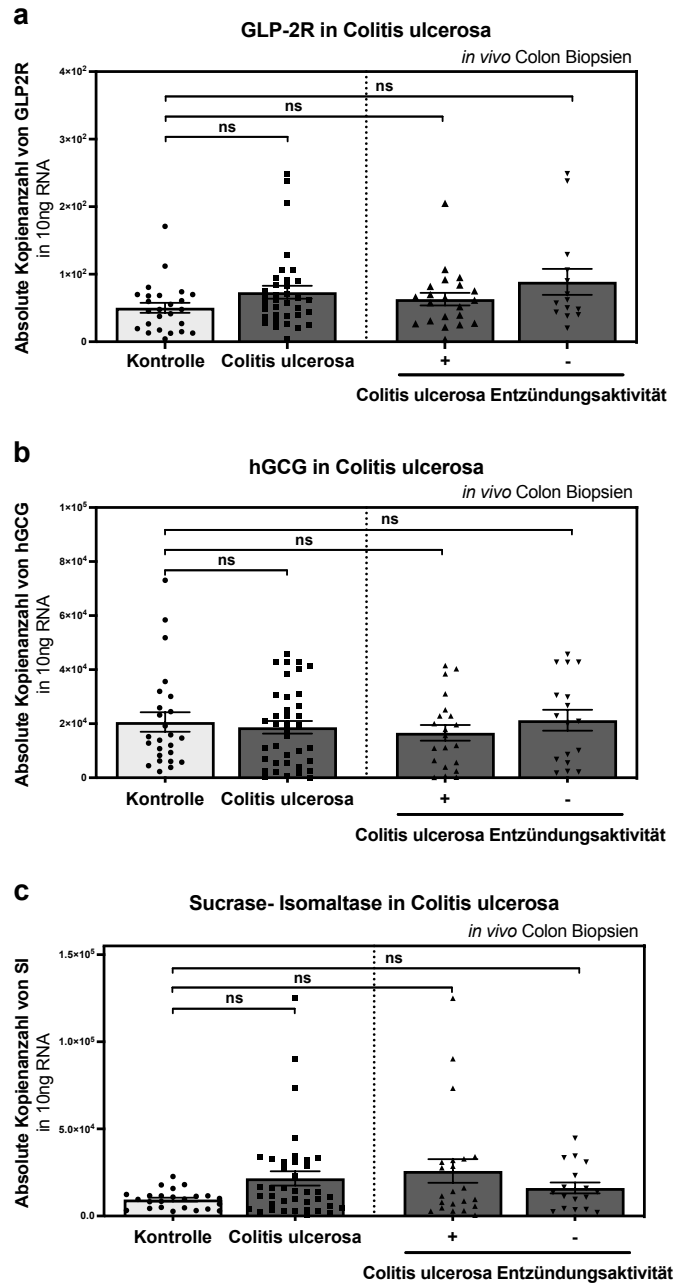
c) Ileum- und Colon-Gewebeprobe von Patienten mit MC (Ileum L1+ L3 n=56, Colon L2+ L3 n=48, Ileum MC mit Entzündungsaktivität n=40, Colon MC mit Entzündungsaktivität n=34)

Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test).

### **3.1.3 Expression von GLP-2R, hGCG und Sucrase-Isomaltase in Patienten mit Colitis ulcerosa**

Um die Einflüsse der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa auf die Expression des GLP-2R, des hGCG und der Sucrase-Isomaltase im Colon zu untersuchen, wurde mittels qRT-PCR die quantitative Bestimmung wie in Abbildung 18 dargestellt vorgenommen. Für jedes der bestimmten Gentranskripte erfolgte zudem eine aufgeschlüsselte Analyse nach Entzündungsstatus zum Zeitpunkt der endoskopischen Probenentnahme. Entweder lag bei Probenentnahme ein akut entzündetes (+) oder ein endoskopisch nicht entzündlich verändertes (-) Colongewebe vor. Hierbei konnten weder für GLP-2R (Abbildung 18a), hGCG (Abbildung 18b) noch für SI (Abbildung 18c) signifikante Unterschiede in der Expression der jeweilig untersuchten Gentranskripte im Vergleich zum Colon gesunder Probanden (n= 25) festgestellt werden. Tendenziell zeigte sich die GLP-2R Expression in Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten (n=35) im Vergleich zu gesunden Probanden (Kontrolle, n=25) erhöht, dies war jedoch nicht signifikant (Mittelwert Kontrolle bezogen auf Kopienanzahl von GLP-2R in 10ng RNA: 50.33 +/-7,4; Mittelwerte Colitis ulcerosa: 73,37 +/- 9,6).





**Abbildung 18: Expressionslevel des GLP-2R, des hGCGs und der Sucrase-Isomaltase (SI) im Colon von Colitis ulcerosa (CU) Patienten**

Dargestellt sind die gemessenen absoluten Kopienanzahlen (qRT-PCR-Analyse) von

a) GLP-2 Rezeptor im Colon von CU-Patienten mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n=25, CU n=35, CU mit Entzündungsaktivität n=21, CU ohne Entzündungsaktivität n=14)

b) hGCG im Colon von CU-Patienten mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n=25, CU n=38, CU mit Entzündungsaktivität n=21, CU ohne Entzündungsaktivität n=17)

c) SI im Colon von CU-Patienten mit/ohne Entzündungsaktivität (Kontrolle n=25, CU n=38, CU mit Entzündungsaktivität n=21, CU ohne Entzündungsaktivität n=17)

Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test).

### **3.2 Der Einfluss von Teduglutid auf die Viabilität von Tumorzellen**

Das Glucagon-like peptide 2 Analogon Teduglutid soll im nun vorliegenden Kapitel mittels SRB-Zytotoxizitätsassay (Kapitel 2.2.2.4) hinsichtlich proliferativer oder toxischer Effekte auf Tumorzellen untersucht werden. Erste Nachweise für eine GLP-2R Expression in Tumorgewebe von gastrointestinalen Stromatumoren und Rhabdomyosarkomen wurden durch Körner et al. erbracht (Körner et al., 2012).

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zelllinien HeLa, HuCCT1, Hep G2, Caco-2 und A 549 ausgewählt (siehe Kapitel 2.1.6.1). Die in Kultur gehaltenen Zelllinien wurden jeweils mit drei unterschiedlichen Konzentrationen Teduglutid, drei unterschiedlichen Konzentrationen EGF (epidermal growth factor), dem Hormon GLP-2 sowie Kontrollreagenz (KR) und Zellkulturmedium (Kontrolle) für 48h und für 72h inkubiert. Das Kontrollreagenz (c= 2000nM/l in Zellkulturmedium, bestehend aus den Zusatzstoffen L-Histidin, Mannitol, Natriumphosphat monohydrat monobasisch und Natriumphosphat heptahydrat dibasisch) setzt sich aus den Bestandteilen, in welchen das Medikament Revestive® (Wirkstoff: Teduglutid) gelöst und vom Hersteller geliefert wird, zusammen, jedoch ohne den Wirkstoff Teduglutid zu beinhalten (Kapitel 2.1.4.1 und 2.2.2.3).

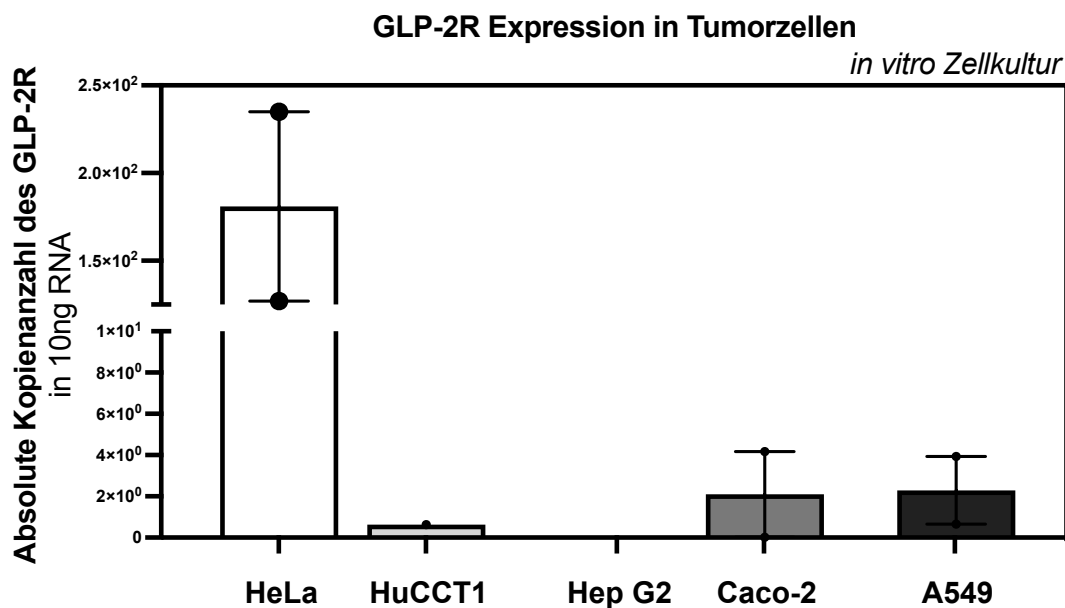
Als Negativkontrolle für die Versuche diene das Zellkulturmedium der jeweiligen Zelllinie. Die mittels SRB-Zytotoxizitätsassay photometrisch bestimmten Werte wurden auf die Negativkontrolle (=Zellkulturmedium) normiert, wobei die Negativkontrolle als 100% Zellviabilität definiert ist. Die Ergebnisse sind als prozentuale Zu- oder Abnahme der Zellviabilität der entsprechenden Zelllinie dargestellt (Fold change).

Vor Versuchsdurchführung wurde mittels qRT-PCR der Gehalt des GLP-2 Rezeptors in den zur Versuchsdurchführung bestimmten Tumorzelllinien quantifiziert, um die resultierenden Ergebnisse unter dem Aspekt der GLP-2 Rezeptorexpression interpretieren zu können.

### 3.2.1 Quantitativer Nachweis des GLP-2R in Tumorzellen

Wie in Abbildung 19 dargestellt, zeigten sich für die Epithelzellen des Cervixkarzinoms (HeLa) die mit Abstand höchste Anzahl an GLP-2R Transkripten in 10ng RNA. Die GLP-2R Expression in Hela Zellen konnte bereits durch Köhler et al. nachgewiesen werden (Koebler et al., 2005). Epithelzellen des Cholangiocellulären-Carzinoms (HuCCT1), Adenokarzinomzellen des Dickdarms (Caco-2) sowie Adenokarzinomzellen der Lunge (A549) zeigten eine schwache Expression des GLP-2 Rezeptors.

In der Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms (Hep G2) konnten keine Transkripte des Zielrezeptors nachgewiesen werden. Dennoch wurde die Zelllinie für weitere Versuche verwendet, um mögliche rezeptorunabhängige Effekte von Teduglutid beurteilen zu können.



**Abbildung 19: GLP-2R Expression in den Tumorzellen HeLa, HuCCT1, Hep G2, Caco-2 und A549, n=2**  
Quantitative Bestimmung der absoluten Kopienanzahlen (qRT-PCR-Analyse) des GLP-2R in den Tumorzellen HeLa, HuCCT1, Hep G2, Caco-2 und A549. Die Zelllinien wurden *in vitro* in Zellkultur gehalten.

### 3.2.2 Erhöhte Zellviabilität in Tumorzellen nach 72h Inkubation mit Teduglutid

Abbildung 20 veranschaulicht die Ergebnisse des durchgeführten SRB-Zytotoxizitätsassays. Chaturvedi et al. hatten bereits nachgewiesen, dass Teduglutid

die Caco-2 Epithelzellproliferation steigert (Chaturvedi and Basson, 2013). Die verwendeten Konzentrationen von Teduglutid wurden anhand der Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit (European Medicine Agency, 2017) sowie unter Berücksichtigung der verwendeten Testkonzentrationen durch Chaturvedi et al. errechnet. Die Konzentration sollte hierbei mindestens jener Konzentration entsprechen, welche laut Herstellerangaben therapeutisch eingesetzt wird. Schließlich wurden die Zielkonzentrationen von 0,93µg/ml (entspricht 250nM), 3,75µg/ml (entspricht 1000nM) sowie 9,30µg/ml (entspricht 2500nM) verwendet. Die therapeutische Konzentration von Teduglutid bei medizinisch verordneter Anwendung bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom liegt bei 1,86µg/ml (entspricht 500nM).

Die Konzentrationen von EGF wurden auf Basis der Versuche durch Chaturvedi et al. verwendet (Chaturvedi and Basson, 2013). In den Versuchen wurden die Zielkonzentrationen 25, 50 und 100ng/ml EGF verwendet. GLP-2 wurde in der Konzentration 78,4ng/ml (entspricht 20nM) nach Koehler et al. eingesetzt, das Kontrollreagenz (=KR, siehe Kapitel 2.2.2.4, Tabelle 19 und Tabelle 20) wurde in der Konzentration 2000nM eingesetzt (Koehler et al., 2008b).

In Grafik 20a dargestellt ist die Zellviabilität der HeLa Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den oben genannten Reagenzien (Anzahl der Versuche: n=3). Eine signifikante Erhöhung der optischen, vitalen Zellmasse im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich für die Behandlung der Zellen mit 25 und 50ng/ml EGF. Zellen, die mit Teduglutid behandelt wurden, zeigten tendenziell eine erhöhte Viabilität (+6,6% für 0,93µg/ml, +11,1% für 3,75µg/ml und +9,9% für 9,3µg/ml, sämtliche prozentuale Ergebnisse sind auf Basis der Mittelwerte errechnet, n=3) im Vergleich zur Kontrolle jedoch ohne statistische Signifikanz. Diese lag für alle Teduglutid-Konzentrationen höher als für das Kontrollreagenz (+3,4%). Die 72-stündige Behandlung mit GLP-2 führte zu einer statistisch nicht signifikant erhöhten optischen Zellmasse von 9,7% im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 20b veranschaulicht die Effekte von KR, Teduglutid, EGF und GLP-2 auf die HuCCT1 Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation (Anzahl der Versuche: n=4). Eine signifikante Erhöhung der Zellviabilität zeigte sich nach Inkubation mit Teduglutid in den Konzentrationen 0,93 und 3,75µg/ml sowie mit 25ng/ml EGF. Jedoch müssen die stark variierenden Messergebnisse wie im scatter dot plot dargestellt mitbeachtet werden. Tendenziell stellte sich die jeweilige vitale Zellmasse aller mit Teduglutid und

EGF behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle erhöht dar. Eine geringfügig erhöhte Zellviabilität von +9,4% ließ sich auch nach Inkubation mit dem Kontrollreagenz (KR) erfassen, wohingegen HuCCT1 Zellen nach Behandlung mit GLP-2 (n=4) eine geringfügige Abnahme der vitalen Zellmasse aufzeigten (-3,9%).

Die Ergebnisse der Hep G2 Zelllinie in Abbildung 20c zeigten im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Anzahl der Versuche: n=4). Nach 72-stündiger Behandlung der Zellen mit Teduglutid (alle drei Konzentrationen), EGF (alle drei Konzentrationen) sowie GLP-2 manifestierte sich eine im Durchschnitt erhöhte Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Teduglutid: +66,7% für 0,93µg/ml, +50,1% für 3,75µg/ml, +48,0% für 9,3µg/ml; EGF: +76,1% für 25ng/ml, +63,1% für 50ng/ml, +44,5% für 100ng/ml; GLP-2: +9,4%, sämtliche prozentuale Ergebnisse sind auf Basis der Mittelwerte errechnet, n=4). Das Kontrollreagenz ergab im Mittelwert der gemessenen Daten ein nahezu identisches Ergebnis zur Kontrolle (-0,79%).

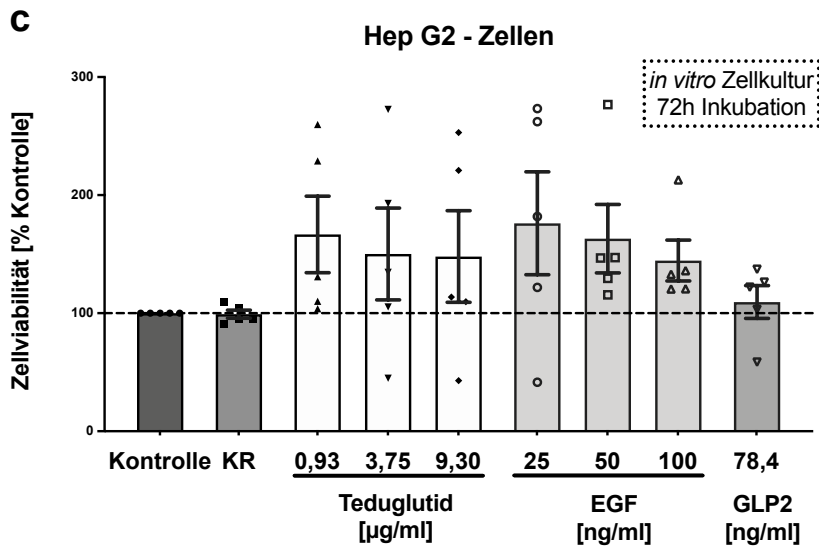
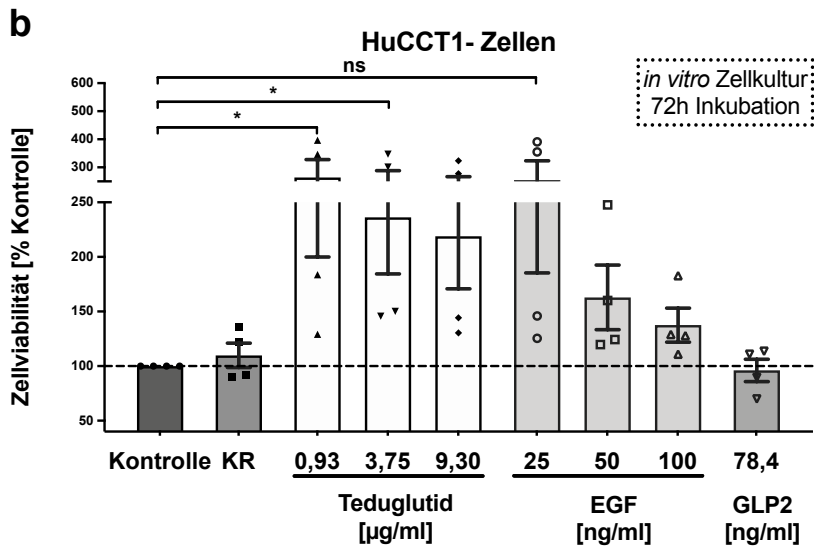
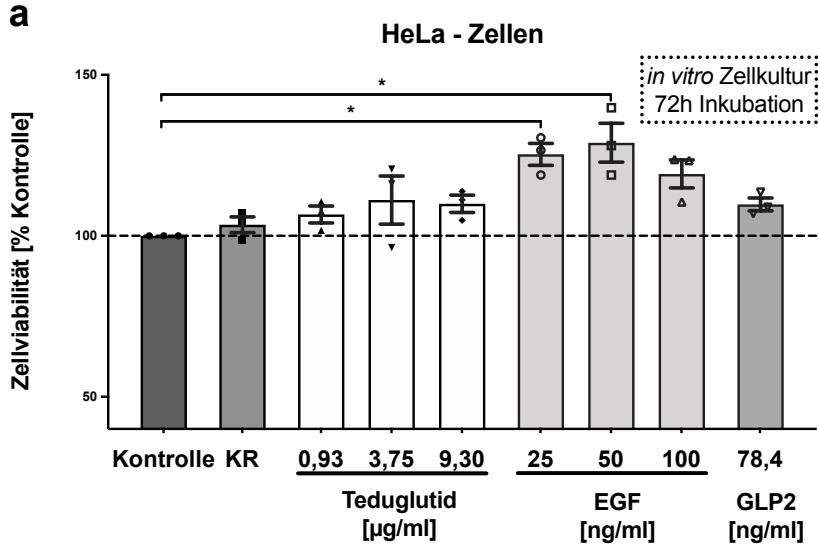
In Abbildung 20d wurde der Einfluss von KR, Teduglutid, EGF und GLP-2 auf das Proliferationsverhalten der Caco-2 Zelllinie untersucht (Anzahl der Versuche: n=4). Für alle drei Teduglutid Konzentrationen und alle drei EGF Konzentrationen zeigte sich nach 72-stündiger Inkubation eine im Mittelwert (n=4) der analysierten Ergebnisse erhöhte optische Zellmasse (Teduglutid: +6,1% für 0,93µg/ml, +6,3% für 3,75µg/ml, +5,9% für 9,3µg/ml; EGF: +7,0% für 25ng/ml, +13,72% für 50ng/ml, +7,2% für 100ng/ml, sämtliche prozentuale Ergebnisse sind auf Basis der Mittelwerte errechnet). Für EGF 50ng/ml war der Effekt statistisch signifikant. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Beobachtungen von Chaturvedi et al, die einen signifikanten Anstieg der Proliferation von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 250nM, 500nM und 1000nM Teduglutid sowie mit 50ng/ml EGF beschrieben (Chaturvedi and Basson, 2013). Das Kontrollreagenz zeigte im Mittelwert eine um +1,1% erhöhte, GLP-2 eine im Mittelwert um -5,3% erniedrigte Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle.

