

Aus der Abteilung Gastroenterologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

Die intestinale Adaptation nach Ileozökalresektion im Mausmodell – Bedeutung von
NOD2

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

vorgelegt von

Sabeth Lindemann

Aus Rostock

Rostock, 2021

Gutachter:

Univ. Prof. Dr. med. Clemens Schafmayer MBA, Chirurgische Klinik und Poliklinik,
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie, Universität
Rostock

Prof. Dr. med. Georg Lamprecht, Zentrum für Innere Medizin Klinik II, Abt. Gastro-
enterologie und Endokrinologie, Universität Rostock

Prof. Dr. med. Markus M. Lerch, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A, Universität
Greifswald

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Thesen

1. Der Begriff „Kurzdarmsyndrom“ (KDS) beschreibt die Unfähigkeit des Darms, bei normaler Ernährung genügend Energie, Nährstoffe, Proteine und Flüssigkeit zu absorbieren. Dabei kann es zum Darmversagen kommen, wenn die Resorptionskapazität soweit einschränkt ist, dass die physiologischen Körperfunktionen nicht mehr aufrechterhalten werden können.
2. Eine der Hauptursachen für die Entstehung eines KDS sind multiple Resektionen bei Morbus Crohn.
3. NOD2 ist ein Rezeptor für die Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen. NOD2 wird vor allem in Monozyten und Makrophagen, aber auch in intestinalen Epithelzellen, wie z. B. Panethzellen exprimiert. Polymorphismen des *NOD2* Gens treten gehäuft bei Patienten mit Morbus Crohn auf.
4. Darüber hinaus werden *NOD2* Mutationen mit der Entwicklung eines Darmversagens und einem komplikativeren Verlauf des KDS assoziiert. Dieser Zusammenhang besteht offenbar unabhängig davon, ob der Patient als Grunderkrankung Morbus Crohn aufweist. Ob *NOD2* Mutationen einen initial komplikativeren Verlauf (durch vermehrte perioperative Komplikationen) begünstigen oder die Adaptation negativ beeinflussen, ist bislang unklar und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.
5. Durch eine 40%ige Ileozökalresektion (ICR) kann in Mäusen ein experimentelles KDS induziert werden, das klinisch mit einer anhaltenden Gewichtsreduktion und Durchfällen einhergeht.
6. Der Einfluss der *Nod2*-Defizienz auf den klinischen Verlauf des KDS, die morphologische Adaptation des Darms und die Expression von Ionentransportproteinen wurde in Wildtyp (WT) und *Nod2* knockout (*Nod2* KO) Mäusen nach einer 40%igen ICR verglichen.
7. Wohlbefinden, Körpergewicht und Stuhlkonsistenz von Mäusen waren nach ICR vermindert. *Nod2* KO ICR Mäuse hatten in der frühen Phase (d 2-4) nach Operation ein signifikant schlechteres Wohlbefinden als WT ICR Mäuse. Gewichtsabnahme und Stuhlkonsistenz waren zwischen WT ICR und *Nod2* KO ICR Mäusen nicht signifikant unterschiedlich, wenngleich *Nod2* KO Mäuse in der späten Phase der Adaptation tendenziell mehr Körpergewicht abnahmen.

8. Im Zuge der histomorphologischen Adaptation kam es zu einer Erhöhung der Villuslänge und zu einer Vertiefung der Krypten sowohl in WT als auch in *Nod2* KO Mäusen.
9. Nach einer ICR veränderte sich die mRNA-Expression von *DRA* in beiden Mausgruppen nicht signifikant. Die Expression von *NHE3* und *CFTR* war im adaptierten Epithel von WT und *Nod2* KO Mäusen gleichermaßen erhöht. Das antimikrobielle Peptid Lysozym wurde unabhängig vom Genotyp exprimiert und war nach Resektion transient vermindert.
10. Mäuse mit *Nod2*-Defizienz hatten nach ICR ein schlechteres klinisches Outcome. Histomorphologische Adaptation und Ionentransport waren unter Kurzdarmbedingungen nicht abhängig vom *Nod2* Status. Um die Rolle des *NOD2* Rezeptors für die Pathogenese des Kurzdarmsyndroms zu verstehen, sollten Mechanismen der funktionellen Adaptation und Veränderungen des Mikrobioms nach umfangreicher Darmresektion adressiert werden.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Ionentransportprozesse im Darm	1
1.1.1 Downregulated in adenoma (DRA)	2
1.1.2 Na ⁺ /H ⁺ -exchanger 3 (NHE3)	2
1.1.3 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)	2
1.2 Kurzdarmsyndrom.....	3
1.2.1 Definition/ Epidemiologie	3
1.2.2 Ursachen für die Entstehung eines Kurzdarmsyndroms	4
1.2.3 Adaptation beim Kurzdarmsyndrom.....	4
1.2.4 Mechanismen der Adaptation (Morphologische und funktionelle Adaptation)	4
1.2.5 Therapieoptionen des Darmversagens/ Kurzdarmsyndroms	5
1.3 NOD2 als genetischer Risikofaktor für das Darmversagen.....	5
1.4 Zielstellung.....	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Verwendete Mäuse	8
2.2 Das Mausmodell	8
2.2.1 Vorbereitungen der Mäuse	8
2.2.2 Ileozökalresektion.....	9
2.2.3 Wellness-Score	12
2.2.4 Entnahme des Darmgewebes.....	13
2.2.5 Untersuchte Darmabschnitte	13
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	15
2.3.1 RNA Isolation aus Darmgewebe.....	15
2.3.2 Bestimmung der RNA Konzentration mit dem Nanophotometer	15
2.3.3 Gelelektrophorese	16
2.3.4 Synthese der cDNA	16
2.3.5 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (real-time qPCR)	17

2.4 Histologische Methoden.....	18
2.4.1 Vorbereitungen der Gewebeproben.....	18
2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.).....	19
2.4.3 Immunhistologische Färbungen.....	20
2.5 Statistik.....	23
3. Ergebnisse.....	24
3.1 Klinischer Verlauf.....	24
3.1.1 Wellness-Score.....	24
3.1.2 Gewicht.....	25
3.1.3 Stuhlkonsistenz.....	26
3.1.4 Mortalität.....	27
3.2 Histologische Ergebnisse.....	28
3.2.1 Zotten.....	29
3.2.2 Krypten.....	31
3.3 Immunhistochemische Färbungen.....	33
3.4 PCR Ergebnisse.....	35
3.4.1 Genexpression von <i>Downregulated in adenoma</i> (DRA).....	35
3.4.2 Genexpression von <i>Na⁺/H⁺-exchanger 3</i> (NHE3).....	36
3.4.3 Genexpression von <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (CFTR)	37
3.4.4 Genexpression von Lysozym.....	38
4. Diskussion.....	39
5. Ausblick.....	49
6. Zusammenfassung.....	50
7. Abbildungsverzeichnis.....	52
8. Tabellenverzeichnis.....	53
9. Quellen.....	54

Abkürzungen

cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase activation and recruitment-domain
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DRA	Downregulated in adenoma
ENaC	Epithelial Na ⁺ channel
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ICR	Ileozökalresektion (Ileocecal resection)
KDS	Kurzdarmsyndrom
KG	Körpergewicht
LRR	Leucin-rich repeat
MAMPs	Microbe-associated molecular patterns
MDP	Muramyl-Dipeptid
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -exchanger 3
NHERF	N ⁺ /H ⁺ -exchanger regulatory factor
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat (LRR)-containing protein
Nod2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
Nod2 KO	Nod2 knockout
p. o.	Postoperativ
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
Pat1	Proton-coupled amino acid transporter 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
s. c.	Subkutan
SGLT	Sodium-glucose linked transporter
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Ionentransportprozesse im Darm

Der Darm erfüllt vielfältige Aufgaben, darunter die lebensnotwendige Resorption von Nähr- und Mineralstoffen, sowie Wasser. Den menschlichen Darm durchlaufen täglich etwa 8-10 l Flüssigkeit zur Erhaltung der physiologischen Funktionen. Dazu kommen etwa 2 l aus der Nahrung. Der größte Anteil (95 %) wird im Dünndarm, weitere 4 % im Dickdarm rückresorbiert. Nur etwa 1 % werden über Urin und Stuhl ausgeschieden. Um diese Mechanismen zu ermöglichen, ist ein aktiver Transport vor allem von Na^+ und Cl^- notwendig, damit Wasser passiv folgen kann. Dieser Ionentransport erfolgt auf 4 Hauptwegen [1], die bei Störungen erhebliche Auswirkungen auf den Organismus haben können.