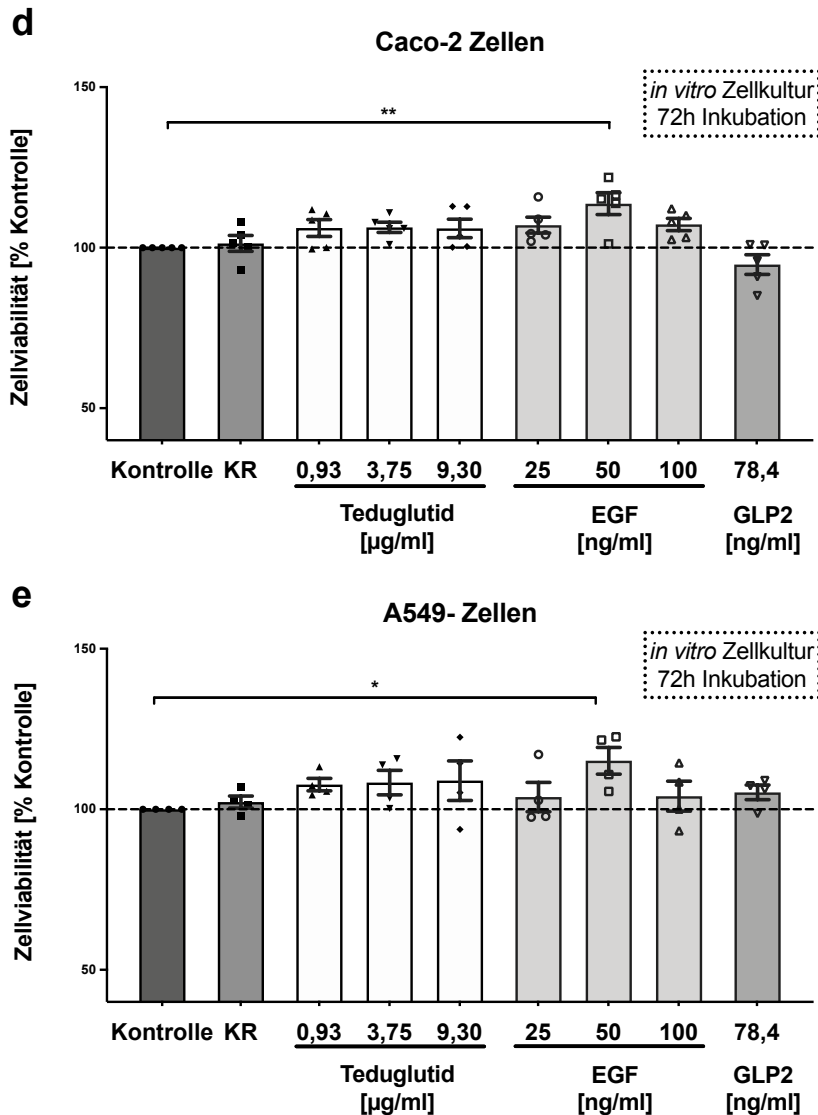
Nach 72-stündiger Behandlung der A549 Zelllinie (Anzahl der Versuche der A549 Zelllinie: n=4) mit denen in Abbildung 20e dargestellten Inkubationsreagenzien präsentierte sich die vitale Zellmasse für alle drei Konzentrationen Teduglutid, alle drei Konzentrationen EGF und GLP-2 im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Teduglutid: +7,6% für 0,93µg/ml, +8,3% für 3,75µg/ml, +8,9% für 9,3µg/ml; EGF: +3,8% für 25ng/ml, +15,1% für 50ng/ml, +4,0% für 100ng/ml, GLP-2: +5,2%; sämtliche prozentuale

Ergebnisse sind auf Basis der Mittelwerte errechnet, n=4). Hierbei ergab sich für EGF 50ng/ml eine statistische Signifikanz. Für die Behandlung mit KR ergab sich nach Inkubation eine Abweichung der Mittelwerte von +2,2% im Vergleich zur Kontrolle.

Trotz variierender Messergebnisse in den durchgeführten Versuchen innerhalb jeder Zelllinie und der geringen Versuchsanzahl (n=4 für HuCCT1, HepG2, Caco-2 und A549; n=3 für HeLa) konnte eine deutliche Tendenz der Zunahme der Zellviabilität unter Teduglutid wie auch unter EGF beobachtet werden. Die Behandlung der Zelllinien mit dem Kontrollreagenz nimmt keinen Einfluss auf die Proliferationsrate.

GLP-2 scheint je nach Zelllinie einen geringfügigen, nicht signifikanten Einfluss auf die Viabilität zu nehmen. Koehler et al. behandelten Colonkarzinomzellen (Caco-2, T84, HT29 und SW480) mit GLP-2 und hielten fest, dass nach 96-stündiger Inkubation keine Effekte auf die Proliferationsrate nachgewiesen werden konnten (Koehler et al., 2008a).





**Abbildung 20: Behandlung der Tumorzelllinien mit Teduglutid, EGF und GLP-2**

Zellviabilität im SRB-Zytotoxizitätsassay im Vergleich zur Kontrolle (=Zellmedium) in %. Die Kontrolle ist als 100% definiert. Die jeweiligen Zelllinien wurden für 72h mit Medium (=Kontrolle), Kontrollreagenz (KR), Teduglutid in unterschiedlichen Konzentrationen (0,93µg/ml, 3,75µg/ml, 9,30µg/ml), EGF in unterschiedlichen Konzentrationen (25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml) sowie GLP-2 (78,4ng/ml) inkubiert. Es erfolgte eine quantitative Messung im Tecan-Reader bei einer Wellenlänge von 550nm.

- a) Zellviabilität von Hela Zellen, n=3, 6.000 Zellen/ 96-Wellplatte bei Aussaat
- b) Zellviabilität von HuCCT1-Zellen, n=4, 20.000 Zellen/96-Wellplatte bei Aussaat
- c) Zellviabilität von Hep G2-Zellen, n=4, 20.000 Zellen/96-Wellplatte bei Aussaat
- d) Zellviabilität von Caco-2-Zellen, n=4, 10.000 Zellen/96-Wellplatte bei Aussaat
- e) Zellviabilität von A549-Zellen, n=4, 10.000 Zellen/96-Wellplatte bei Aussaat

Die Ergebnisse der Mittelwerte sind als Balkendiagramm mit SEM und Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede erhielten keinen Querbalken (Kruskal-Wallis-Test).



### **3.3 Der Einfluss der Teduglutid-Behandlung auf die epitheliale Homöostase bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom**

In den ersten proof of concept-Studien zeigte sich im Dünndarm von Patienten mit Kurzdarmsyndrom unter Behandlung mit Teduglutid das histomorphologische Bild vergrößerter Darmzotten, vertiefter Krypten sowie erhöhter Mitoseraten (Jeppesen et al., 2005). Eine Analyse hinsichtlich der Expressionslevel spezifischer intestinaler Zellmarker wurde nicht durchgeführt. Zudem konnte in experimentellen Mausversuchen ein protektiver Einfluss von Teduglutid auf die intestinalen Stammzellen nach induzierten Strahlenschäden festgestellt werden (Booth et al., 2004). Boushey et al. studierten die Effekte von GLP-2 auf unterschiedliche Proliferationsmarker, Stammzellmarker und Zytokine anhand von Mäusen mit Indomethacin induzierter Enteritis. Sie beobachteten, dass die Induktion von Zytokinen nach Behandlung mit GLP-2 signifikant reduziert war und die Proliferation der Kryptenzellen erhöht war (Boushey et al., 1999).

Welche Einflüsse das Medikament Teduglutid auf spezifische intestinale Zellmarker in Patienten mit Kurzdarmsyndrom hat, soll im Folgenden anhand des Patientenkollektivs analysiert werden. Hieraus sollen neue Erkenntnisse zum Verständnis der therapeutischen Wirkung von Teduglutid und möglicher Nebenwirkungen auf Zellebene gewonnen werden. Die durchschnittliche Einnahmedauer von Teduglutid im vorliegenden Datensatz betrug 392,57 Tage (n=7, siehe Kapitel 2.1.7.2).

#### **3.3.1 Teduglutid nimmt Einfluss auf die Expression seines Zielrezeptors GLP-2R und weitere intestinaler Zell- und Transkriptionsfaktoren im GI-Trakt bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom**

Der Einfluss von Teduglutid in Patienten mit Kurzdarmsyndrom konzentrierte sich nach Zulassung des Medikaments 2012 hauptsächlich auf die klinischen Effekte und Nebenwirkungen. Eine Auswirkung der Behandlung auf die Expression des Zielrezeptors GLP-2R ist noch nicht untersucht. In Abbildung 21a zeigt sich im Ileum (n=7) und Colon (n=5) von Kurzdarmpatienten eine Herunterregulierung des GLP-2R während der Behandlung mit Teduglutid. Das Ergebnis war in der Auswertung für das Ileumgewebe signifikant ( $p=0,03$ ), für das Colongewebe nicht signifikant.

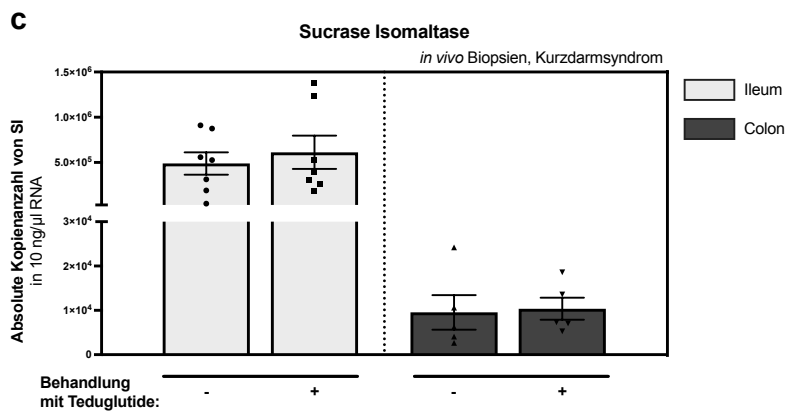
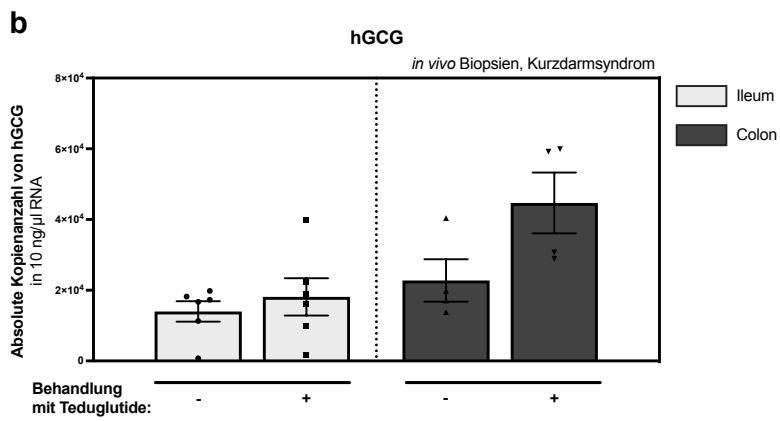
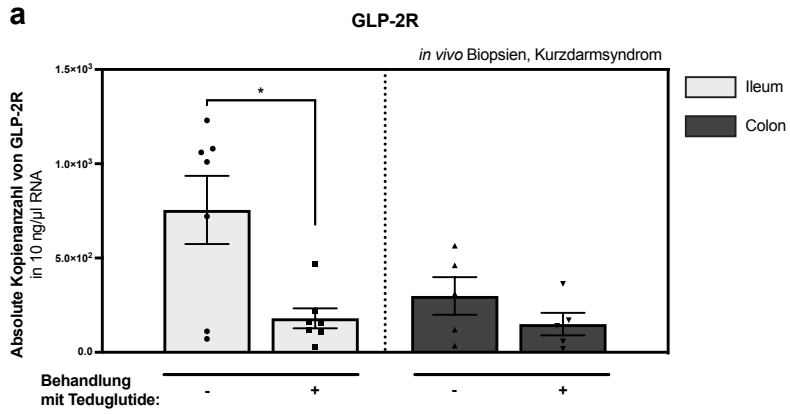
Die absoluten Kopienanzahlen des humanen Proglucagons, aus welchem posttranslational das Hormon GLP-2 im Verhältnis 1:1 entsteht, sind in Abbildung 21b dargestellt. Den Ergebnissen ist keine Signifikanz zu entnehmen, jedoch zeigt sich in der Tendenz eine erhöhte Expression von hGCG im Ileum und Colon von Kurzdarmpatienten während der Behandlung mit Teduglutid. Dies lässt die Überlegung zu, dass zumindest kein negatives Feedback auf die hGCG Expression während der Behandlung mit Teduglutid eintritt.

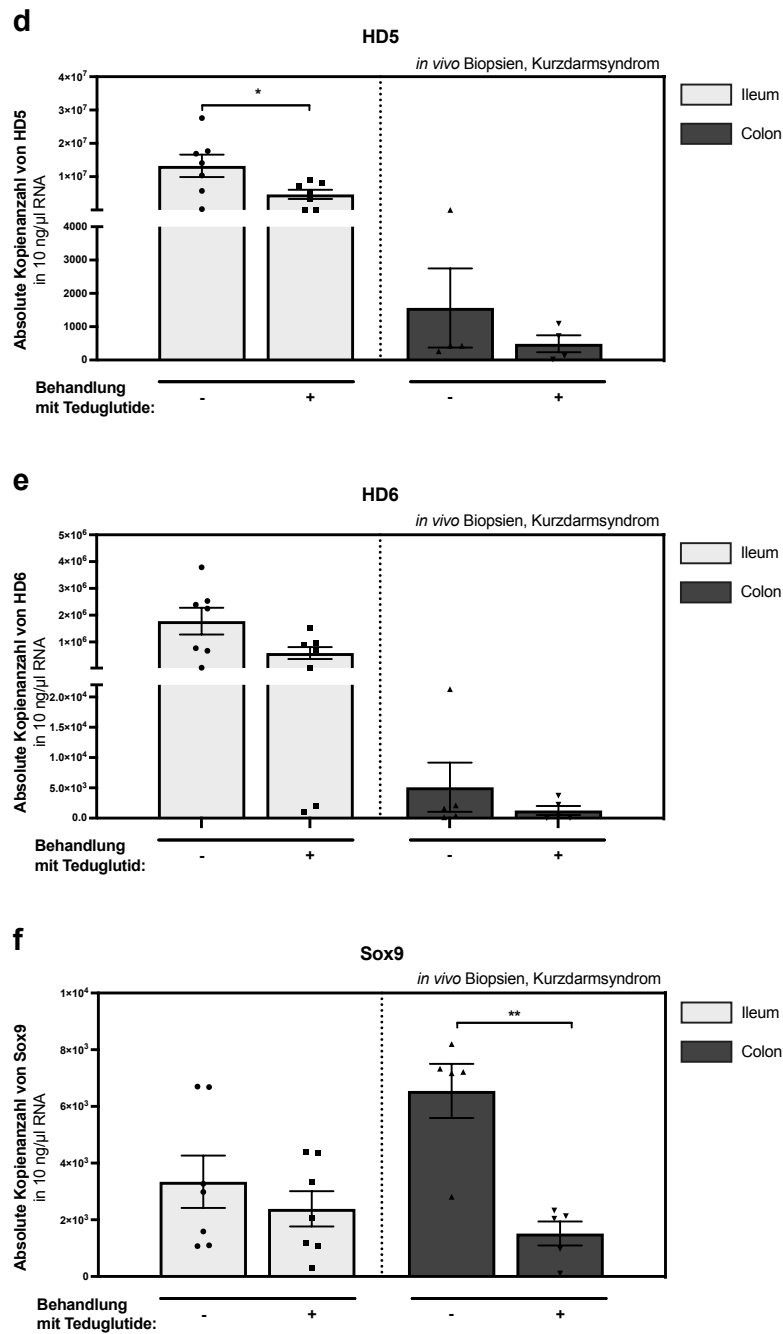
Abbildung 21c zeigt die Expressionsergebnisse der Sucrase-Isomaltase vor und während der Behandlung mit Teduglutid im Dün- und Dickdarm. Tendenziell weisen sowohl Ileum- als auch Colon-Gewebeproben während der Behandlung mit Teduglutid ein höheres Expressionslevel auf. Dies erwies sich als statistisch nicht signifikant.