Im distalen Kolon erfolgt die elektrogene Na^+ Absorption hauptsächlich über den epithelialen Na^+ Kanal ENaC (epithelial Na^+ channel) [1]. Da im Kolon ein hohes negatives Membranpotential vorherrscht (-20 mV), ist ein Na^+ Transport gegen den Konzentrationsgradienten in die Mukoszellen möglich [2].

Der zweite wichtige Weg ist die Nährstoff-gekoppelte Na^+ Aufnahme. Hierbei wird Na^+ transepithelial mit z. B. Glukose (SGLT Transporter [3]) oder Aminosäuren [1] resorbiert. Dies erzeugt ein luminal negatives Potential, das die parazelluläre Aufnahme von Cl^- und Flüssigkeit ermöglicht [1].

Zusätzlich zu diesen transepithelialen Strömen findet eine basale Absorption von Na^+ und Cl^- statt, die nicht an Nährstoffe gebunden ist [1]. Dies wird als elektroneutrale NaCl-Absorption bezeichnet und geschieht vor allem über Na^+/H^+ (NHE3, Na^+/H^+ -exchanger 3) und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (DRA, Downregulated in adenoma) Austauscher, die im Folgenden noch näher beschrieben werden [1].

Die elektrogene Cl^- -Sekretion findet vorwiegend über CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) statt [1]. Nach Stimulation der Mukosa führt ein Anstieg von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), Ca^{2+} oder cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) zur aktiven Cl^- -Sekretion [4]. Das resultierende negative Membranpotential führt zum parazellulären Transport von Na^+ [4].

Die Transportprozesse über DRA, NHE3, sowie CFTR stehen in dieser Arbeit besonders im Fokus und werden im Folgenden näher erläutert.

1.1.1 Downregulated in adenoma (DRA)

Downregulated in adenoma (DRA) ist der dominante $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher des Darms und zusammen mit NHE3 für die elektroneutrale NaCl Absorption im Dünndarm zuständig [5]. DRA kann Cl^- sowohl mit HCO_3^- als auch mit OH^- austauschen. Über DRA findet zum einen eine basale HCO_3^- Sekretion statt, außerdem gibt es eine cAMP-induzierte, die etwa 50% ausmacht. DRA wird als ein Mitglied der Anionenaustauscher-Familie, in der es neun weitere Mitglieder gibt, über das *SLC26A3* Gen kodiert [6].

DRA trägt seinen Namen, da bei seiner Entdeckung im Kolon auffiel, dass es in dortigen Adenomen weniger exprimiert war. Später wurde jedoch entdeckt, dass eine Expression vom Duodenum bis ins Kolon vorhanden ist, wobei die Menge nach distal, sowie von der Spitze der Zotten bis in die Tiefe der Krypten zunimmt [7–9].

Bei Mutationen von DRA liegt eine kongenitale Cl^- Diarrhö vor, eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Es kommt lebenslang zu stark Cl^- haltigen Durchfällen, die eine Alkalose des Körpers zur Folge haben [10, 11]. Dies unterstreicht, dass der Transporter DRA eine wichtige Rolle in der Homöostase des Körpers einnimmt und bei Fehlfunktionen relevante Auswirkungen auf den gesamten Organismus auftreten.

1.1.2 Na^+/H^+ -exchanger 3 (NHE3)

Der Na^+/H^+ -exchanger 3 (NHE3) ist ein Na^+/H^+ Austauscher, der über das Gen *SLC9A3* kodiert wird. Der Transporter bewirkt eine Na^+ Absorption und ist apikal im Bürstensaum des Darms lokalisiert [1]. Zudem wird NHE3 in der Niere im proximalen Tubulus und im absteigenden Teil der Henle Schleife exprimiert [12].

Bei einer NHE3-Defizienz werden Diarrhö, eine leichte Azidose, Hypotonie, sowie Zunahme von Gewicht und Größe der Darmabschnitte beschrieben. Auch der Flüssigkeitsstrom im proximalen Tubulus lässt, ebenso wie die HCO_3^- Resorption, nach [13]. Im Jejunum findet weniger Na^+ Absorption statt [14], da die Aktivität apikaler Na^+/H^+ Austauscher dort sinkt [15]. Bei Schultheis et al. [13] wird zudem eine Hochregulation des ENaC und der H^+/K^+ ATPase beschrieben, die den Ausfall von NHE3 kompensieren können. Diese Beobachtungen zeigen, dass auch NHE3 eine wichtige Funktion der Homöostase des Körpers erfüllt und zudem mit anderen Transportern vernetzt ist, um Störungen möglichst ausgleichen zu können.

1.1.3 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ist ein Cl^- Kanal, der besonders an der Oberfläche von Epithelzellen, z. B. im Darm und in den Atemwegen, exprimiert ist. In

der Epithelzelle herrscht ein negatives elektrisches Potential, das die treibende Kraft für die Cl⁻ Sekretion darstellt [1]. Diese Sekretion bewirkt wiederum ein negatives Lumenpotential, auf Grund dessen eine parazelluläre Na⁺ Sekretion stattfindet. Der Prozess wird als elektrogene Cl⁻ Sekretion bezeichnet und bewirkt gleichzeitig den Flüssigkeitstransport in das Darmlumen [1].

Ein wichtiges Krankheitsbild der CFTR Mutation ist die Mukoviszidose/ Zystische Fibrose. Neben der in Deutschland häufigsten Mutation $\Delta F508$ (etwa 72 %) gibt es viele andere Polymorphismen, die alle zu unterschiedlich starker Ausprägung der Symptome führen [16, 17]. Klinisch imponiert ein zähflüssiges Sekret in verschiedenen Organsystemen wie Lunge und Pankreas. Es resultiert daher, dass Cl⁻ nur noch unzureichend über CFTR sekretiert wird und mehr Na⁺ in der Zelle verbleibt. Darüber wird auch mehr Wasser in die Zelle gezogen, welches für die Verflüssigung des Sekretes im Lumen fehlt. In der Lunge hat dies eine herabgesetzte mukoziliäre Clearance zur Folge [17, 18]. Schadstoffe, Erreger und feine Partikel können nicht adäquat aus der Lunge abtransportiert werden und führen zu schweren Infektionen. Im Pankreas steht das verdickte Sekret mit den enthaltenen Enzymen nur noch unzureichend für Verdauungsvorgänge zur Verfügung [17, 18]. Es kommt zu Maldigestion und Mangelernährung und in einigen Fällen zum kompletten Untergang des Pankreasgewebes. Auch der Stuhl enthält wenig Wasser, was zu erschwerter Darmpassage und möglichem Darmverschluss (mechanischer Ileus) führen kann [17, 18]. Bei Fehlfunktionen von CFTR werden somit gravierende Veränderungen der normalen physiologischen Funktionen des Körpers beobachtet.

1.2 Kurzdarmsyndrom

1.2.1 Definition/ Epidemiologie

Der erwachsene Mensch besitzt etwa 4 m Dünndarm, sowie etwa 80 cm Dickdarm. Nicht immer steht jedoch der Darm in seiner gesamten Länge zur Verfügung, um die zur Lebenserhaltung notwendigen Nährstoffe zu absorbieren. Ursache kann ein Kurzdarmsyndrom (KDS) sein, das in Europa mit einer Inzidenz von etwa 2-3/ 1 Mio./ Jahr auftritt [19]. Als KDS wird die Unfähigkeit des Darms beschrieben, bei normaler Ernährung genügend Energie, Nährstoffe, Proteine, Mikronährstoffe und Flüssigkeit zu absorbieren, um physiologische Funktionen des Körpers aufrechtzuerhalten [20].