Um den Einfluss von Teduglutid auf zwei antimikrobielle Peptide, welche von den Paneth-Körnerzellen exprimiert werden und eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von CEDs spielen, zu untersuchen, wurden die in Abbildung 21d und 21e dargestellten  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 im Kurzdarmpatientenkollektiv gemessen. Grundsätzlich zeigte sich eine deutlich höhere Expression von HD5 und HD6 im Ileum im Vergleich zum Colon, wie dies in der Literatur bereits vorbeschrieben ist (Elphick and Mahida, 2005). Zudem wurde deutlich, dass HD5 und HD6 in Patienten mit Kurzdarmsyndrom während einer Therapie mit Teduglutid tendenziell geringer exprimiert werden. Diese Beobachtung gilt sowohl für die Expressionsanalyse im Ileum wie auch im Colon, wobei das Ergebnis lediglich für HD5 im Ileumgewebe der Kurzdarmsyndrom-Patienten signifikant war ( $p= 0,04$ ; Abbildung 21d). Die Ergebnisse legen nahe, dass es durch Teduglutid zu einer Herunterregulierung der antimikrobiellen Peptide HD5 und HD6 kommt. Eine Reduktion antimikrobieller Peptide ist bereits bei Morbus Crohn und Ileumbefall durch die AG Wehkamp beschrieben worden (Courth et al., 2015a; Wehkamp et al., 2004).

In Abbildung 21f ist die Expression von Sox9 im Kurzdarmpatientenkollektiv dargestellt. Der Transkriptionsfaktor Sox9 spielt eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von Paneth-Körnerzellen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass ohne Sox9 die Ausdifferenzierung von Paneth-Körnerzellen ausblieb, jedoch eine

erhöhte Proliferation anderer intestinaler Kryptenzellen stattfand (Mori-Akiyama et al., 2007). Die Ergebnisse weisen auf eine reduzierte Expression von Sox9 im Ileum und Colon unter der Therapie mit Teduglutid hin. Die statistische Auswertung (Wilcoxon matched-pairs signed rank test) zeigt für Sox9 im Colon während der Behandlung mit Teduglutid eine signifikant erniedrigte Expression auf.





**Abbildung 21: Der Einfluss von Teduglutid auf den Zielrezeptor GLP-2R, hGCG, SI, Sox9 sowie den antimikrobiellen Panethzellfaktoren HD5 und HD6 in Ileum und Colon von Kurzdarmsyndrompatienten**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von GLP-2R, hGCG, SI, HD5, HD6 und Sox9 sind als Balkendiagramm (+/- SEM) mit Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Abgebildet ist die absolute Kopienanzahl von a: GLP-2R, b: hGCG, c: SI, d: HD5, e: HD6 und f: Sox9 in 10 ng/μl RNA in Ileum- und Colongewebe von Kurzdarmsyndrompatienten vor und während der Behandlung mit Teduglutid (n=7 für Ileumgewebe, n=5 für Colongewebe). Verglichen wurde jeweils Ileumgewebe vor und während Teduglutid-Behandlung sowie Colongewebe vor und während Teduglutid-Behandlung. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede erhielten keinen Querbalken (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

### **3.3.2 Zytokin-, intestinale Stammzell- und Villinreduktion aber tendenzieller Proliferationsanstieg im GI-Trakt bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom unter Teduglutidbehandlung**

Interleukin 10 ist ein Immunmodulator im GI-Trakt, der zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählt (Ng et al., 2013). Die Versuchsergebnisse in Abbildung 22a zeigten eine Reduktion der Expression von IL10 im Ileum (n=7) und Colon (n=5) von Kurzdarmpatienten während der Therapie mit Teduglutid. Für das Ileumgewebe war dies mit  $p=0,03$  signifikant. Die Anzahl n der Gewebeproben der Kurzdarmpatienten von Ileum und Colon entsprechen jenen des vorherigen Kapitels (3.3.1).

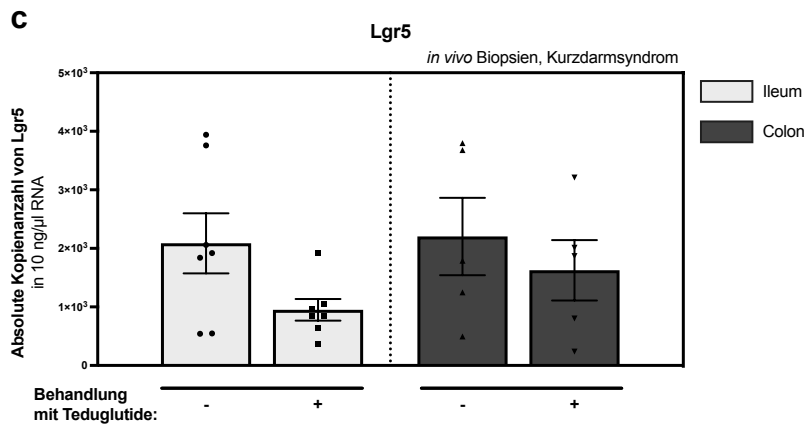
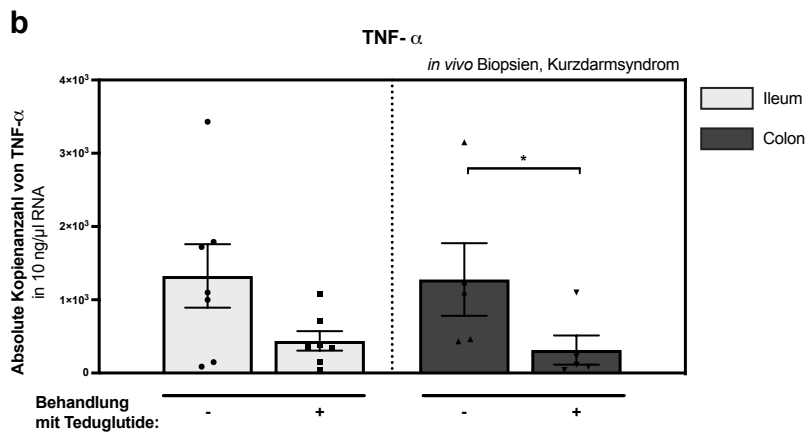
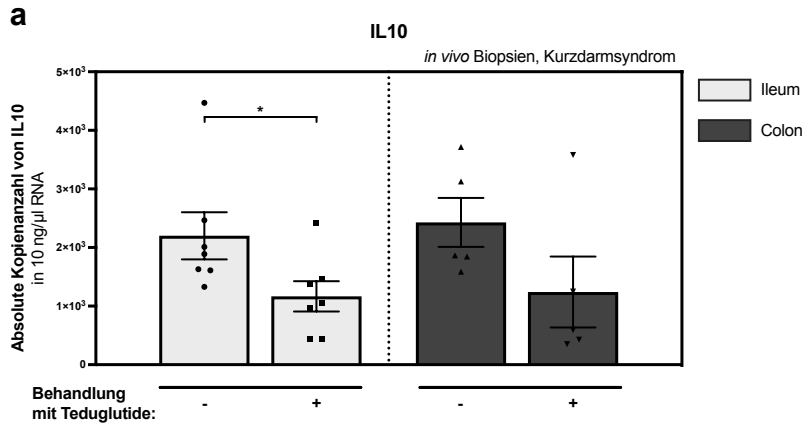
Ähnlich verhält es sich mit der Expression des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$  (Abbildung 22b). Auch dieser zeigte ein geringeres Expressionslevel im Ileum und Colon während der Behandlung mit Teduglutid im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Behandlung, wobei die Ergebnisse lediglich für das Colon signifikant waren ( $p=0,04$ ). Die Beobachtungen zur Expression von IL10 und TNF- $\alpha$  decken sich mit den Ergebnissen der Behandlung von Mäusen mit GLP-2 von Boushey et al. (Boushey et al., 1999). TNF- $\alpha$  ist ebenfalls ein Zytokin, welches an Entzündungsreaktionen beteiligt ist, jedoch auch Einfluss auf verschiedenste Signalwege wie beispielweise den Wnt-Signalweg nimmt (Koch and Nusrat, 2012).

In Abbildung 22c ist die Expression von Lgr5 dargestellt. Lgr5 dient als spezifischer Marker für die Stammzellen der intestinalen Krypten (Barker et al., 2007). Der Stammzellmarker zeigte in den vorliegenden Ergebnissen eine tendenzielle Expressionsabnahme unter der Behandlung mit Teduglutid. Statistisch lässt sich keine Signifikanz errechnen, was auch mit der ausgeprägten Streuung innerhalb der Gruppe zusammenhängt.

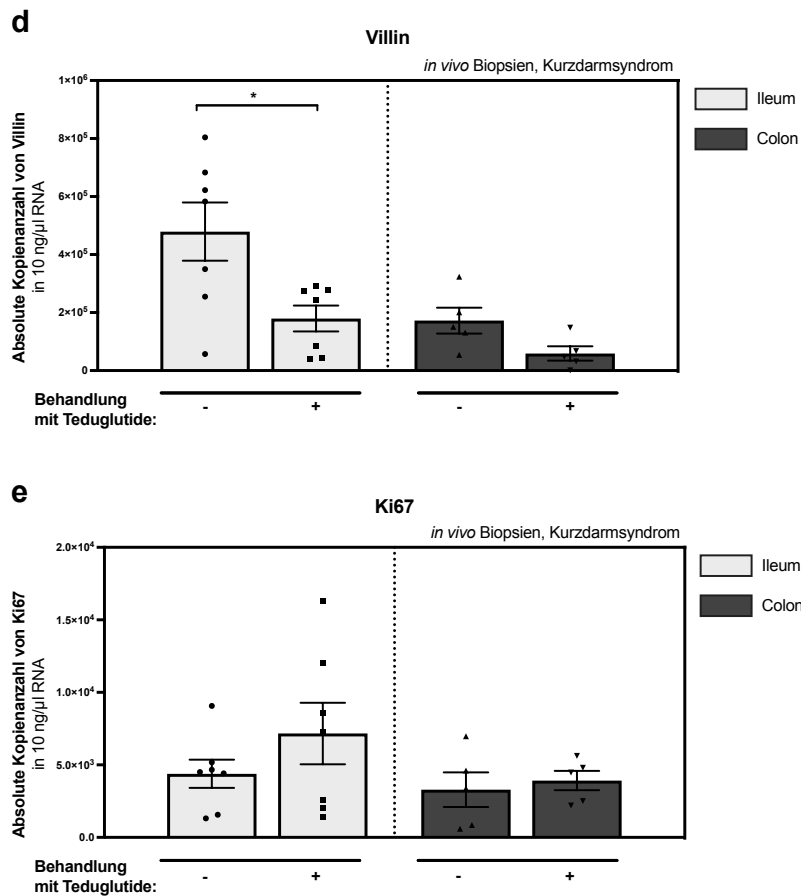
Abbildung 22d stellt die absoluten Kopienzahlen von Villin, welches spezifisch im Zytoskelett des Bürstensaums vorkommt und als Marker für die Villushöhe herangezogen wird, dar (Chantret et al., 1988). Die Auswertung der Studie zeigte einen Abfall der Expression von Villin sowohl im Ileum als auch im Colon während der Behandlung von Kurzdarmpatienten mit Teduglutid. Für das Ileum zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Zeitpunkt vor Einnahme des Medikaments ( $p=0,04$ ). Dieses Ergebnis muss vor dem Hintergrund der Erkenntnisse von Drucker et al. sowie Blurring et al, die unter dem Einfluss von GLP-2 starke

intestinotrophe Einflüsse wie Mukosawachstum, Zunahme der intestinalen Zellmasse und Reduktion der Apoptose von Villuszellen postulierten, diskutiert werden (Burrin et al., 2005; Drucker et al., 1996).

Als allgemeiner Proliferationsmarker, der in der klinischen Routinediagnostik eine breite Anwendung hat, soll Ki67 Aufschluss über mögliche proliferative oder antiproliferative Effekte von Teduglutid geben. In Abbildung 22e zeigt sich eine Tendenz zur Zunahme der Ki67 Expression in Ileum und Colon unter der Behandlung mit Teduglutid. Statistisch lässt sich aus den vorliegenden Patientendaten keine Signifikanz ableiten.







**Abbildung 22: Der Einfluss von Teduglutid auf die Expression von IL10, TNF- $\alpha$ , Lgr5, Villin und Ki67 in Ileum und Colon von Kurzdarmsyndrompatienten**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von IL10, TNF- $\alpha$ , Lgr5, Villin und Ki67 sind als Balkendiagramm (+/- SEM) mit Streupunkten (scatter dot plot) dargestellt. Abgebildet ist die absolute Kopienanzahl von a: IL10, b: TNF- $\alpha$ , c: Lgr5, d: Villin und e: Ki67 in 10 ng/ $\mu$ l RNA in Ileum- und Colongewebe von Kurzdarmsyndrompatienten vor und während der Behandlung mit Teduglutid (n=7 für Ileumgewebe, n=5 für Colongewebe). Verglichen wurde jeweils Ileumgewebe vor und während Teduglutid-Behandlung sowie Colongewebe vor und während Teduglutid-Behandlung. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede erhielten keinen Querbalken (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

### **3.4 Die Auswirkungen der Teduglutidbehandlung auf die Genexpression in Mausorganoiden**

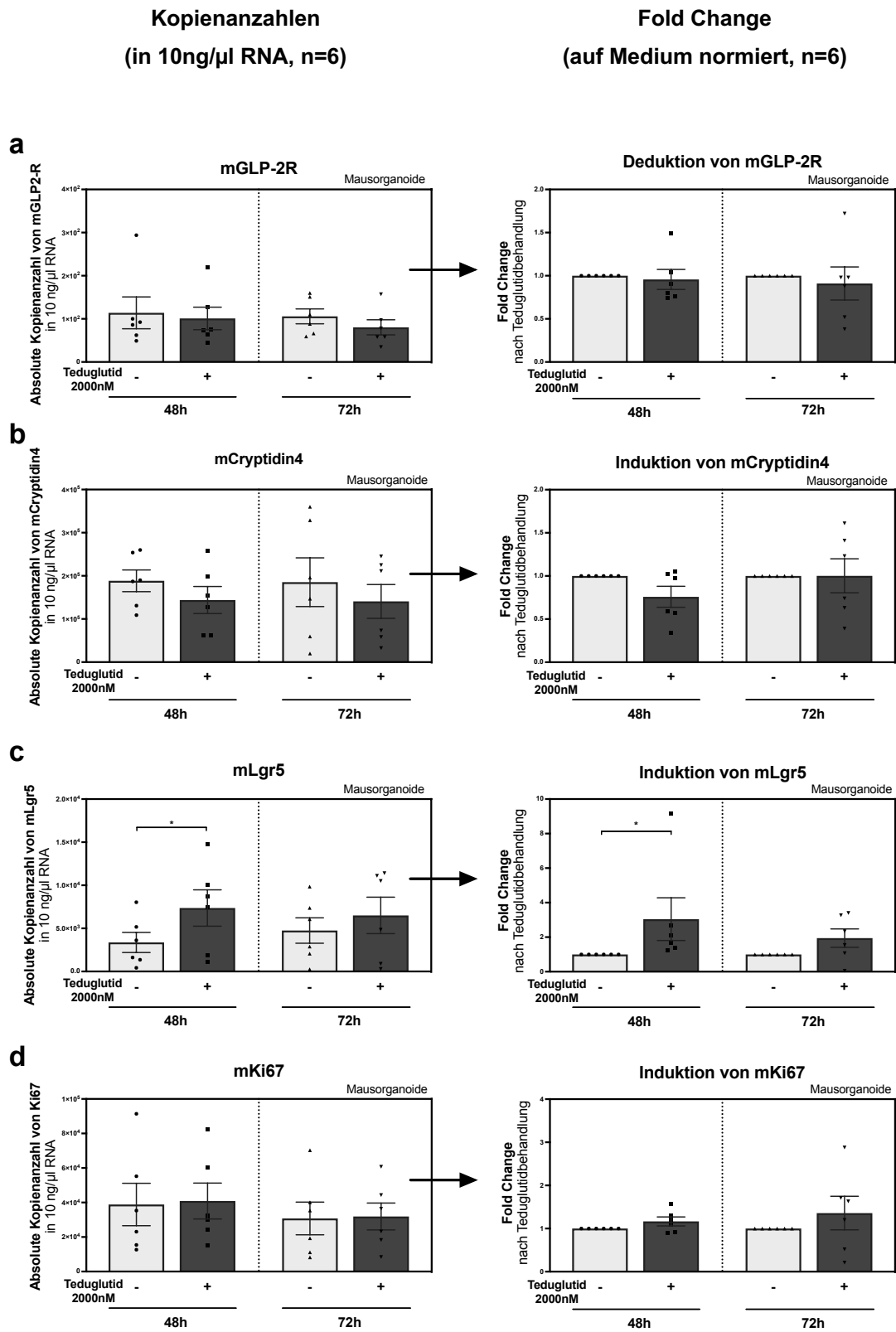
In einem weiteren Versuchsaufbau wurde der Einfluss von Teduglutid auf Mausorganoiden untersucht. Der Vorteil dieser Zellkulturmethode liegt in der Zusammensetzung und Anordnung der intestinalen Zelltypen, wie sie sonst in vivo vorherrscht. Außerdem können die Organoiden vielfach gesplittet und passagiert werden, sodass sämtliche Versuche dieses Experiments mit dem Gewebe einer einzigen Maus durchgeführt werden konnten. Das gewonnene intestinale Gewebe zur Kultivierung der murinen Organoiden stammte aus C57Bl/6 Mäusen.