Die Einteilung des KDS bezieht sich auf die Anatomie des residualen Darms: Als Typ I (14 %) wird die Endenterostomie bezeichnet, als Typ II (63 %) die jejunokolische Anastomose und als Typ III (23 %) die jejunoileokolische Anastomose [20, 21]. Je weiter proximal die Anastomose liegt, bzw. je mehr Darm entfernt wurde, desto schlechter ist die Adaptationsfähigkeit des Darms. Bei Entfernung des Ileums kann eine suffiziente Vitamin B12 Aufnahme nicht

gewährleistet werden, sodass unter anderem mit Blutbildungsstörungen gerechnet werden muss [19, 22]. Auch Gallensäuren werden im Ileum rückresorbiert. Es kann bei Fehlen des Ileums zu vorzeitigem Ausscheiden der Gallensäuren kommen, was voluminöse Fettstühle (Steatorrhö) zur Folge hat, da die Fette nicht durch Gallensäuren emulgiert werden können und daher nicht aufgespaltet werden [19, 22]. Somit sind sie für den Körper nicht resorbierbar und dies führt wiederum zu schweren Mangelerscheinungen. Eine andere Komplikation der fehlenden Rückresorption von Gallensäuren kann die chologene Diarrhö sein. Gallensäuren, die in das Kolon gelangen, binden aufgrund ihrer osmotischen Wirksamkeit große Mengen an Wasser und es kommt zu Durchfällen (Gallensäureverlust-Syndrom) [19, 22].

1.2.2 Ursachen für die Entstehung eines Kurzdarmsyndroms

Das KDS kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen existiert die intrinsische Form bei angeborener Darmatresie. Zudem gibt es ein funktionelles KDS, das eine Malabsorption bei normaler Darmlänge beschreibt. Ursachen hierfür können Pseudoobstruktionen, refraktäre Sprue, Strahlenenteritis oder kongenitale Villusatrophie sein. Meist wird ein KDS aber als Residuum des Darms nach ausgedehnter Resektion aufgefasst [23]. Eine häufige Indikation hierfür ist Morbus Crohn (M. Crohn) [24]. Der M. Crohn ist eine transmurale, diskontinuierlich und segmental auftretende Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes, die schubweise verläuft. Häufigste Lokalisationen sind das terminale Ileum und das proximale Kolon [25]. Bei schweren Komplikationen ist eine operative Therapie teils unvermeidbar. Dabei wird häufig eine Ileozökalresektion (ICR) vorgenommen [26]. Der restliche Darm würde, auf die Länge bezogen, reichen, um genug Nährstoffe aufzunehmen, ist aber bei M. Crohn meist wegen der Entzündung nicht in ausreichendem Maße dazu fähig. Es liegt dann ein kombiniertes funktionelles und residuales KDS vor [24]. In den Experimenten zu dieser Arbeit wurde im Mausmodell ein KDS durch eine operative ICR erzeugt.

1.2.3 Adaptation beim Kurzdarmsyndrom

Das KDS verläuft in drei Phasen: zunächst kommt es zur hypersekretorischen Phase, der die Adaptationsphase folgt. Nach einiger Zeit folgt die chronisch adaptierte, stabile Phase [22]. Adaptation ist der physiologische Prozess, die Funktion und Struktur des entnommenen Darms zu kompensieren, um die Verdauungs- und Absorptionsfunktion zu gewährleisten.

1.2.4 Mechanismen der Adaptation (Morphologische und funktionelle Adaptation)

Diese oben geschriebene Adaptation an eine Kurzdarmsituation kann über mehrere Wege erfolgen. Zum einen kann eine morphologische Adaptation beobachtet werden, die eine

Verlängerung von Zotten und Vertiefung von Krypten beinhaltet [27]. Einige Arbeitsgruppen beobachteten zudem Mechanismen der funktionellen Adaptation im Sinne einer erhöhten Transporter Expression oder Aktivität [28–31].