In dem Experiment wurden die Organoiden direkt nach dem „Aufbrechen“ in Matrigel eingebettet. Anschließend erfolgte die Inkubation der Organoiden mit ENR Medium, welches mit oder ohne (Negativkontrolle) Teduglutid versetzt wurde. Der Vorteil nach dem „Aufbrechen“ der murinen Organoiden besteht darin, dass der Wirkstoff den apikalen (luminalen) und basalen Zellpol des intestinalen Epithels erreicht. Im Vergleich dazu sieht die therapeutische Anwendung eine subkutane Applikation mit endokriner Wirkung vor (European Medicine Agency, 2017). Alle 24h erfolgte die erneute Inkubation mit frischem ENR-Medium oder ENR-Medium mit Teduglutid. Nach 48h und 72h wurden jeweils mindestens vier Wells, die die gleichen Inkubationsmedien erhalten hatten, zusammengeführt und anschließend eine RNA-Isolation durchgeführt.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse des Experiments (n=6 für die Anzahl an Versuchsdurchführungen) dargestellt. Für den murinen GLP-2R (Abb. 23a) zeigte sich nach 48h und 72h tendenziell eine verringerte Expression unter der Inkubation mit Teduglutid. Eine Deduktion des mGLP-2R - mit Ausnahme eines Ausreißers aus Versuch 2 - konnte auch im Fold change dargestellt werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen des Kurzdarmpatientenkollektivs (Abb. 21a) überein.

Das in den Panethzellen des murinen GI-Trakts gebildete Cryptidin-4 zählt zu den wichtigsten  $\alpha$ -Defensinen von Mäusen (Karlsson et al., 2008). Mit dem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cryptidin-4 durch die 48- und 72-stündige Inkubation mit Teduglutid nicht signifikant beeinflusst wird (Abb. 23b). Tendenziell zeigten sich die absoluten Kopienanzahlen der Cryptidin-4-cDNA-Proben

unter der Teduglutidbehandlung regredient, dies konnte im Fold change nach 72h nicht dargestellt werden. Die einzige statistisch signifikante Veränderung im durchgeführten Versuch ließ sich für die Induktion von mLgr5 nach 48h Inkubationszeit mit Teduglutid zeigen ( $p=0,03$ , Abb. 23c). Die Analyse nach 72h offenbarte dieselbe Tendenz, jedoch ohne ein signifikantes Ergebnis. Im Kurzdarmpatientenkollektiv (Abb. 22c) ließen sich gegenteilige Ergebnisse aufzeigen. Für den Proliferationsmarker Ki67 (Abb. 23d) lässt sich keine klare Aussage bezüglich eines Einflusses von Teduglutid auf die Organoiden ableiten. Es zeigt sich nach 48h eine durchschnittlich 1,16-fache und nach 72h eine 1,35-fache Erhöhung der Expression von Ki67. Dies kann zumindest ein Hinweis für eine gesteigerte Proliferationsrate in murinen Organoiden gesehen werden. Trotz dem angewandten 3D-Modell sind die Ergebnisse vorsichtig zu werten. Andere Faktoren wie Immunzellen und Bakterien spielen eine wesentliche Rolle in der epithelialen Homöostase und nehmen Einfluss auf die Proliferation intestinaler Zellen und die Expression antimikrobieller Peptide (Courth et al., 2015a; Pull et al., 2005).



**Abbildung 23: Einfluss von Teduglutid in Mausorganoiden auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden, mGLP-2R und Proliferationsmarker**

Nach dem Splitten der Organoide wurden diese in Matrigel und ENR-Medium mit und ohne Teduglutid (2000nM) für 48h und 72h inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden jeweils mindestens 4 Wells pro Inkubationsmedium

vereint. n= 6, statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede erhielten keinen Querbalken (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

Die untersuchten Gentranskripte (22a: mGLP-2R, 22b: mKi67, 22c: mLgr5, 22d: mCryptidin4) wurden als absolute Kopienanzahlen in 10ng/ $\mu$ l RNA gemessen (links) und anschließend in eine auf das ENR-Medium normierte fold change Darstellung überführt.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Wirkmechanismen des Medikaments Teduglutid auf die Homöostase des Dün- und Dickdarms. Die Analyse der Expression und Lokalisation des Zielrezeptors GLP-2R mittels qRT-PCR, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz soll Aufschluss über ein therapeutisches Ansprechen in unterschiedlichen Darmabschnitten geben.

Erstmals konnte eine deutlich höhere, quantifizierbare Expression des GLP-2 Rezeptors im Colon nachgewiesen werden. Zudem erfolgte die Analyse der Genexpression des Zielrezeptors GLP-2R und des GLP-2 Vorläufermoleküls hGCG im GI-Trakt von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es konnte dargelegt werden, dass Patienten mit Morbus Crohn eine signifikant erhöhte GLP-2R Expression im Ileum und eine signifikant reduzierte Expression des Rezeptors im Colon unabhängig vom Entzündungsstatus des Gewebes aufweisen. Zudem zeigte sich die Expression von GLP-2 in Patienten mit Morbus Crohn erniedrigt. Ein Einfluss von Colitis ulcerosa auf die genannten Genexpressionen konnte nicht nachgewiesen werden.

Anschließend wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die neue Erkenntnisse über den Einfluss von Teduglutid und seiner direkten Wirkung auf verschiedene Zelltypen erbrachten. Ein möglicher Zusammenhang der Proliferation von Tumorzellen unter dem Einfluss von Teduglutid konnte aufgezeigt werden.

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung gab es noch keine humanen in vivo Daten zu den molekularen Wirkmechanismen von Teduglutid im Darmgewebe. Es wurden die Einflüsse der therapeutischen Gabe von Teduglutid in Kurzdarmpatienten studiert und gezeigt, dass unter anderem eine verringerte Expression antimikrobieller Peptide hieraus resultiert. Mithilfe von murinen Organoiden wurde eine innovative in vitro Methode angewandt, die ebenfalls vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich Zellproliferation und Expression antimikrobieller Peptide in murinen Zellen erbrachte. Im Folgenden findet die Diskussion der gewonnenen Ergebnisse und der angewandten Methoden statt.

## **4.1 Expression und Lokalisation des GLP-2R, des hGCGs und der Sucrase-Isomaltase im gesunden und erkrankten GI-Trakt**

### **4.1.1 Der GLP-2 Rezeptor: Lokalisation, Quantifizierung und Expression im gesunden und erkrankten Gewebe**

Der humane GLP-2R wurde 1999 entdeckt und wird zur Secretin-Rezeptorfamilie gezählt (Munroe et al., 1999)(Yusta et al., 2000). Das hierfür codierende Gen besteht aus 13 Exons, wobei zum aktuellen Zeitpunkt keine Splicevarianten nachgewiesen werden konnten (Markovic and Grammatopoulos, 2009). Bisher ist bekannt, dass der Rezeptor in Gewebe von Dünndarm, Dickdarm, Magen, Lunge sowie Gehirn (Hypothalamus) exprimiert wird. Zudem wurde nachgewiesen, dass der GLP-2R in subepithelialen Myofibroblasten, intraepithelialen Enteroendokrinen Zellen und im Plexus myentericus, nicht aber im intestinalen Epithel exprimiert wird und seine höchste Expression im oberen Dünndarm aufzeigt (Guan et al., 2006; Ørskov et al., 2005; Yusta et al., 2000). Jedoch gibt es zur Lokalisation des GLP-2R in der Literatur kontroverse Debatten. Die über den GLP-2R vermittelten Wirkungen lassen sich insbesondere in Mucosazellen nachweisen, sodass eine indirekte Signalvermittlung vermutet wird (Yusta et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der GLP-2R in humanem Colongewebe im Vergleich zu humanem Ileumgewebe eine mehr als doppelt so hohe Expression aufweist. Eine Bestätigung lieferten die durchgeführte Immunhistochemie und Immunfluoreszenz mit Anti-GLP-2R. Erste Daten dieser Ergebnisse wurden bereits durch die AG Wehkamp veröffentlicht (Schoeler et al., 2018). Die Ergebnisse stimmen mit den Analysen von El-Jamal et al. sowie Tylor-Edwards et al., die eine aufsteigende Rezeptorexpression von Duodenum über Jejunum, Ileum, Colon bis hin zum Rektum in Mäusen und Rindern beobachteten, überein. Zudem konnte die Arbeitsgruppe von El-Jamal et al. anhand von humanem Darmgewebe (n=5) eine erhöhte Rezeptorexpression im Colon, verglichen mit dem Ileum, feststellen (El-Jamal et al., 2014b; Taylor-Edwards et al., 2010, p.). Jedoch erfolgte aufgrund der geringen Patientenzahl keine Verallgemeinerung dieser Analyse. Im Hinblick auf frühere Erkenntnisse, die unter dem Einfluss von Teduglutid keine Vertiefung der Krypten im Colon feststellen konnten und den Dünndarm für die Hauptlokalisierung der Rezeptorexpression ausmachten, ist dies eine wegweisende Beobachtung. Zudem beschrieben Ørskov et al. eine spärliche Rezeptorexpression im

Colon im Vergleich zum Ileum (Drucker et al., 1996; Jeppesen et al., 2005; Ørskov et al., 2005). Es ist bekannt, dass die höchste Dichte an Enteroendokrinen L-Zellen, welche mutmaßlich den Rezeptor exprimieren, im Colon vorkommen (Yusta et al., 2000). Dies würde mit unseren Beobachtungen hinsichtlich der hohen GLP-2R Expression im Colon übereinstimmen. Die Kontinuität des Colons bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom könnte zukünftig in den Fokus rücken. Neben dem Ileum stellt das Colon damit ein klinisch relevantes Ziel für Teduglutid dar und könnte eine Schlüsselrolle in der Therapie und dem klinischen Outcome wie beispielweise Stuhlfrequenz und intestinalem Flüssigkeitsverlust einnehmen. In dieser Arbeit konnte mittels Doppelimmunfluoreszenz mit Synaptophysin kein GLP-2R in den Enteroendokrinen Zellen des Ileums und Colons nachgewiesen werden. Die mit Synaptophysin gefärbten Enteroendokrinen Zellen zeigten keine Anfärbbarkeit mit Anti-GLP-2R. In der Immunfluoreszenz und in den immunhistochemischen Färbungen war der Rezeptor in den basalen Krypten des Colons sowie vereinzelt im luminalen Bereich des Colonepithels angesiedelt. Frühere Arbeiten konzentrierten sich auf die Verteilung und Lokalisation im Ileum und konnten zeigen, dass der Rezeptor in den Krypten in höherer Anzahl vorkommt als in den Zotten.

Es folgte die Untersuchung der Rezeptorexpression im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Zielstruktur im Ileum und Colon von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. In den letzten Jahren fand eine breite Diskussion über unterschiedliche Defekte der Paneth-Körnerzellen im Zusammenhang mit der Pathogenese von Morbus Crohn statt. Hauptaugenmerk lag unter anderem auf der reduzierten Expression der  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 und der daraus resultierenden mikrobiellen Dysbalance im GI-Trakt (Courth et al., 2015a; Ogura et al., 2003b; Wehkamp et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein bzw. die veränderte Expression des GLP-2R in Morbus Crohn Patienten und ferner der Einfluss von Teduglutid auf oben genannte antimikrobielle Peptide im erkrankten Gewebe untersucht. Körner et al. konnten mittels Autoradiographie eine Hochregulierung des GLP-2R im Ileum und Colon von Patienten mit MC detektieren (Körner et al., 2012). Erste Untersuchungen an Mäusen mit chemisch induzierter Colitis zeigten hingegen einen Rückgang der



GLP-2R Expression um 60% im Vergleich zu gesunden Mäusen (El-Jamal et al., 2014a). Unsere Ergebnisse zeigen stattdessen im Ileum von MC Patienten, unabhängig vom Entzündungszustand, eine signifikant erhöhte Expression des Rezeptors im Vergleich zu gesundem Ileumgewebe. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Körner et al. (Körner et al., 2012). Konträr verhält sich die Rezeptorexpression im Colon von MC Patienten. Hier konnte eine signifikante Reduktion der Rezeptorexpression in Patienten mit MC im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, wobei die Reduktion der Expression auf jene Patienten mit aktiver Entzündung zurückzuführen war. Unsere Daten zur GLP-2R Expression im Ileum von MC Patienten stehen in Kontrast zu Daten von El-Jamal et al., welche eine reduzierte GLP-2R mRNA Expression im Ileum und Colon von MC-Patienten im Vergleich zu den jeweils gesunden Kontrollen beschrieben (El-Jamal et al., 2014a). Es bedarf vor diesem Hintergrund weiterer quantitativer Analysen, um die gemessenen Daten zu bestätigen. Bei deutlich geringerer Probenanzahl (Kontrolle Ileum n=5, MC Ileum insgesamt n= 16) in den Analysen durch El-Jamal et al. müssen auch diese Daten kritisch hinterfragt werden. Grundsätzlich gibt es in der Literatur kaum vergleichbare Ergebnisse. Die durch uns gemessene erhöhte GLP-2R Expression im Ileum von MC Patienten kann unter Umständen einer Therapie mit Teduglutid zugutekommen. Zudem zeigte sich in Patienten mit Morbus Crohn eine erniedrigte GLP-2 Rezeptorexpression im Colon im Vergleich zum Ileum, was nicht dem Verteilungsmuster des GLP-2 Rezeptors in gesunden Probanden entspricht. Die erhöhte Expression des GLP-2R im Ileum von MC Patienten könnte auch auf erhöhte GLP-2 Blutkonzentrationen in Patienten mit MC (Xiao et al., 2000) zurückzuführen sein, zumal in Ratten gezeigt werden konnte, dass GLP-2 die Hochregulierung seines eigenen Rezeptors induziert (Liu et al., 2006). Weitere Ergebnisse bleiben abzuwarten. In Colon-Biopsien von Colitis ulcerosa Patienten konnten in der mRNA-Analyse des GLP-2R keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expressionslevel im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden. Tendenziell zeigte sich jedoch die GLP-2R Expression bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht. Erste quantitative Messungen im Colon von Colitis ulcerosa Patienten mit wesentlich geringerer Patientenzahl hatten eine 70%ige Reduktion des Rezeptors im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt (El-Jamal et al., 2014b). Da es aktuell keine weiteren vergleichbaren Ergebnisse gibt, werden hierzu

mehr Studien notwendig sein. Die beschriebene tendenzielle Erhöhung der GLP-2R Expression in Colitis ulcerosa Patienten könnte ein therapeutisches Ansprechen verbessern. Die Frage, ob die jeweiligen Unterschiede in der Rezeptorexpression eine Folge oder Ursache der chronischen Entzündung in Patienten mit CEDs sind, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

#### **4.1.2 Das humane Proglucagon im gesunden und erkrankten Magen-Darm-Trakt**

Das humane Proglucagon stellt das Vorläufermolekül des Glucagon-like peptide 2 dar. Durch die beiden Enzyme Prohormon Convertase 1 und 3 im GI-Trakt werden neben Glucagon unter anderem auch die Hormone GLP-1 und GLP-2 abgespalten und cosekretiert. Im GI-Trakt wird GLP-2 durch die Enteroendokrinen L-Zellen produziert und besitzt vielseitige intestinotrophe, antiapoptotische und antiinflammatorische Effekte (Bell et al., 1983; Drucker, 2003; Janssen et al., 2013; Patzelt and Schiltz, 1984; Sigalet et al., 2007). Der Hauptstimulus für die Ausschüttung des Hormons stellt, wie auch für die weiteren Peptide des Vorläufermoleküls hGCG, die Nahrungsaufnahme dar, wobei selbst bei Nahrungskarenz eine niedrige Basalrate an GLP-2 exprimiert wird (Brubaker et al., 1997).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das humane Proglucagon in signifikant höherer Konzentration im Ileum im Vergleich zum Colon exprimiert wird. Die Verteilung der Enteroendokrinen L-Zellen und folglich der Expression von hGCG ist aktuell Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen (Kuhre et al., 2021). Immunhistochemische Studien zeigten eine geringere Dichte an Enteroendokrinen L-Zellen im oberen GI-Trakt, welche in Richtung Rektum zunehmend anstieg (Guedes et al., 2015; Sjölund et al., 1983; Theodorakis et al., 2006). Allerdings kann mittels Zelldichtemessung keine Aussage zur absoluten Zellanzahl und zum Verteilungsmuster im GI-Trakt getroffen werden, zumal entnommene Proben immer nur einen winzigen Ausschnitt der Gesamtfläche widerspiegeln. Zudem stellt die Immunhistochemie eine zweidimensionale Methode dar, in welcher dreidimensionale Aspekte wie beispielweise die insgesamt wesentlich größere Dünndarmoberfläche durch Mikrovilli nicht erfasst werden. Wewer-Albrechtsen et al. versuchten durch

Bestimmung der GLP-1 Konzentration in unterschiedlichen Darmabschnitten von Mäusen, Ratten und Schweinen Aufschluss über das Verteilungsmuster der Enteroendokrinen L-Zellen zu gewinnen (Wewer Albrechtsen et al., 2016). Hierbei zeigte sich im GI-Trakt von Mäusen eine von proximal nach distal ansteigende GLP-1 Konzentration. Exakt gegenteilige Ergebnisse lieferten die Untersuchungen in Ratten. Die Limitation dieser Studie besteht in der geringen Gewebeprobenanzahl und der geringen untersuchten Fläche in Bezug auf die Gesamtoberfläche des Darmtraktes. Nauck konnte zeigen, dass die Konzentration von GLP-1 im Jejunum und Ileum um das Drei- bis Fünffache im Vergleich zum Colon und Rektum erhöht war (Nauck, 1998). Letztere Studie stimmt mit unseren Beobachtungen zur absoluten Kopienanzahl des humanen GCGs und der Verteilung im GI-Trakt überein. Jedoch kann hieraus keine Aussage zur Verteilung von Enteroendokrinen L-Zellen im Magen-Darm-Trakt getroffen werden. Zudem führten Zhou et al. Expressionsanalysen in Ratten durch und stellten die höchste Konzentration von GCG im Ileum fest (Zhou et al., 2006). Mittlerweile wurde gezeigt, dass es innerhalb der Enteroendokrinen L-Zellen Subpopulationen gibt, die jeweils ein unterschiedliches Repertoire an enteroendokrinen Hormonen produziert. Es mehren sich daher Stimmen, die L-Zellen in weitere Subpopulationen einzuteilen (Egerod et al., 2012; Kuhre et al., 2021). Die hier vorliegende quantitative hGCG-Analyse trägt dazu bei, das Expressionsmuster und den Ort der höchsten hGCG Liberation innerhalb des GI-Traktes besser einzuordnen zu können. Zudem kann in Zusammenschau mit weiteren Studien ein besseres Verständnis bezüglich Lokalisation und hGCG-Expression der Enteroendokrinen L-Zellreihe geschaffen werden.