1.2.5 Therapieoptionen des Darmversagens/ Kurzdarmsyndroms

Die Therapie des KDS beinhaltet verschiedene Ansatzpunkte. Primär wird eine parenterale Ernährung vorgenommen, die die Versorgung mit Nährstoffen, Elektrolyten und Flüssigkeit gewährleisten soll [20]. In der Phase der Adaptation ist es wichtig, orale Ernährung einzuführen, um die Resorptionsfähigkeit des Darms zu fördern [20, 32]. Bei guter Adaptation, die eine stabile Phase erreicht, reicht es meist, einige Nährstoffe zusätzlich zur oralen Ernährung einzunehmen, um eine optimale Versorgung des Körpers zu gewährleisten [20]. Dazu gehören unter anderem kurzkettige Fettsäuren, Zink, fettlösliche Vitamine und Vitamin B12 [22, 32]. In der frühen Phase kann auch mit Antidiarrhoika (Codein, Loperamid) die Darmmotilität herabgesetzt werden. Auch eine antisekretorische Therapie (H2 Blocker und Protonenpumpeninhibitoren) wird in den ersten 6 Monaten eingesetzt. Bei refraktärem Flüssigkeitsverlust kommen Somatostatin-Analoga (Octreotid) zum Einsatz [22]. Es besteht jedoch auch das Risiko des Darmversagens, das besonders bei Typ 1 des KDS (Endenterostomie) erhöht ist, und vorliegt, wenn die intestinale Adaptation ungenügend erfolgt ist [20, 32] und der Körper in der Folge nicht mehr adäquat versorgt wird. Dann ist eine parenterale Ernährung lebenslang notwendig und kann bei Versagen die Darmtransplantation unersetzlich machen [20, 33]. Das GLP-2-Analogon Teduglutid kann bei KDS die Abhängigkeit von der parenteralen Ernährung verringern und ist in der dritten Phase der Adaptation zugelassen, in der es die Absorption von Nährstoffen und Flüssigkeiten verbessert [22]. Es ist von besonderer Bedeutung, Risikopatienten des Darmversagens früh zu erkennen und gezielt präventive Maßnahmen zu ergreifen, sowie zu therapieren. Ein Fokus liegt dabei auf dem *Nod2* Gen, das im Folgenden beschrieben wird [34].

1.3 NOD2 als genetischer Risikofaktor für das Darmversagen

NOD2 ist ein Rezeptor für die Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen. Er gehört zur Familie der NLR-Proteine (Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing protein), die intrazellulär PAMPs oder MAMPs (pathogen/microbe-associated molecular patterns) erkennen. NOD2 erkennt dabei spezifisch Muramyl-Dipeptide (MDP), welche ein Bestandteil von Peptidoglykanen der bakteriellen Zellwand sind [35]. NOD2 wird vor allem in Monozyten und Makrophagen [36], aber auch in intestinalen Epithelzellen, wie z. B. Panethzellen exprimiert [37].

NOD2 besteht aus drei verschiedenen Domänen. C-terminal befindet sich die LRR (Leucine-rich repeat) -Domäne, welche für die Erkennung von MDP verantwortlich ist. Zentral liegt die NOD-Domäne, in der eine Oligomerisierung nach Aktivierung stattfindet. Dies ist notwendig für die Interaktion mit den zwei CARD-Regionen (Caspase activation and recruitment-domain), die sich n-terminal befinden. Nach Aktivierung durch MDP unterliegen diese Regionen strukturellen Veränderungen und ermöglichen somit die nachfolgende Signalkette [35]. Diese Signalkette beinhaltet die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, sowie weiterer proinflammatorischer Zytokine die dann die Abwehrreaktion einleiten [35, 38, 39].

Mutationen im *NOD2* Gen haben klinische Relevanz. Zum einen wurden drei Polymorphismen im *NOD2* Gen (Arg702Trp, Gly908Arg und Leu1007fsinsCys) mit einer höheren Suszeptibilität für *M. Crohn* assoziiert. [35, 36, 38, 40]. Zudem zeigten Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass bei *NOD2* Mutationen auch unabhängig von *M. Crohn*, eine höhere Rate an Darmversagen bei KDS Patienten besteht [34]. Da kein anderer Zusammenhang mit den Crohn-assoziierten Polymorphismen im Interleukin 23-Rezeptor, sowie im Autophagy-related protein 16 L1 gefunden wurde [34], führt dies zur Vermutung, dass *NOD2* Mutationen einen spezifischen Effekt auf Krankheitsverlauf und Komplikationen haben.

Weiterhin steht NOD2 im Zusammenhang mit der mukosalen Abwehr des Darms. Der Rezeptor wird hier in spezialisierten Epithelzellen, den Panethzellen exprimiert. Panethzellen sind merokrine Drüsenzellen, die unter anderem Lysozym, Defensine, Peptidasen und Laktoferrin sekretieren und damit wichtig für die lokale, intestinale Immunabwehr sind [41]. Kobayashi et al. [42] fanden in *Nod2*-defizienten Mäusen einen selektiven Abfall von Cryptidinen, dem murinen Analogon der Defensine, in den Panethzellen. Die erhöhte Anfälligkeit des Gastrointestinaltraktes für oral aufgenommene bakterielle Zellbestandteile begründeten sie mit der daraus resultierenden verminderten antibakteriellen Aktivität. Die Abhängigkeit von Defensinen vom *NOD2*-Status beschrieben auch Strober et al. [38].

Die aufgeführten Beispiele zeigen die vielfältigen Funktionen, die in Verbindung mit NOD2 stehen. Die Assoziation von *NOD2* Polymorphismen zu *M. Crohn*, KDS und Darmversagen, sowie der Einfluss auf das intestinale Immunsystem, legen einen spezifischen Effekt des *NOD2* Gens nahe, der in dieser Arbeit weiter untersucht werden soll. Zudem ist denkbar, dass Polymorphismen im *NOD2* Gen die postoperative Adaptation des Darms beeinflussen.

1.4 Zielstellung

Die Zielstellung dieser Arbeit war es, zum einen Mechanismen der Mukosa-Adaptation in Mäusen nach Ileozökalresektion (ICR) zu untersuchen. Dabei sollten neben dem klinischen Verlauf (Wohlbefinden, Gewicht, Stuhlkonsistenz) sowohl histomorphologische Aspekte (Zottenlänge, Kryptentiefe), als auch die Expression von Ionentransporter (DRA, NHE3 und CFTR) und des antimikrobiellen Peptids Lysozym berücksichtigt werden.

Zum anderen sollte wegen des vermehrten M. Crohn unabhängigen Auftretens von NOD2 Mutationen bei KDS Patienten der Einfluss der *Nod2*-Defizienz auf den Verlauf des Kurzdarmsyndroms im Mausmodell untersucht werden. Hierzu erfolgte ein Vergleich der Adaptation zwischen Wildtyp (WT) und *Nod2* knockout (*Nod2* KO) Mäusen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Mäuse

Es wurden C57BL/6J Wildtyp (WT, Stock No: 000664) und B6.129S1-*Nod2*^{tm1Flv/J} (*Nod2* knockout, *Nod2* KO, Stock No: 0055763) Mäuse von der Firma *Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA* [42] bezogen und in der zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Institutes für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock gezüchtet (Leitung Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar). Die Haltung der Mäuse erfolgte unter Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU unter SPF („Specific Pathogen Free“) - Bedingungen. Eine Genotypisierung der Mäuse erfolgte nach Angaben des Züchters unter Verwendung folgender Primer: *Nod2* Wildtyp Allel forward 5´ACAGAGATGCCGACACCATACTG3´; *Nod2* Wildtyp Allel reverse 5´TGGAGAAGGTTGAAGAGCAGAGTC3´; *Nod2* Mutanten Allel forward 5´TGACTGTGGCTAATGTCCTTTGTG3´; *Nod2* Mutanten Allel reverse 5´TTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTC3´. Für die Experimente wurden homozygote Geschwistertiere zwischen der Generation F2 und F5 verwendet.

Eine Genehmigung nach §7 Abs.2 Satz 2 TierSchG der zuständigen Landesbehörde (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern) liegt unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-002/13 vor. Drei Tage vor Versuchsbeginn bis Versuchsende wurden die Tiere in die konventionelle Haltung verbracht. Dort lebten sie in Gruppen bis zu fünf Mäusen mit freiem Zugang zum Standardfutter und zu Wasser bis zur operativen Intervention.

Männliche WT und *Nod2* KO Mäuse mit einem Alter zwischen 3 und 6 Monaten und einem Gewicht zwischen 26 und 34 g erhielten eine ICR oder Sham-Operation (einfache Transsektion ohne Resektion). Aus der Gruppe der WT ICR Mäuse wurden n = 8 nach 7 d und n = 9 Mäuse nach 14 d untersucht. Entsprechend wurden von den *Nod2* KO Tieren je n = 8 nach 7 d und n = 9 nach 14 d untersucht.

Aus der Gruppe der WT Sham Tiere wurden n = 8 (7 d) und n = 9 (14 d), sowie n = 7 (7 d) und n = 6 (14 d) der *Nod2* KO Sham Mäuse untersucht.