Die Analyse der hGCG-mRNA-Expression in Patienten mit Morbus Crohn offenbarte erniedrigte Kopienanzahlen in Patienten mit aktiver Entzündungsaktivität bei MC, was für eine Herunterregulierung der Expression von hGCG im entzündeten Ileumgewebe spricht. In Colonbiopsien von MC-Patienten konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. Ebenso zeigten sich im Colongewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa keine signifikanten Expressionsunterschiede des Proglucagons. Xiao et al. untersuchten die Blutkonzentration von GLP-2 in Patienten mit aktivem MC und aktiver CU und konnten zeigen, dass diese für beide Patientengruppen gegenüber Kontrollprobanden erhöht war, zudem wiesen die

Patienten eine reduzierte Plasmaaktivität der DPP4 auf (Xiao et al., 2000). Es scheint eine gewisse Divergenz zwischen der Expression von hGCG und zirkulierendem GLP-2 im Blut von Patienten mit CEDs zu geben. Die erhöhte Plasmakonzentration von GLP-2 wird auch durch die reduzierte DPP4 Aktivität beeinflusst. Bloom und Polak konnten im Rahmen der Entdeckung des Proglucagons (damalige Bezeichnung: Enteroglucagon) ein erhöhtes Enteroglucagon bei sich regenerierendem Gewebe nach Verletzung, Entzündung oder Diarrhoe feststellen (Bloom and Polak, 1982). Die gemessenen reduzierten hGCG-Expressionslevel in akut entzündetem Ileumgewebe können demnach Ursache der Entzündungsreaktion und Verletzungen des Ileums sein. Im Rahmen der Erforschung molekularer Mechanismen sowie therapeutischer Ansatzpunkte in Patienten mit CEDs können die vorliegenden Ergebnisse einen Beitrag leisten.

#### **4.1.3 Die Expression der Sucrase Isomaltase in Patienten mit CED**

Die Sucrase-Isomaltase, eine Disaccharidase, ist das am höchsten exprimierte Transmembranprotein im Bürstensaum des GI-Traktes und kommt fast ausschließlich in den Enterozyten des Dünndarms sowie vereinzelt im Dickdarm vor (Gorvel et al., 1991; Naim et al., 1991, 1988). Skovbjerg et al. sowie Rana et al. konnten die höchste Aktivität und das höchste Vorkommen der Sucrase-Isomaltase im proximalen Jejunum, gefolgt von weiter distalen Anteilen des Dünndarms, lokalisieren (Rana et al., 2001; Skovbjerg, 1981). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression der Sucrase-Isomaltase im Hinblick auf veränderte Enterozytenproliferation und Lokalisation verwendet. Die Expressionsanalyse innerhalb gesunder Patienten konnte die signifikant höhere Expression des Bürstensaumenzym im Ileum bestätigen. Verschiedene Defekte oder verminderte Expression der Disaccharidase (primär oder sekundär) führen zu Krankheitsbildern wie dem kongenitalen Sucrase-Isomaltase Mangel und gehen mit Maldigestion und Malabsorption einher (Alfalah et al., 2009; Gericke et al., 2016; Heymann et al., 1995). In der durchgeführten Expressionsanalyse zeigte sich im Ileum von MC Patienten eine reduzierte SI Expression in Patienten mit akutem Entzündungsstatus im Vergleich zu Patienten ohne akute Entzündung, was mit den Ergebnissen von Ziambaras et al. übereinstimmt. Dies macht deutlich, dass die akute Inflammation im Ileum Einfluss auf die Enterozyten und deren Enzymexpression nimmt. Ziambaras et al. postulierten eine zytokinvermittelte

Herunterregulierung der Sucrase-Isomaltase durch IL1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Caco-2 Zellen (Ziambaras et al., 1996). Studien mit induzierter Colitis in Ratten führten zu einer signifikanten Abnahme der SI Expression und Aktivität und gingen mit einer veränderten intrazellulären Lokalisation einher (Amit-Romach et al., 2006). Neurath et al. erkannten als Ursache für die Darmbarrierestörung in Morbus Crohn im Allgemeinen eine Dysbalance zwischen anti- und proinflammatorischen Zytokinen. So wurde beispielweise IL8 als Marker für intestinale Inflammation etabliert (Neurath, 2014). In Zusammenschau der Ergebnisse mit bereits etablierten Modellen zur Pathogenese von Morbus Crohn ist die Reduktion der Sucrase-Isomaltase im Ileum von Morbus Crohn Patienten mit akuter Inflammation als Folge der Entzündung zu sehen. Hinweise für eine Rolle der Sucrase-Isomaltase in der Entstehung von CEDs gibt es aktuell nicht. Darüber hinaus gehen weitere intestinale Erkrankungen wie z.B. die glutensensitive Enteropathie mit einem Mangel an Sucrase-Isomaltase einher (Murray et al., 2001).

## **4.2 Tumorzellen, Kurzdarmpatienten und Mausorganoide - Welchen Einfluss nimmt Teduglutid auf die epitheliale Homöostase?**

### **4.2.1 Auswirkungen von Teduglutid auf die Karzinogenese**

Zahlreiche Studien haben sich in den letzten Jahren mit dem Einfluss von Teduglutid auf den GI-Trakt in Kurzdarmpatienten beschäftigt und dabei vielversprechende Erkenntnisse gewonnen. Gesteigerte Proliferation der Kryptenzellen, Reduktion der Apoptose des intestinalen Epithels, gesteigerter Blutfluss, verbesserte Nahrungsaufnahme und gesteigerte intestinale Barrierefunktion - um nur einige der positiv bewerteten Effekte des Hormons aufzuzählen (Boushey et al., 1999; Bremholm et al., 2011, 2009; Brubaker et al., 1997; Cani et al., 2009; Drucker et al., 1996). Hinsichtlich dieser intestinotropen Effekte und der Tatsache, dass GLP-2 induzierte Zellproliferation unter anderem durch Wachstumsfaktor-abhängige Signalwege erfolgt, stellt sich die Frage, ob Teduglutid ein erhöhtes Risiko in der gastrointestinalen Tumorentstehung birgt und ob Tumorzellen eine erhöhte Proliferation unter dem Einfluss des Medikaments aufweisen (Ørskov et al., 2005). Eine gesteigerte Caco-2 Zellzahl unter der Behandlung mit Teduglutid im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde durch Chaturvedi et al. nachgewiesen (Chaturvedi and Basson, 2013). Zudem

vermuteten die Autoren aufgrund der reduzierten Villin-, DPP-4 und SI-Expression eine Inhibierung der Epithelzellendifferenzierung. Entgegen diesen Beobachtungen konnten Koehler et al. feststellen, dass in Mäusen mit implantierten, GLP-2R exprimierenden Colonkarzinomen unter der Behandlung mit GLP-2 (2x täglich für 6 Wochen) kein Effekt auf das Tumorwachstum erkennbar war. Ebenso zeigten *Apc<sup>Min/+</sup>*-Mäuse nach Behandlung mit GLP-2 für 7 Wochen zwar ein gesteigertes Wachstum der physiologischen Darmmukosa, nicht aber der Anzahl oder Größe von Polypen (Koehler et al., 2008a). Thulsen et al. behandelten Mäuse mit 1,5µg Teduglutid zweimal täglich für 4 Wochen und stellten eine steigende Anzahl an kleinen und großen tubulären Adenomen fest (Thulsen et al., 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche mit Caco-2-, Hela-, HuCCT1-, HepG2- und A549-Zellen zeigten unter der 72-stündigen Inkubation mit Teduglutid eine tendenziell erhöhte Zellviabilität, was auf einen Einfluss von Teduglutid im Vergleich zum Kontrollmedium sowie zum verwendeten Kontrollreagenz hinweist. Ähnliche bzw. erhöhte proliferative Effekte zeigten sich unter der Behandlung mit EGF, wie dies durch Chaturvedi et al. postuliert wurde. Den stärksten positiven Einfluss auf die Zellviabilität zeigte das GLP-2 Analogon Teduglutid auf die HuCCT1-Zellen, gefolgt von HepG2-Zellen. Diese Entdeckung war überraschend, denn der GLP-2R konnte in HepG2- und HuCCT1-Zellen in unserer mRNA-Expressionsanalyse nicht nachgewiesen werden. Einen proliferativen Einfluss durch GLP-2 auf Caco-2-, T84, HT29- und SW480-Zellen ohne Nachweis einer GLP-2R Expression konnte in früheren Studien ebenfalls nachgewiesen werden (Jasleen et al., 2002; Masur et al., 2006). Es ist wahrscheinlich, dass neben der Wirkung über den GLP-2R auch andere Rezeptoren und Signalwege durch das GLP-2 Analogon stimuliert werden oder dass ein weiterer noch nicht identifizierter GLP-2 Rezeptor im GI-Trakt vorkommt.

Erste klinische Studien nach Anwendung von Teduglutid zwischen 6 und 30 Monaten zeigten in Patienten ohne bekannte maligne intestinale Vorerkrankung keinen Anstieg des Risikos von Neoplasien von GI-Trakt. Jedoch zeigte sich in einem Fall ein metastasiertes Adenokarzinom nach 11-monatiger Behandlung mit Teduglutid. (Armstrong et al., 2020; Ring et al., 2018; Schwartz et al., 2016; Tappenden et al., 2013).

In Zusammenschau der Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays und der Studien hinsichtlich des Einflusses von Teduglutid auf ein erhöhtes Risiko in der gastrointestinalen Tumorentstehung, werden weitere Follow-up Studien nach 5 und 10 Jahren der mit dem Medikament behandelten Patienten sowie Tier- und Zellversuche erforderlich sein. Aktuell lässt sich kein erhöhtes Risiko für eine Tumorentstehung in vivo feststellen, auch wenn dies anhand von Tierversuchen kontrovers diskutiert wird. Trotz allem ist Teduglutid bei Patienten mit bekannten intestinalen Tumorerkrankungen weiterhin kontraindiziert und eine koloskopische Untersuchung vor und während der Gabe von Teduglutid mit Entfernung der Poylpen wird angeraten.

Die Limitation der vorliegenden Daten liegt unter anderem in den verwendeten Dosen, der Dauer der Inkubation, der verwendeten Zelllinien und des Assays selbst. Letzterer misst die optische Zelldichte als Maß für die Viabilität der Zellen, kann aber keinen Nachweis zu gesteigerten molekularbiologischen Proliferationsmarkern oder Signalwegen erbringen. Zudem gibt es in der Literatur wenige vergleichbare Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss des Medikaments auf Tumorzellen befassen.

#### **4.2.2 Teduglutid in Patienten mit Kurzdarmsyndrom**

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Teduglutid in Patienten mit Kurzdarmsyndrom Einfluss auf spezifische Zytokine (IL10, TNF- $\alpha$ ), Proliferationsmarker (Ki67), den Zielrezeptor GLP-2R, die Expression des GLP-2 Präkusors Proglucagon, Panethzell-Peptide HD5 und HD6 sowie auf das Bürstensaumepithel (SI, Villin) nimmt (siehe hierzu die Abbildungen 21 und 22, Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Neben den klinisch und therapeutisch gut untersuchten Effekten stellt dies eine wesentliche Grundlage für die Erforschung bisher weitestgehend unbekannter molekularer Wirkmechanismen dar. He et al. konnten in isolierten humanen Inselzellverbänden des Pankreas zeigen, dass durch Teduglutid eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielweise IL10 und IL1B erfolgt. Diese führten sie auf eine Wechselwirkung zwischen Enteroendokrinen Zellen und Makrophagen zurück (He et al., 2021). Auch in Ratten konnte eine Reduktion der

Cytokine IL10 und TNF- $\alpha$  durch Teduglutid nachgewiesen werden (Martin et al., 2006; Sigalet et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals dieser Einfluss auf die Cytokine IL10 und TNF- $\alpha$  in vivo bestätigt werden, was auf einen antiinflammatorischen Effekt des GLP-2 Analogons hinweist. Tatsache ist, dass Teduglutid die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 10 und TNF- $\alpha$  in Mäusen und Ratten mit induzierter Colitis reduzierte (Alters et al., 2012; Boushey et al., 1999; Drucker et al., 1999, p. 2). Über welche Signalwege der antiinflammatorische Einfluss von GLP-2 bzw. Teduglutid zustande kommt, kann zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht beantwortet werden (Dubé and Brubaker, 2007). Jedoch gibt es diverse Ansatzpunkte, die einen Zusammenhang des Peptidhormons vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) als Mediator der antiinflammatorischen Effekte diskutieren. Die gesteigerte VIP Liberation wird auf PI3K, mTOR oder EKR1/2-abhängige Signalwege zurückgeführt (de Heuvel et al., 2012; Sigalet et al., 2007). Weitere Schlüsselspieler neben dem vasoaktiven intestinalen Polypeptid (VIP) stellen nach aktuellem Forschungsstand die Insulin-like growth factors (IGF1 und IGF2) sowie das ErbB-Netzwerk dar. Zudem wird der intestinalen L-Zelle nach aktuellem Forschungsstand eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Kuhre et al., 2021), also jener Zelle, die für die Bildung und Sekretion des körpereigenen Hormons GLP-2 sowie der weiteren Proglucagon-abhängigen Hormone verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit konnte eine tendenziell gesteigerte Proliferationsrate im Colon und Ileum während der Behandlung mit Teduglutid anhand der Ki67-Expression feststellen. Dies ist unter Berücksichtigung der bereits publizierten intestintropen Eigenschaften von GLP-2 und Teduglutid keine Überraschung und wurde von Dubé et al. in Mäusen ebenfalls nachgewiesen (Dubé et al., 2006). Die proliferativen Effekte halten somit auch nach langfristiger Einnahme des GLP-2 Analogons an. Interessanterweise zeigt die Analyse der Panethzell-Faktoren HD5 und HD6 unter Behandlung mit Teduglutid tendenziell eine Reduktion der Expression. Gleiches lässt die Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors Sox9 erkennen. Diese Daten geben Hinweise für eine Abnahme der Produktion antimikrobieller Peptide sowie einer geringeren Differenzierung von Paneth-Körnerzellen. Sox9, ein Ziel-Transkriptionsfaktor des Wnt-Signalwegs könnte somit einen Hinweis darauf geben, dass durch die Behandlung mit Teduglutid der Wnt-Signalweg involviert ist. Diese



Hypothese wird durch Beobachtungen durch Dubé et al. gestützt, welche einen indirekten Einfluss von GLP-2 in Mäusen über die Ausschüttung von IGF-1 aus perikryptischen Fibroblasten, Aktivierung des IGF-1 Rezeptors und folgend des Wnt-Signalwegs postulierten (Dubé et al., 2008). Aufgrund der geringen n-Zahl an Kurzdarmpatienten zum Zeitpunkt der Auswertung müssen hierzu weitere Studienergebnisse abgewartet werden. Zudem können größere individuelle Unterschiede innerhalb der behandelten Patienten, z.B. unterschiedliche Genese des Kurzdarmsyndroms und weitere Vorerkrankungen, zu einer fehlerhaften Analyse führen. Dies gilt für alle gemessenen Parameter. Der Stammzellmarker und Vertreter des Wnt-Signalwegs Lgr5 zeigte eine tendenzielle Abnahme der Expression, was für einen Einfluss des Medikaments auf die Stammzellnische spricht. In Mausversuchen konnte der protektive Einfluss einer Vorbehandlung mit GLP-2 bei anschließender Beschädigung des GI-Trakts durch Bestrahlung in Bezug auf die Stammzellen nachgewiesen werden (Booth et al., 2004). Weitere in vivo Tierversuche mit Mäusen konnten eine Zunahme der Proliferation innerhalb der Stammzellzone während der Behandlung mit GLP-2 beobachten (Dubé et al., 2008). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse müssen vor diesem Hintergrund kritisch hinterfragt werden. Ebenso wie die Hinweise für eine reduzierte Expression des Bürstensaumproteins Villin unter der Therapie mit Teduglutid. Drucker et al. und Blurring et al. stellten wie bereits erwähnt starke intestinotrophe Effekte, beispielweise Zunahme der mucosalen Oberfläche oder Reduktion der Apoptose der Villuszellen unter einer GLP-2 Behandlung fest (Burrin et al., 2005; Drucker et al., 1996). Zudem zeigen Studien von Markovic et al. in Mäusen eine signifikante erhöhte Villinexpression unter Behandlung mit GLP-2 (Markovic and Brubaker, 2019). Diese offensichtliche Inkongruenz kann durch die geringe Patientenzahl und die individuellen Unterschiede innerhalb der Patienten begründet sein. Weitere Studienergebnisse für eine aussagekräftige Bewertung bleiben abzuwarten.

Die Sucrase-Isomaltase zeigte eine beinahe gleichbleibende Expression vor und während der Behandlung mit Teduglutid mit minimaler Tendenz zur Zunahme während der Therapie (Abbildung 21c). Ein 1,6-facher Anstieg der Sucrase Isomaltase Expression konnte durch Kitchen et al. in Ratten nachgewiesen werden (Kitchen et al., 2000). Die zwar nur geringfügige Zunahme spricht für eine erhöhte Anzahl an Enterozyten im GI-Trakt, was wiederum mit einer erhöhten Resorptionsrate

einhergeht. Dies entspräche den bereits postulierten intestinotropen Effekte von Teduglutid (Kapitel 1.4). In unseren Untersuchungen zeigte sich zudem ein signifikanter Abfall des GLP-2R im Ileum nach längerfristiger Behandlung mit Teduglutid. Auch im Colon konnte dieser Effekt - allerdings ohne signifikant zu sein - beobachtet werden. Estall et al. konnten in Zellkulturversuchen mit GLP-2R-transfizierten Zellen zeigen, dass eine Desensitivierung des GLP-2R durch eine anhaltende GLP-2R Stimulation erfolgte.

Trotz der geringen Ileum- (n=7) und Colonbiopsien (n=5) ist von einer potenziellen Downregulation des GLP-2R unter dem Einfluss von Teduglutid auszugehen. Auffällig erscheint zudem die generell höhere Expression des GLP-2R im Ileumgewebe im Vergleich zum Colongewebe bei Kurzdarmpatienten (Abb. 21a) vor Behandlung mit Teduglutid im Vergleich zum Verteilungsmuster des GLP-2R in gesunden Probanden (siehe Abbildung 10). Bei Patienten mit Morbus Crohn konnten in Abbildung 15c vergleichbare Erkenntnisse gewonnen werden. Dies könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass 5 von 7 Ileum Gewebeproben von Patienten stammten, die als Grunderkrankung Morbus Crohn diagnostiziert hatten (siehe Kapitel 2.1.7.2). Aufgrund der geringen Patientenzahl und der innerhalb der Ileum-Gruppe hohen Streuung ist eine abschließende Beurteilung nicht möglich und erfordert weitere Untersuchungen zu den unterschiedlichen Signalwegen, in die der GLP-2R eingebunden ist.

Hinsichtlich dem Präkusorprotein hGCG (Abb. 21b) zeigt sich eine tendenziell erhöhte Expression im Ileum und Colon von Kurzdarmpatienten unter Behandlung mit Teduglutid, wobei den vorliegenden Ergebnissen keine Signifikanz zu entnehmen ist. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die körpereigene GLP-2 Ausschüttung durch die Zufuhr von Teduglutid nicht beeinträchtigt wird. Dies wäre insofern nicht überraschend, da die Sekretion von GLP-2 maßgeblich von der Nahrungsaufnahme abhängt und durch langkettige Fettsäuren im Dünndarm induziert wird (Brubaker and Anini, 2003; Xiao et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit gibt erste Einblicke in die komplexen Netzwerke und Signalwege, welche mit dem GLP-2 Analogon Teduglutid in Verbindung stehen. Die Ergebnisse leisten trotz der geringen Anzahl an Gewebeproben (Ileum n=7, Colon n=5) einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Teduglutid sowie zu ausgewählten, nachgeschalteten Mediatoren. Wir stehen gerade erst am Anfang, was die genaue

Wirkweise und die komplexen zugrundeliegenden Mechanismen dieses intestinotropen Hormons angeht. Entscheidende Limitationen dieser Untersuchung sind neben der untersuchten n-Zahl auch die Inhomogenität innerhalb der Patienten mit Kurzdarmsyndrom hinsichtlich Vorerkrankungen, Größe der Resektion des Darms, Vormedikation und Nüchternheit vor der durchgeführten Koloskopie.

#### **4.2.3 Mausorganoide nach Stimulation mit Teduglutid**

Organoide sind „Mini-Därme“, die in Zellkulturen anzüchtbar sind. Sie beinhalten alle Zellen der intestinalen Krypten und können daher als 3D-Modell die Stammzellnische nachbilden. Allerdings gilt zu beachten, dass Einflüsse der darunterliegenden Gewebeschichten sowie umgebenden Immunzellen nicht berücksichtigt werden können und sich das Immunsystem von Mäusen und Menschen - aufgrund unterschiedlichster Anpassungen über Millionen von Jahren - unterscheidet (Mestas and Hughes, 2004). Murine Organoide können ein humanes intestinales System nicht ersetzen, allerdings stellen sie vor dem Hintergrund der oben genannten Unterschiede eine unverzichtbare Methode für proof of principal Studien dar.

Ein negativer Feedback-Mechanismus der GLP-2R Expression unter der Behandlung mit Teduglutid wie unter Kapitel 4.3 bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom beschrieben lässt sich nach 48- und 72-stündiger Stimulation muriner Organoide zwar nicht darstellen, jedoch zeigt sich in der Tendenz der Ergebnisse eine minimale Deduktion der Expression (n=6, Abbildung 23a). Vergleichbare Daten hierzu gibt es in der aktuellen Literatur nicht. Interessanterweise zeigten El-Jamal et al, dass der GLP-2R im Colon von Mäusen deutlich höher exprimiert wird als im Ileum. Dies entspricht den Ergebnissen unserer Untersuchungen zum Verteilungsmuster des GLP-2R im humanen Darmtrakt (El-Jamal et al., 2014b). Weitere Studien mit längerer Teduglutid Stimulationsdauer der Mausorganoide und in vivo Untersuchungen an Mäusen mit differenzierter Betrachtung von Ileum und Colon könnten unsere Beobachtungen untermauern. Einen Einfluss von Teduglutid auf mCryptidin4 und mKi67 konnte weder in den absoluten Kopienzahlen noch im Fold Change nachgewiesen werden. Die einzige statistisch signifikante Veränderung zeigte die Induktion von mLgr5 nach 48h Inkubationszeit mit Teduglutid (p= 0,03, Abb. 23c). Im Kurzdarmpatientenkollektiv (Abb. 22c) wurde ein gegenteiliger Trend beobachtet. Diese Beobachtung ist aufgrund oben genannter Limitationen kritisch zu hinterfragen. Wie durch Courth et al.

dargestellt, spielen insbesondere das intestinale Mikrobiom und die Einflüsse des gesamten Organismus eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Stammzellnische. Zudem könnte sich die Induktion des Stammzellmarkers Lgr5 auf die sich proliferierenden Mausorganoide zurückführen lassen, zumal sich die künstlichen Minidärme und deren Stammzellnische in stetigem Wachstum befinden (Courth et al., 2015b; Rowland and Brubaker, 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass Teduglutid Einfluss auf verschiedene - bis dahin wenig beachtete - Mediatoren nimmt, welche alle für sich genommen Teil eines komplexen und vielschichtigen Netzwerks sind. Gerade im Hinblick auf eine angewandte, individuelle Medizin und deren Nebenwirkungen werden molekulare Mediatoren im Rahmen einer medikamentösen Behandlung einen Beitrag leisten können. Zukünftige Studien sollten nicht nur neue Anwendungsmöglichkeiten der GLP-2 Analoga untersuchen, sondern auch ein wesentliches Augenmerk auf die zugrundeliegenden Mechanismen richten.

## 5 Zusammenfassung

Der epithelialen Homöostase im Dün- und Dickdarm kommt im kranken und gesunden Gewebe eine entscheidende Bedeutung zu. Insbesondere bei Erkrankungen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa kommt es zu einer Dysbalance des intestinalen Mikrobioms, wodurch proinflammatorische Prozesse in Gang gesetzt und aufrechterhalten werden. Dies hat zur Folge, dass Patienten mit CEDs eine 6-fach erhöhte Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung gastrointestinaler Tumorerkrankungen haben. Durch neue therapeutische Möglichkeiten wie der Behandlung mit dem intestinotropen GLP-2 Agonist Teduglutid stehen auch außerhalb der Zulassung für das Kurzdarmsyndrom neue Ansätze zur Therapie intestinaler Erkrankungen zur Verfügung. Hierbei ist es wichtig, dass molekulare Wirkmechanismen und die zugrundeliegenden Einflüsse auf das intestinale Epithel verstanden und auch mögliche unerwünschte Effekte frühzeitig detektiert werden.

In einem ersten Schritt konnte mithilfe der qRT-PCR-Analyse von Ileum- und Colongewebeproben gesunder Probanden dargelegt werden, dass der Zielrezeptor GLP-2R des Medikaments Teduglutid im Colon deutlich höher exprimiert wird als im Ileum. Vor dem Hintergrund einer therapeutischen Anwendung kommt damit dem Colon eine Schlüsselrolle zu. Zudem konnte mittels durchgeführter Doppelimmunfluoreszenz mit Synaptophysin kein GLP-2R in den Enteroendokrinen Zellen des Ileums und Colons nachgewiesen werden, wie dies durch einige Autoren postuliert wurde. Eine erhöhte Expression des Rezeptors im Colongewebe konnte immunhistochemisch bestätigt werden.

Im nächsten Schritt wurde das Verteilungsmuster des GLP-2R in Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa untersucht: So zeigte sich im Ileum von Morbus Crohn Patienten eine signifikant erhöhte Rezeptorexpression gegenüber dem Colon, die unabhängig vom Entzündungsstatus war. Umgekehrt verhielt es sich mit der Rezeptorexpression im Colon von Morbus Crohn Patienten, wobei dieser Effekt auf jene Colon-Gewebeproben mit aktiver Inflammation zurückzuführen war. Die Analyse der Colon-Gewebeproben von Colitis ulcerosa Patienten zeigte keine signifikanten

Unterschiede zur Rezeptorexpression in gesundem Gewebe. Die Frage, ob die jeweiligen Unterschiede in der Rezeptorexpression eine Folge der chronischen Entzündung oder Ursache der chronischen Entzündung in Patienten mit CEDs sind, kann an dieser Stelle noch nicht beantwortet werden. Jedenfalls könnte der GLP-2R bzw. der GLP-2R exprimierende Zelltyp in Patienten mit Morbus Crohn zunehmend in den Fokus der zugrundeliegenden Pathogenese rücken.

Ziel dieser Arbeit war es zudem, direkte und indirekte Einflüsse des GLP-2 Analogons Teduglutid anhand von Mediatoren, Enzymen und zellspezifischen Markern genauer zu analysieren. Dies erfolgte mittels der in vivo Zellkulturmethode muriner Organoiden sowie Gewebeproben von Kurzdarmpatienten. Im Ileum von Patienten mit Kurzdarmsyndrom konnte festgestellt werden, dass unter Therapie mit Teduglutid die Expression des GLP-2R reduziert war. In Bezug auf die Ergebnisse des GLP-2R kann der Mechanismus einer negativen Rückkopplung diskutiert werden. In der Tendenz (jedoch ohne Signifikanz) lässt sich dieses Ergebnis auch im Colon von Kurzdarmpatienten sowie in Mausorganoiden darstellen. Des Weiteren konnte eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine (IL-10, TNF- $\alpha$ ) unter der Behandlung mit Teduglutid bei Kurzdarmpatienten beobachtet werden. Dies würde in Zusammenhang mit CEDs einen günstigen Ausgangspunkt darstellen. Allerdings gilt zu beachten, dass aufgrund der geringen Patientenanzahl in der vorliegenden Arbeit eine Verallgemeinerung der Ergebnisse nicht möglich ist.

In einem letzten Schritt sollten mögliche proliferative und apoptotische Effekte von Teduglutid auf ausgewählte Tumorzellen eruiert werden. Hierbei zeigte sich lediglich für die Zelllinie HuCCT1 im SRB-Test eine erhöhte Zellviabilität im Vergleich zur Mediumkontrolle. Für alle weiteren Zelllinien konnte dies nicht nachgewiesen werden. Insgesamt lässt sich kein tumorproliferativer Effekt nachweisen, wobei in Zukunft in vivo Daten hierzu Sicherheit geben müssen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abreu, M.T., 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144. <https://doi.org/10.1038/nri2707>
- Al Nabhani, Z., Lepage, P., Mauny, P., Montcuquet, N., Roy, M., Le Roux, K., Dussaillant, M., Berrebi, D., Hugot, J.-P., Barreau, F., 2016. Nod2 Deficiency Leads to a Specific and Transmissible Mucosa-associated Microbial Dysbiosis Which Is Independent of the Mucosal Barrier Defect. *J Crohns Colitis* 10, 1428–1436. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw095>
- Alfalah, M., Keiser, M., Leeb, T., Zimmer, K.-P., Naim, H.Y., 2009. Compound heterozygous mutations affect protein folding and function in patients with congenital sucrase-isomaltase deficiency. *Gastroenterology* 136, 883–892. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.11.038>
- Al-Nafussi, A.I., Wright, N.A., 1982. The effect of epidermal growth factor (EGF) on cell proliferation of the gastrointestinal mucosa in rodents. *Virchows Arch., B, Cell Pathol.* 40, 63–69. <https://doi.org/10.1007/bf02932851>
- Alters, S.E., McLaughlin, B., Spink, B., Lachinyan, T., Wang, C., Podust, V., Schellenberger, V., Stemmer, W.P.C., 2012. GLP2-2G-XTEN: a pharmaceutical protein with improved serum half-life and efficacy in a rat Crohn's disease model. *PLoS One* 7, e50630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050630>
- Amato, A., Baldassano, S., Serio, R., Mulè, F., 2009. Glucagon-like peptide-2 relaxes mouse stomach through vasoactive intestinal peptide release. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G678-684. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90587.2008>
- Amit-Romach, E., Reifen, R., Uni, Z., 2006. Mucosal function in rat jejunum and ileum is altered by induction of colitis. *Int J Mol Med* 18, 721–727.
- Andersson, M.L., Karlsson-Sjöberg, J.M.T., Pütsep, K.L.-A., 2012. CRS-peptides: unique defense peptides of mouse Paneth cells. *Mucosal Immunol* 5, 367–376. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.22>
- Armstrong, D., Forbes, A., Jeppesen, P.B., Lee, H.-M., Nagy, P., Seidner, D.L., 2020. Colon polyps in patients with short bowel syndrome before and after teduglutide: Post hoc analysis of the STEPS study series. *Clin Nutr* 39, 1774–1777. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.08.020>
- Autenrieth, I., 2003. Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 1, 14–17.
- B. Messing, F. Joly, PB Jeppesen, 2006. Short bowel syndrome (Kapitel 6). In: Bozzetti F., Staun M. and Van Gossum A., eds. *Home parenteral nutrition*, 1ed. Wallingford: CABI, 2006: 57-78. CABI.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., van den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P.J., Wright, N., Poulsom, R., Clevers, H., 2010. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build

- long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6, 25–36.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., Clevers, H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Bell, G.I., Santerre, R.F., Mullenbach, G.T., 1983. Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302, 716–718.  
<https://doi.org/10.1038/302716a0>
- Benjamin, M.A., McKay, D.M., Yang, P.C., Cameron, H., Perdue, M.H., 2000. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut* 47, 112–119.  
<https://doi.org/10.1136/gut.47.1.112>
- Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M., Petersen, O.W., 2002. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 70, 537–546. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700907.x>
- Biteau, B., Jasper, H., 2011. EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* 138, 1045–1055.  
<https://doi.org/10.1242/dev.056671>
- Blaut, M., Clavel, T., 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J. Nutr.* 137, 751S–5S.
- Bloom, S.R., Polak, J.M., 1982. The hormonal pattern of intestinal adaptation. A major role for enteroglucagon. *Scand J Gastroenterol Suppl* 74, 93–103.
- Boj, S.F., Hwang, C.-I., Baker, L.A., Chio, I.I.C., Engle, D.D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M.S., Gracanic, A., Oni, T., Yu, K.H., van Boxtel, R., Huch, M., Rivera, K.D., Wilson, J.P., Feigin, M.E., Öhlund, D., Handly-Santana, A., Ardito-Abraham, C.M., Ludwig, M., Elyada, E., Alagesan, B., Biffi, G., Yordanov, G.N., Delcuze, B., Creighton, B., Wright, K., Park, Y., Morsink, F.H.M., Molenaar, I.Q., Borel Rinkes, I.H., Cuppen, E., Hao, Y., Jin, Y., Nijman, I.J., Iacobuzio-Donahue, C., Leach, S.D., Pappin, D.J., Hammell, M., Klimstra, D.S., Basturk, O., Hruban, R.H., Offerhaus, G.J., Vries, R.G.J., Clevers, H., Tuveson, D.A., 2015. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160, 324–338.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.021>
- Bonen, D.K., Ogura, Y., Nicolae, D.L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F.F., Foster, S.J., Duerr, R.H., Brant, S.R., Cho, J.H., Nuñez, G., 2003. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124, 140–146.  
<https://doi.org/10.1053/gast.2003.50019>
- Booth, C., Booth, D., Williamson, S., Demchyshyn, L.L., Potten, C.S., 2004. Teduglutide ([Gly2]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif* 37, 385–400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2004.00320.x>
- Boushey, R.P., Yusta, B., Drucker, D.J., 1999. Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis. *Am. J. Physiol.* 277, E937-947.
- Bremholm, L., Hornum, M., Andersen, U.B., Hartmann, B., Holst, J.J., Jeppesen, P.B., 2011. The effect of Glucagon-Like Peptide-2 on mesenteric blood flow



- and cardiac parameters in end-jejunosomy short bowel patients. *Regul. Pept.* 168, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.03.003>
- Bremholm, L., Hornum, M., Henriksen, B.M., Larsen, S., Holst, J.J., 2009. Glucagon-like peptide-2 increases mesenteric blood flow in humans. *Scand. J. Gastroenterol.* 44, 314–319. <https://doi.org/10.1080/00365520802538195>
- Brubaker, P.L., Anini, Y., 2003. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81, 1005–1012. <https://doi.org/10.1139/y03-107>
- Brubaker, P.L., Crivici, A., Izzo, A., Ehrlich, P., Tsai, C.H., Drucker, D.J., 1997. Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology* 138, 4837–4843. <https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5482>
- Buchman, A.L., 2006. Etiology and initial management of short bowel syndrome. *Gastroenterology* 130, S5–S15. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.07.063>
- Burrin, D.G., Stoll, B., Guan, X., Cui, L., Chang, X., Holst, J.J., 2005. Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. *Endocrinology* 146, 22–32. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1119>
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E., 1988. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8790–8794.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., Liu, Q., 2011. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11452–11457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106083108>
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G., Zweibaum, A., 1988. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 48, 1936–1942.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., Rousset, M., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of cell science* 107, 213–225.
- Chaturvedi, L.S., Basson, M.D., 2013. Glucagonlike Peptide 2 Analogue Teduglutide. *JAMA Surg* 148, 1037–1042. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.3731>
- Chen, X., Cho, D.-B., Yang, P.-C., 2010. Double staining immunohistochemistry. *N Am J Med Sci* 2, 241–245. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2241>
- Chistiakov, D.A., Bobryshev, Y.V., Kozarov, E., Sobenin, I.A., Orekhov, A.N., 2015. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Front Microbiol* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00781>
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Cinci, L., Fausone-Pellegrini, M.S., Rotondo, A., Mulè, F., Vannucchi, M.G., 2011. GLP-2 receptor expression in excitatory and inhibitory enteric neurons and its

- role in mouse duodenum contractility. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, e383-392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01750.x>
- Courth, L.F., Ostaff, M.J., Mailänder-Sánchez, D., Malek, N.P., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2015a. Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 14000–14005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510084112>
- Courth, L.F., Ostaff, M.J., Mailänder-Sánchez, D., Malek, N.P., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2015b. Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 14000–14005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510084112>
- Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., Huot, L., Grandjean, T., Bressenot, A., Delanoye-Crespin, A., Gaillot, O., Schreiber, S., Lemoine, Y., Ryffel, B., Hot, D., Nùñez, G., Chen, G., Rosenstiel, P., Chamaillard, M., 2013. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 700–711. <https://doi.org/10.1172/JCI62236>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- DaCampa, M.P., Yusta, B., Sumner-Smith, M., Crivici, A., Drucker, D.J., Brubaker, P.L., 2000. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. *Biochemistry* 39, 8888–8894. <https://doi.org/10.1021/bi000497p>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., Colombel, J.-F., 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- Date, S., Sato, T., 2015. Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125218>
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- de Heuvel, E., Wallace, L., Sharkey, K.A., Sigalet, D.L., 2012. Glucagon-like peptide 2 induces vasoactive intestinal polypeptide expression in enteric neurons via phosphatidylinositol 3-kinase- $\gamma$  signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E994-1005. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00291.2012>
- de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegerbarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., Stange, D.E., van Es, J.E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R.B.M., Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Clevers, H., 2011. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293–297. <https://doi.org/10.1038/nature10337>
- Dibb, M., Soop, M., Teubner, A., Shaffer, J., Abraham, A., Carlson, G., Lal, S., 2017. Survival and nutritional dependence on home parenteral nutrition: Three decades of experience from a single referral centre. *Clin Nutr* 36, 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.01.028>

- Drucker, D.J., 2003. Glucagon-Like Peptides: Regulators of Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. *Molecular Endocrinology* 17, 161–171. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0306>
- Drucker, D.J., Erlich, P., Asa, S.L., Brubaker, P.L., 1996. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7911–7916. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7911>
- Drucker, D.J., Yusta, B., Boushey, R.P., DeForest, L., Brubaker, P.L., 1999. Human [Gly2]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am J Physiol* 276, G79-91. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.1.G79>
- Dubé, P.E., Brubaker, P.L., 2007. Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E460-465. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00149.2007>
- Dubé, P.E., Forse, C.L., Bahrami, J., Brubaker, P.L., 2006. The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* 131, 589–605. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.05.055>
- Dubé, P.E., Rowland, K.J., Brubaker, P.L., 2008. Glucagon-like peptide-2 activates beta-catenin signaling in the mouse intestinal crypt: role of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 149, 291–301. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0561>
- Duchmann, R., May, E., Heike, M., Knolle, P., Neurath, M., Meyer zum Büschenfelde, K.H., 1999. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 44, 812–818.
- Dupont, A., Heinbockel, L., Brandenburg, K., Hornef, M.W., 2014. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes* 5, 761–765. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972238>
- Dürr, M., Peschel, A., 2002. Chemokines Meet Defensins: the Merging Concepts of Chemoattractants and Antimicrobial Peptides in Host Defense. *Infect Immun* 70, 6515–6517. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6515-6517.2002>
- Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Grunddal, K.V., Nøhr, M.K., Secher, A., Sakata, I., Pedersen, J., Windeløv, J.A., Füchtbauer, E.-M., Olsen, J., Sundler, F., Christensen, J.P., Wierup, N., Olsen, J.V., Holst, J.J., Zigman, J.M., Poulsen, S.S., Schwartz, T.W., 2012. A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. *Endocrinology* 153, 5782–5795. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1595>
- Eisenhauer, P.B., Lehrer, R.I., 1992. Mouse neutrophils lack defensins. *Infect. Immun.* 60, 3446–3447.
- El-Jamal, N., Erdual, E., Neunlist, M., Koriche, D., Dubuquoy, C., Maggioro, F., Chevalier, J., Berrebi, D., Dubuquoy, L., Boulanger, E., Cortot, A., Desreumaux, P., 2014a. Glucacon-like peptide-2: broad receptor expression, limited therapeutic effect on intestinal inflammation and novel role in liver regeneration. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 307, G274–G285. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00389.2012>
- El-Jamal, N., Erdual, E., Neunlist, M., Koriche, D., Dubuquoy, C., Maggioro, F., Chevalier, J., Berrebi, D., Dubuquoy, L., Boulanger, E., Cortot, A., Desreumaux, P., 2014b. Glucacon-like peptide-2: broad receptor expression, limited therapeutic effect on intestinal inflammation and novel role in liver

- regeneration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G274-285.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00389.2012>
- Elphick, D., Liddell, S., Mahida, Y.R., 2008. Impaired luminal processing of human defensin-5 in Crohn's disease: persistence in a complex with chymotrypsinogen and trypsin. *Am. J. Pathol.* 172, 702–713.  
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070755>
- Elphick, D.A., Mahida, Y.R., 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54, 1802–1809.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2005.068601>
- Engelstoft, M.S., Egerod, K.L., Lund, M.L., Schwartz, T.W., 2013. Enteroendocrine cell types revisited. *Curr Opin Pharmacol* 13, 912–921.  
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.018>
- Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Hansson, G.C., 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G341-347. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2013>
- European Medicine Agency, 2017. Revestive (Teduglutid).
- Farrell, R.E., 2017. RNA methodologies: laboratory guide for isolation and characterization, Fifth edition. ed. Academic Press, an imprint of Elsevier, London ; San Diego, CA.
- Fleming, A., Wright, A.E., 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 93, 306–317.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1922.0023>
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221–226. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>
- Gerd Herold und Mitarbeiter, n.d. *Innere Medizin 2020 - Eine vorlesungsorientierte Darstellung [WWW Document]*. URL (accessed 4.1.20).
- Gericke, B., Amiri, M., Naim, H.Y., 2016. The multiple roles of sucrase-isomaltase in the intestinal physiology. *Mol Cell Pediatr* 3, 2. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0033-y>
- Gorvel, J.P., Ferrero, A., Bonicel, J., Rigal, A., 1991. Expression of Sucrase-Isomaltase and Dipeptidylpeptidase IV in Human Small Intestine and Colon 101, 8.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Baban, K., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C., Choe, S., 2003. Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 52–58. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300003-00010>
- Guan, X., Karpen, H.E., Stephens, J., Bukowski, J.T., Niu, S., Zhang, G., Stoll, B., Finegold, M.J., Holst, J.J., Hadsell, D.L., Nichols, B.L., Burrin, D.G., 2006. GLP-2 Receptor Localizes to Enteric Neurons and Endocrine Cells Expressing Vasoactive Peptides and Mediates Increased Blood Flow. *Gastroenterology* 130, 150–164. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.005>
- Guan, X., Shi, X., Li, X., Chang, B., Wang, Y., Li, D., Chan, L., 2012. GLP-2 receptor in POMC neurons suppresses feeding behavior and gastric motility. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E853-864.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00245.2012>

- Guarner, F., Malagelada, J.-R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512–519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Guedes, T.P., Martins, S., Costa, M., Pereira, S.S., Morais, T., Santos, A., Nora, M., Monteiro, M.P., 2015. Detailed characterization of incretin cell distribution along the human small intestine. *Surg Obes Relat Dis* 11, 1323–1331. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2015.02.011>
- Gulati, A.S., Shanahan, M.T., Arthur, J.C., Grossniklaus, E., von Furstenberg, R.J., Kreuk, L., Henning, S.J., Jobin, C., Sartor, R.B., 2012. Mouse background strain profoundly influences Paneth cell function and intestinal microbial composition. *PLoS One* 7, e32403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032403>
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J.M., 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707–5713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008557200>
- Hartmann, B., Harr, M.B., Jeppesen, P.B., Wojdemann, M., Deacon, C.F., Mortensen, P.B., Holst, J.J., 2000. In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2884–2888. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.8.6717>
- He, W., Rebello, O.D., Henne, A., Nikolka, F., Klein, T., Maedler, K., 2021. GLP-2 Is Locally Produced From Human Islets and Balances Inflammation Through an Inter-Islet-Immune Cell Crosstalk. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 697120. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.697120>
- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scand J Gastroenterol* 49, 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Heymann, H., Breitmeier, D., Günther, S., 1995. Human small intestinal sucrase-isomaltase: different binding patterns for malto- and isomaltooligosaccharides. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 249–253.
- Hofstetter, S., Stern, L., Willet, J., 2013. Key issues in addressing the clinical and humanistic burden of short bowel syndrome in the US. *Curr Med Res Opin* 29, 495–504. <https://doi.org/10.1185/03007995.2013.784700>
- Holst, J.J., Bersani, M., Johnsen, A.H., Kofod, H., Hartmann, B., Orskov, C., 1994. Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *J. Biol. Chem.* 269, 18827–18833.
- Howard, L., 2006. Home parenteral nutrition: survival, cost, and quality of life. *Gastroenterology* 130, S52-59. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.09.065>
- Howard, L., Ament, M., Fleming, C.R., Shike, M., Steiger, E., 1995. Current use and clinical outcome of home parenteral and enteral nutrition therapies in the United States. *Gastroenterology* 109, 355–365. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90321-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90321-6)
- Høyerup, P., Hellström, P.M., Schmidt, P.T., Brandt, C.F., Askov-Hansen, C., Mortensen, P.B., Jeppesen, P.B., 2013. Glucagon-like peptide-2 stimulates mucosal microcirculation measured by laser Doppler flowmetry in end-jejunosomy short bowel syndrome patients. *Regul. Pept.* 180, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.10.002>
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S.W., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., Vries, R.G., Grompe, M., Clevers, H., 2013. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced

- by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.  
<https://doi.org/10.1038/nature11826>
- Imaoka, A., Matsumoto, S., Setoyama, H., Okada, Y., Umesaki, Y., 1996. Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. *Eur. J. Immunol.* 26, 945–948.  
<https://doi.org/10.1002/eji.1830260434>
- Inohara, Chamillard, McDonald, C., Nuñez, G., 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 355–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133347>
- Janssen, P., Rotondo, A., Mulé, F., Tack, J., 2013. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37, 18–36.  
<https://doi.org/10.1111/apt.12092>
- Jasleen, J., Ashley, S.W., Shimoda, N., Zinner, M.J., Whang, E.E., 2002. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. *Dig Dis Sci* 47, 1135–1140. <https://doi.org/10.1023/a:1015062712767>
- Jeejeebhoy, K.N., 2002. Short bowel syndrome: a nutritional and medical approach. *CMAJ* 166, 1297–1302.
- Jeppesen, P.B., Gilroy, R., Pertkiewicz, M., Allard, J.P., Messing, B., O’Keefe, S.J., 2011. Randomised placebo-controlled trial of teduglutide in reducing parenteral nutrition and/or intravenous fluid requirements in patients with short bowel syndrome. *Gut* 60, 902–914. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.218271>
- Jeppesen, P.B., Hartmann, B., Thulesen, J., Graff, J., Lohmann, J., Hansen, B.S., Tofteng, F., Poulsen, S.S., Madsen, J.L., Holst, J.J., Mortensen, P.B., 2001. Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology* 120, 806–815.  
<https://doi.org/10.1053/gast.2001.22555>
- Jeppesen, P.B., Langholz, E., Mortensen, P.B., 1999. Quality of life in patients receiving home parenteral nutrition. *Gut* 44, 844–852.  
<https://doi.org/10.1136/gut.44.6.844>
- Jeppesen, P.B., Mortensen, P.B., 2000. Intestinal failure defined by measurements of intestinal energy and wet weight absorption. *Gut* 46, 701–706.  
<https://doi.org/10.1136/gut.46.5.701>
- Jeppesen, P.B., Pertkiewicz, M., Messing, B., Iyer, K., Seidner, D.L., O’keefe, S.J.D., Forbes, A., Heinze, H., Joelsson, B., 2012. Teduglutide reduces need for parenteral support among patients with short bowel syndrome with intestinal failure. *Gastroenterology* 143, 1473-1481.e3.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.007>
- Jeppesen, P.B., Sanguinetti, E.L., Buchman, A., Howard, L., Scolapio, J.S., Ziegler, T.R., Gregory, J., Tappenden, K.A., Holst, J., Mortensen, P.B., 2005. Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients. *Gut* 54, 1224–1231. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.061440>
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., Hansson, G.C., 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 Suppl 1, 4659–4665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., Hansson, G.C., 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 352–361.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>

- Jones, D.E., Bevins, C.L., 1993. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett.* 315, 187–192.
- Karlsson, J., Pütsep, K., Chu, H., Kays, R.J., Bevins, C.L., Andersson, M., 2008. Regional variations in Paneth cell antimicrobial peptide expression along the mouse intestinal tract. *BMC Immunol* 9, 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-37>
- Kitchen, P.A., Fitzgerald, A.J., Goodlad, R.A., Barley, N.F., Ghatei, M.A., Legon, S., Bloom, S.R., Price, A., Walters, J.R., Forbes, A., 2000. Glucagon-like peptide-2 increases sucrase-isomaltase but not caudal-related homeobox protein-2 gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G425-428. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.3.G425>
- Koch, S., Nusrat, A., 2012. The Life and Death of Epithelia During Inflammation: Lessons Learned from the Gut. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7, 35–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-120905>
- Koehler, J.A., Harper, W., Barnard, M., Yusta, B., Drucker, D.J., 2008a. Glucagon-like peptide-2 does not modify the growth or survival of murine or human intestinal tumor cells. *Cancer Res.* 68, 7897–7904. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0029>
- Koehler, J.A., Harper, W., Barnard, M., Yusta, B., Drucker, D.J., 2008b. Glucagon-like peptide-2 does not modify the growth or survival of murine or human intestinal tumor cells. *Cancer Res.* 68, 7897–7904. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0029>
- Koehler, J.A., Yusta, B., Drucker, D.J., 2005. The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. *Mol. Endocrinol.* 19, 459–473. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0196>
- Koenen, M., Rütger, U., Müller-Hill, B., 1982. Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the lac Z gene of *E. coli*. *EMBO J* 1, 509–512.
- Koffeman, G.I., van Gemert, W.G., George, E.K., Veenendaal, R.A., 2003. Classification, epidemiology and aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 879–893. [https://doi.org/10.1016/s1521-6918\(03\)00099-4](https://doi.org/10.1016/s1521-6918(03)00099-4)
- Kolos, Y.A., Grigoriyev, I.P., Korzhevskiy, D.E., 2015. [A synaptic marker synaptophysin]. *Morfologiya* 147, 78–82.
- Körner, M., Rehmann, R., Reubi, J.C., 2012. GLP-2 receptors in human disease: High expression in gastrointestinal stromal tumors and Crohn's disease. *Molecular and Cellular Endocrinology* 364, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.008>
- Koslowski, M.J., Teltschik, Z., Beisner, J., Schaeffeler, E., Wang, G., Kübler, I., Gersemann, M., Cooney, R., Jewell, D., Reinisch, W., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Schwab, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2012. Association of a Functional Variant in the Wnt Co-Receptor LRP6 with Early Onset Ileal Crohn's Disease. *PLOS Genetics* 8, e1002523. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002523>
- Kuhre, R.E., Deacon, C.F., Holst, J.J., Petersen, N., 2021. What Is an L-Cell and How Do We Study the Secretory Mechanisms of the L-Cell? *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 694284. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.694284>
- Langlands, A.J., Almet, A.A., Appleton, P.L., Newton, I.P., Osborne, J.M., Näthke, I.S., 2016. Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells

- Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biol.* 14, e1002491. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002491>
- Latorre, M., 2015. Microbiome as mediator: Do systemic infections start in the gut? *World Journal of Gastroenterology* 21, 10487. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10487>
- Laurin, M., Everett, M.L., Parker, W., 2011. The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture. *Anat Rec (Hoboken)* 294, 567–579. <https://doi.org/10.1002/ar.21357>
- Lehrer, R.I., Ganz, T., 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 96–102. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00303-x](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00303-x)
- Ley, R.E., 2010. Obesity and the human microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 5–11. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328333d751>
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713–726. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00148-3)
- Lippert, H., 2000. *Lehrbuch Anatomie*, 5th ed. Urban & Fischer Verlag.
- Liu, L., Wang, L., Jia, H.P., Zhao, C., Heng, H.H.Q., Schutte, B.C., McCray Jr., P.B., Ganz, T., 1998. Structure and mapping of the human  $\beta$ -defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222, 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00480-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00480-6)
- Liu, X., Nelson, D.W., Holst, J.J., Ney, D.M., 2006. Synergistic effect of supplemental enteral nutrients and exogenous glucagon-like peptide 2 on intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome. *Am J Clin Nutr* 84, 1142–1150. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1142>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J., Gonzalez, A., Ackermann, G., Wendel, D., Vazquez-Baeza, Y., Jansson, J.K., Gordon, J.I., Knight, R., 2013. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Research* 23, 1704–1714. <https://doi.org/10.1101/gr.151803.112>
- Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F., 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*, 4., vollständig überarbeitete Auflage. ed. Thieme, Stuttgart.
- Lupp, C., Robertson, M.L., Wickham, M.E., Sekirov, I., Champion, O.L., Gaynor, E.C., Finlay, B.B., 2007. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host & Microbe* 2, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>
- Mahe, M.M., Sundaram, N., Watson, C.L., Shroyer, N.F., Helmrich, M.A., 2015. Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/52483>
- Markovic, D., Grammatopoulos, D.K., 2009. Focus on the splicing of secretin GPCRs transmembrane-domain 7. *Trends Biochem Sci* 34, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.06.002>
- Markovic, M.A., Brubaker, P.L., 2019. The roles of glucagon-like peptide-2 and the intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor in regulating microvillus length. *Sci Rep* 9, 13010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49510-5>
- Marshman, E., Booth, C., Potten, C.S., 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91–98. <https://doi.org/10.1002/bies.10028>
- Martin, G.-R., Beck, P.-L., Sigalet, D.-L., 2006. Gut hormones, and short bowel syndrome: the enigmatic role of glucagon-like peptide-2 in the regulation of intestinal adaptation. *World J Gastroenterol* 12, 4117–4129. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i26.4117>



- Masur, K., Schwartz, F., Entschladen, F., Niggemann, B., Zaenker, K.S., 2006. DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regul Pept* 137, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.07.003>
- Matsuoka, K., Kanai, T., 2015. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* 37, 47–55. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0454-4>
- McDonagh, S.C., Lee, J., Izzo, A., Brubaker, P.L., 2007. Role of glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor alpha2 in the actions of the glucagon-like peptides on the murine intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G461-468. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00424.2006>
- McDonald, D., Ackermann, G., Khailova, L., Baird, C., Heyland, D., Kozar, R., Lemieux, M., Derenski, K., King, J., Vis-Kampen, C., Knight, R., Wischmeyer, P.E., 2016. Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. *mSphere* 1. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00199-16>
- Medzhitov, R., Janeway, C., 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338–344. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>
- Messing, B., Crenn, P., Beau, P., Boutron, M.C., Rambaud, J.C., Matuchansky, C., 1998. Long-term survival and parenteral nutrition-dependency of adult patients with nonmalignant short bowel. *Transplant. Proc.* 30, 2548. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(98\)00769-6](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(98)00769-6)
- Mestas, J., Hughes, C.C.W., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731–2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Miyagiwa, M., Ichida, T., Tokiwa, T., Sato, J., Sasaki, H., 1989. A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25, 503–510. <https://doi.org/10.1007/bf02623562>
- Mojsov, S., Heinrich, G., Wilson, I.B., Ravazzola, M., Orci, L., Habener, J.F., 1986. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 261, 11880–11889.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G., 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46-54.e42; quiz e30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., LeLeiko, N., Snapper, S.B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B.E., Xavier, R.J., Huttenhower, C., 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 13, R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
- Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J.H., Hamilton, S.R., Adams, H.P., Zhang, J., Clevers, H., de Crombrughe, B., 2007. SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 133, 539–546. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.020>
- Mülhardt, C., 2013a. Die Klonierung von DNA-Fragmenten, in: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer, pp. 133–161.
- Mülhardt, C., 2013b. Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen, in: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer, pp. 211–268.
- Mülhardt, C., 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, 6. Auflage 2009. ed. Springer-Verlag.

- Munroe, D.G., Gupta, A.K., Kooshesh, F., Vyas, T.B., Rizkalla, G., Wang, H., Demchyshyn, L., Yang, Z.J., Kamboj, R.K., Chen, H., McCallum, K., Sumner-Smith, M., Drucker, D.J., Crivici, A., 1999. Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1569–1573. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1569>
- Murray, I.A., Smith, J.A., Coupland, K., Ansell, I.D., Long, R.G., 2001. Intestinal disaccharidase deficiency without villous atrophy may represent early celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 36, 163–168. <https://doi.org/10.1080/003655201750065915>
- Naim, H.Y., Lacey, S.W., Sambrook, J.F., Gething, M.J., 1991. Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. *J Biol Chem* 266, 12313–12320.
- Naim, H.Y., Sterchi, E.E., Lentze, M.J., 1988. Structure, biosynthesis, and glycosylation of human small intestinal maltase-glucoamylase. *J Biol Chem* 263, 19709–19717.
- Nauck, M.A., 1998. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol* 35, 117–129. <https://doi.org/10.1007/s005920050116>
- Nave, R., Halabi, A., Herzog, R., Schaffer, P., Diefenbach, J., Krause, S., Berghöfer, P., Lahu, G., Hartmann, M., 2013. Pharmacokinetics of teduglutide in subjects with renal impairment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69, 1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1455-7>
- Neurath, M.F., 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
- Ng, T.H.S., Britton, G.J., Hill, E.V., Verhagen, J., Burton, B.R., Wraith, D.C., 2013. Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Front. Immunol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129>
- Nightingale, J.M., 2001. Management of patients with a short bowel. *World J. Gastroenterol.* 7, 741–751. <https://doi.org/10.3748/wjg.v7.i6.741>
- Nishimura, M., Naito, S., 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* 28, 886–892.
- Nørholm, L.M., Holst, J.J., Jeppesen, P.B., 2012. Treatment of adult short bowel syndrome patients with teduglutide. *Expert Opin Pharmacother* 13, 235–243. <https://doi.org/10.1517/14656566.2012.644787>
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., Greenson, J.K., Keshav, S., Nuñez, G., 2003a. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52, 1591–1597. <https://doi.org/10.1136/gut.52.11.1591>
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., Greenson, J.K., Keshav, S., Nuñez, G., 2003b. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52, 1591–1597.
- O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7, 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- O'Keefe, S.J., Haymond, M.W., Bennet, W.M., Oswald, B., Nelson, D.K., Shorter, R.G., 1994. Long-acting somatostatin analogue therapy and protein metabolism in patients with jejunostomies. *Gastroenterology* 107, 379–388. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90162-7)

- O'Keefe, S.J.D., Buchman, A.L., Fishbein, T.M., Jeejeebhoy, K.N., Jeppesen, P.B., Shaffer, J., 2006. Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.10.002>
- Ørskov, C., Hartmann, B., Poulsen, S.S., Thulesen, J., Hare, K.J., Holst, J.J., 2005. GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul. Pept.* 124, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.07.009>
- Ostaff, M.J., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* 5, 1465–1483. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201773>
- Ouellette, A.J., 2011. Paneth cell  $\alpha$ -defensins in enteric innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2215–2229. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0714-6>
- Ouellette, A.J., Hsieh, M.M., Nosek, M.T., Cano-Gauci, D.F., Huttner, K.M., Buick, R.N., Selsted, M.E., 1994. Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun* 62, 5040–5047. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.5040-5047.1994>
- Ouellette, A.J., Selsted, M.E., 1996. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 10, 1280–1289.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H.K., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 839–845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
- Patzelt, C., Schiltz, E., 1984. Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5007–5011. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.16.5007>
- Perry, R.J., Peng, L., Barry, N.A., Cline, G.W., Zhang, D., Cardone, R.L., Petersen, K.F., Kibbey, R.G., Goodman, A.L., Shulman, G.I., 2016. Acetate mediates a microbiome-brain- $\beta$ -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 534, 213–217. <https://doi.org/10.1038/nature18309>
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Pironi, L., Arends, J., Bozzetti, F., Cuerda, C., Gillanders, L., Jeppesen, P.B., Joly, F., Kelly, D., Lal, S., Staun, M., Szczepanek, K., Van Gossum, A., Wanten, G., Schneider, S.M., Home Artificial Nutrition & Chronic Intestinal Failure Special Interest Group of ESPEN, 2016. ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults. *Clin Nutr* 35, 247–307. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.01.020>
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Pull, S.L., Doherty, J.M., Mills, J.C., Gordon, J.I., Stappenbeck, T.S., 2005. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 99–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405979102>
- Ramanan, D., Cadwell, K., 2016. Intrinsic Defense Mechanisms of the Intestinal Epithelium. *Cell Host Microbe* 19, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.003>
- Rana, S.V., Bhasin, D.K., Katyal, R., Singh, K., 2001. Comparison of duodenal and jejunal disaccharidase levels in patients with non ulcer dyspepsia. *Trop Gastroenterol* 22, 135–136.

- Rehman, A., Sina, C., Gavrilova, O., Häslér, R., Ott, S., Baines, J.F., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2011. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 60, 1354–1362. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>
- Reimann, F., Gribble, F.M., 2013. Towards the harnessing of gut feelings. *Curr Opin Pharmacol* 13, 909–911. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.020>
- Ring, L.L., Nerup, N., Jeppesen, P.B., Svendsen, L.B., Achiam, M.P., 2018. Glucagon like peptide-2 and neoplasia; a systematic review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 257–264. <https://doi.org/10.1080/17474124.2018.1417032>
- Rowland, K.J., Brubaker, P.L., 2011. The “cryptic” mechanism of action of glucagon-like peptide-2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G1-8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00039.2011>
- Sartor, R.B., 2006. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 3, 390–407. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0528>
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., Clevers, H., 2011. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Schalamon, J., Mayr, J.M., Höllwarth, M.E., 2003. Mortality and economics in short bowel syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 931–942. [https://doi.org/10.1016/s1521-6918\(03\)00079-9](https://doi.org/10.1016/s1521-6918(03)00079-9)
- Schoeler, M., Klag, T., Wendler, J., Bernhard, S., Adolph, M., Kirschniak, A., Goetz, M., Malek, N., Wehkamp, J., 2018. GLP-2 analog teduglutide significantly reduces need for parenteral nutrition and stool frequency in a real-life setting. *Therap Adv Gastroenterol* 11, 1756284818793343. <https://doi.org/10.1177/1756284818793343>
- Schuijers, J., Clevers, H., 2012. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J.* 31, 2685–2696. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.149>
- Schwartz, L.K., O’Keefe, S.J.D., Fujioka, K., Gabe, S.M., Lamprecht, G., Pape, U.-F., Li, B., Youssef, N.N., Jeppesen, P.B., 2016. Long-Term Teduglutide for the Treatment of Patients With Intestinal Failure Associated With Short Bowel Syndrome. *Clin Transl Gastroenterol* 7, e142. <https://doi.org/10.1038/ctg.2015.69>
- Sekirov, I., Finlay, B.B., 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 4159–4167. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172742>
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6, 551–557. <https://doi.org/10.1038/ni1206>
- Sigalet, D.L., Wallace, L.E., Holst, J.J., Martin, G.R., Kaji, T., Tanaka, H., Sharkey, K.A., 2007. Enteric neural pathways mediate the anti-inflammatory actions of

- glucagon-like peptide 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G211-221. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00530.2006>
- Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D.R., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.-F., Gasche, C., Geboes, K., Jewell, D.P., Karban, A., Loftus, E.V., Peña, A.S., Riddell, R.H., Sachar, D.B., Schreiber, S., Steinhart, A.H., Targan, S.R., Vermeire, S., Warren, B.F., 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.* 19 Suppl A, 5A-36A.
- Sina, C., Kemper, C., Derer, S., 2018. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function. *Semin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.008>
- Sjölund, K., Sandén, G., Håkanson, R., Sundler, F., 1983. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85, 1120–1130.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>
- Skovbjerg, H., 1981. Immunoelectrophoretic studies on human small intestinal brush border proteins--the longitudinal distribution of peptidases and disaccharidases. *Clin Chim Acta* 112, 205–212. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90379-x](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90379-x)
- Sprunt, K., Leidy, G., 1988. The use of bacterial interference to prevent infection. *Can. J. Microbiol.* 34, 332–338. <https://doi.org/10.1139/m88-061>
- Stange, 2015. *Entzündliche Darmerkrankungen: Klinik, Diagnostik und Therapie.* Schattauer Verlag.
- Strong, F.C., 1952. Theoretical Basis of Bouguer-Beer Law of Radiation Absorption. *Anal. Chem.* 24, 338–342. <https://doi.org/10.1021/ac60062a020>
- Strugala, V., Dettmar, P.W., Pearson, J.P., 2008. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* 62, 762–769. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x>
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., Lochs, H., 2005. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3380–3389. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3380-3389.2005>
- Szyk, A., Wu, Z., Tucker, K., Yang, D., Lu, W., Lubkowski, J., 2006. Crystal structures of human alpha-defensins HNP4, HD5, and HD6. *Protein Sci.* 15, 2749–2760. <https://doi.org/10.1110/ps.062336606>
- Tager, H.S., Steiner, D.F., 1973. Isolation of a glucagon-containing peptide: primary structure of a possible fragment of proglucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2321–2325. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2321>
- Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Thulesen, J., Rømer, J., Vrang, N., 2000. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat. Med.* 6, 802–807. <https://doi.org/10.1038/77535>
- Tappenden, K.A., Edelman, J., Joelsson, B., 2013. Teduglutide enhances structural adaptation of the small intestinal mucosa in patients with short bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 47, 602–607. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182828f57>

- Taylor-Edwards, C.C., Burrin, D.G., Matthews, J.C., McLeod, K.R., Holst, J.J., Harmon, D.L., 2010. Expression of mRNA for proglucagon and glucagon-like peptide-2 (GLP-2) receptor in the ruminant gastrointestinal tract and the influence of energy intake. *Domest Anim Endocrinol* 39, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.05.002>
- Theodorakis, M.J., Carlson, O., Michopoulos, S., Doyle, M.E., Juhaszova, M., Petraki, K., Egan, J.M., 2006. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E550-559. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00326.2004>
- Thulesen, J., Hartmann, B., Hare, K.J., Kissow, H., Ørskov, C., Holst, J.J., Poulsen, S.S., 2004. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 53, 1145–1150. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.035212>
- Tsai, C.H., Hill, M., Asa, S.L., Brubaker, P.L., Drucker, D.J., 1997a. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am. J. Physiol.* 273, E77-84. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.1.E77>
- Tsai, C.H., Hill, M., Drucker, D.J., 1997b. Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP-2 in vivo. *Am. J. Physiol.* 272, G662-668. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.3.G662>
- Tyagi, S., Kramer, F.R., 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14, 303–308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>
- Uronis, J.M., Mühlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., Jobin, C., 2009. Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS ONE* 4, e6026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006026>
- Van Limbergen, J., Radford-Smith, G., Satsangi, J., 2014. Advances in IBD genetics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 372–385. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.27>
- Ventham, N.T., Kennedy, N.A., Adams, A.T., Kalla, R., Heath, S., O’Leary, K.R., Drummond, H., IBD BIOM consortium, IBD CHARACTER consortium, Wilson, D.C., Gut, I.G., Nimmo, E.R., Satsangi, J., 2016. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 7, 13507. <https://doi.org/10.1038/ncomms13507>
- von Websky, M.W., Liermann, U., Buchholz, B.M., Kitamura, K., Pascher, A., Lamprecht, G., Fimmers, R., Kalff, J.C., Schäfer, N., 2014. [Short bowel syndrome in Germany. Estimated prevalence and standard of care]. *Chirurg* 85, 433–439. <https://doi.org/10.1007/s00104-013-2605-x>
- Wang, L., Christophersen, C.T., Sorich, M.J., Gerber, J.P., Angley, M.T., Conlon, M.A., 2012. Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Dig. Dis. Sci.* 57, 2096–2102. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2167-7>
- Wang, Y., Guan, X., 2010. GLP-2 potentiates L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity associated with stimulated glucose uptake in hippocampal neurons. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E156-166. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00585.2009>
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Bevins, C.L., Stange, E.F., 2005. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2, 406–415. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0265>

- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F., 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.032805>
- Wehkamp, J., Stange, E.F., 2010. Paneth's disease. *J Crohns Colitis* 4, 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2010.05.010>
- Wewer Albrechtsen, N.J., Kuhre, R.E., Toräng, S., Holst, J.J., 2016. The intestinal distribution pattern of appetite- and glucose regulatory peptides in mice, rats and pigs. *BMC Res Notes* 9, 60. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1872-2>
- White, S.H., Wimley, W.C., Selsted, M.E., 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 521–527. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(95\)80038-7](https://doi.org/10.1016/0959-440x(95)80038-7)
- Wiedenmann, B., Franke, W.W., Kuhn, C., Moll, R., Gould, V.E., 1986a. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 3500–3504. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3500>
- Wiedenmann, B., Franke, W.W., Kuhn, C., Moll, R., Gould, V.E., 1986b. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 3500–3504. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3500>
- Xiao, Q., Boushey, R.P., Cino, M., Drucker, D.J., Brubaker, P.L., 2000. Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1057-1063.
- Xiao, Q., Boushey, R.P., Drucker, D.J., Brubaker, P.L., 1999. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* 117, 99–105. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70555-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70555-x)
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Yazbeck, R., 2010. Teduglutide, a glucagon-like peptide-2 analog for the treatment of gastrointestinal diseases, including short bowel syndrome. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12, 798–809.
- Yilmaz, Ö.H., Katajisto, P., Lamming, D.W., Gültekin, Y., Bauer-Rowe, K.E., Sengupta, S., Birsoy, K., Dursun, A., Yilmaz, V.O., Selig, M., Nielsen, G.P., Mino-Kenudson, M., Zuberberg, L.R., Bhan, A.K., Deshpande, V., Sabatini, D.M., 2012. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* 486, 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature11163>
- Yusta, B., Huang, L., Munroe, D., Wolff, G., Fantáske, R., Sharma, S., Demchyshyn, L., Asa, S.L., Drucker, D.J., 2000. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology* 119, 744–755. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.16489>
- Yusta, B., Somwar, R., Wang, F., Munroe, D., Grinstein, S., Klip, A., Drucker, D.J., 1999. Identification of glucagon-like peptide-2 (GLP-2)-activated signaling pathways in baby hamster kidney fibroblasts expressing the rat GLP-2

- receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 30459–30467.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30459>
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhou, J., Hegsted, M., McCutcheon, K.L., Keenan, M.J., Xi, X., Raggio, A.M., Martin, R.J., 2006. Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity (Silver Spring)* 14, 683–689.  
<https://doi.org/10.1038/oby.2006.77>
- Ziambaras, T., Rubin, D.C., Perlmutter, D.H., 1996. Regulation of sucrase-isomaltase gene expression in human intestinal epithelial cells by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 271, 1237–1242. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.1237>



## **7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung Innere Medizin I - Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. N. P. Malek und anfangs Herrn Professor Dr. med. Jan Wehkamp durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch meinen früheren Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jan Wehkamp sowie meine Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Lioba Courth.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Jutta Bader (MTA) und Frau Marion Strauß (MTA) selbständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach vorheriger Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Jan Wehkamp, Prof. Dr. med. N. P. Malek, PD Dr. med. Thomas Klag und Frau Dr. rer. nat. Lioba Courth durch mich.

Für die in der Einleitung verwendeten Abbildungen 1-5 wurden die Urheberrechte eingeholt und die jeweiligen Quellen angegeben. Alle weiteren Abbildungen und Tabellen wurden eigenständig durch mich erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die Dissertationsschrift wurde durch Herrn Privatdozent Dr. med. Thomas Klag korrigiert.

Ulm, den 08.04.2022

---

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

### **Originalartikel**

Schoeler M, Klag T, Wendler J, Bernhard S, Adolph M, Kirschniak A, Goetz M, Malek N & Wehkamp J (2018) GLP-2 analog teduglutide significantly reduces need for parenteral nutrition and stool frequency in a real-life setting. *Therap Adv Gastroenterol* 11: 1756284818793343  
(Schoeler et al., 2018)

## 9 Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, die mich auf dem Weg zu meiner Dissertationsschrift unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Jan Wehkamp und Herrn Professor Dr. med. N. P. Malek für die Überlassung dieses interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ganz besonders darf ich mich bei einem Mitglied der ehemaligen AG Wehkamp bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Frau Jutta Bader (MTA). Mit ihrem scharfsinnigen Verstand, ihrer herzlichen Art und ihrem unerschütterlichen Vertrauen in mich und dieses Thema war sie zu jeder Zeit Ansprechpartnerin, Freundin und Mitstreiterin. Ob Korrekturlesen, Laboreinarbeitung oder Bewältigung ganz gewöhnlichen Herausforderungen im Arbeitsalltag eines Doktoranden- du warst 24/7 für dieses Projekt da und hast mir und uns viel Freude und schöne Stunden bereitet. Dafür darf ich nun DANKE sagen.

Auch gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. Lioba Courth, Herrn Dr. rer. nat. Louis Königer und Herrn PD Dr. med. Thomas Klag. Eure Expertise, eure Ratschläge und eure motivierende Art waren stets eine große Hilfe für mich. Durch eure Begeisterungsfähigkeit konntet ihr mich stets motivieren und mein Interesse an der Forschung fördern.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten AG Wehkamp - namentlich Frau Marion Strauß, Dr. rer. nat. Judith Wendler, Dr. rer. nat. Dirk Ehmman und Dr. med. Marc Schöler für die gemeinsame Zeit bedanken. Wann immer ich Rat oder Austausch brauchte, konnte ich mich an euch wenden.

Und zuletzt darf ich mich bei meinen Eltern, meiner wundervollen Freundin, meiner Schwester und meinem Zwillingbruder Lukas für den liebevollen Beistand während

meiner Zeit als Doktorand bedanken. Durch euer Vertrauen in mich wart ihr zu jeder Zeit die größte Unterstützung.