2.2 Das Mausmodell

2.2.1 Vorbereitungen der Mäuse

Die Mäuse der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden einen Tag vor der geplanten Operation auf Flüssignahrung (*AIN 76A, ssniff®*, *Soest, Deutschland*) umgestellt, die *ad libitum* angeboten wurde. Außerdem wurden die Mäuse in Einzelkäfige umgesetzt und Gewicht und Stuhlkonsistenz der Mäuse nach Futterumstellung beobachtet.

2.2.2 Ileozökalresektion

Die Ileozökalresektion wurde nach einem ursprünglich von Dekaney et al. [27] publizierten und im gastroenterologischen Forschungslabor um Professor Lamprecht weiterentwickelten Modell [43] durchgeführt. Die Mäuse erhielten eine intraperitoneale Injektionsnarkose aus einer Kombination aus Ketamin (80-100 mg/kg KG) und Xylazin (5-15 mg/kg KG). Nach Eintreten des chirurgischen Toleranzstadiums (Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes) wurde der Bauch rasiert und die Augen wurden mit einer Fettsalbe vor dem Austrocknen geschützt.

Auf einer Wärmeplatte wurde die Maus mit Seidenpflaster an den Extremitäten in Rückenlage fixiert. Mit einer rektalen Sonde wurde kontinuierlich die Körpertemperatur kontrolliert. Zusätzlich wurde eine Isolierfolie über dem Tier positioniert, um Wärmeverlust zu verhindern. So konnte eine relativ konstante Körpertemperatur von 37 °C gewährleistet werden.

Die Tiere wurden intubiert, um eine intraoperative Hypoxie zu vermeiden und die Narkose abzusichern. Der Kopf des Tieres wurde zuerst zum Operateur ausgerichtet und mit einem Gummiband, das von den Schneidezähnen zur Heizplatte lief, in dieser Lage stabilisiert. Die Zunge wurde mit einer anatomischen Pinzette seitlich positioniert und der Hals von außen mit einer flexiblen Kaltlichtquelle beleuchtet. Dann konnte der Laryngoskop-Spatel über die Mundhöhle in die Trachea eingeführt werden. Als Tubus diente eine 22G Venenverweilkanüle (*Braun, Introcan-Safety, 0,9 x 25 mm*) ohne Flügel, an den das Beatmungsgerät (*Mouse Ventilator Minivent, Type 845, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland*) angekoppelt wurde. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft bei 120 Atemzügen pro Minute, sowie einem Atemzugvolumen von 200 µl.

Die Operation war für WT und Nod2 KO Mäuse identisch und wurde unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Universal S3, Zeiss, Deutschland) in 16x Vergrößerung vorgenommen. Die Operation fand unter semi-sterilen Bedingungen statt.

Es wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und der distale Dünndarm, ausgehend vom Zökum luxiert. Die Gefäße wurden mit Microclips (*Weck®, Horizon™, Teleflex Medical, Kernen, Deutschland*) isoliert. Es wurden zwei Transsektionen vorgenommen. Die erste direkt distal des Zökums, die andere etwa 11 -12 cm proximal davon, sodass das Zökum mit dem Ileum reseziert werden konnte. (Abbildung 1). Bei einer Dünndarmlänge von circa 29 cm entspricht diese Vorgehensweise einer 40 %igen ICR. Der verbliebene Darm wurde über eine allschichtige End-zu-End-Anastomose als Jejunokolostomie mit 11-13 Einzelknopfnähten (*10-0 Prolene*) rekonstruiert. Der verkürzte Darm wurde reponiert, wobei tropfenweise in den Bauchraum gegebene Kochsalzlösung der Adhäsionsprophylaxe diente. Danach wurden Muskel, Faszie und Haut mit einem 6-0 Faden (*Maxon PDS*11*) verschlossen. Die Faszie wurde

fortlaufend genäht und die Haut mit 4 Einzelknopfnähten verschlossen. Nach dem Hautverschluss wurde die Haut erneut desinfiziert. Bei den Sham Mäusen wurde der Darm auch nach oben genanntem Schema luxiert und präpariert und dann nur einmal, 11 cm proximal des Zökums, durchtrennt (Abbildung 2). Der Darm wurde über das gleiche Verfahren wie bei der ICR wieder konnektiert und die Mäuse unter gleichen Umständen wie die resezierte Gruppe weiter behandelt.

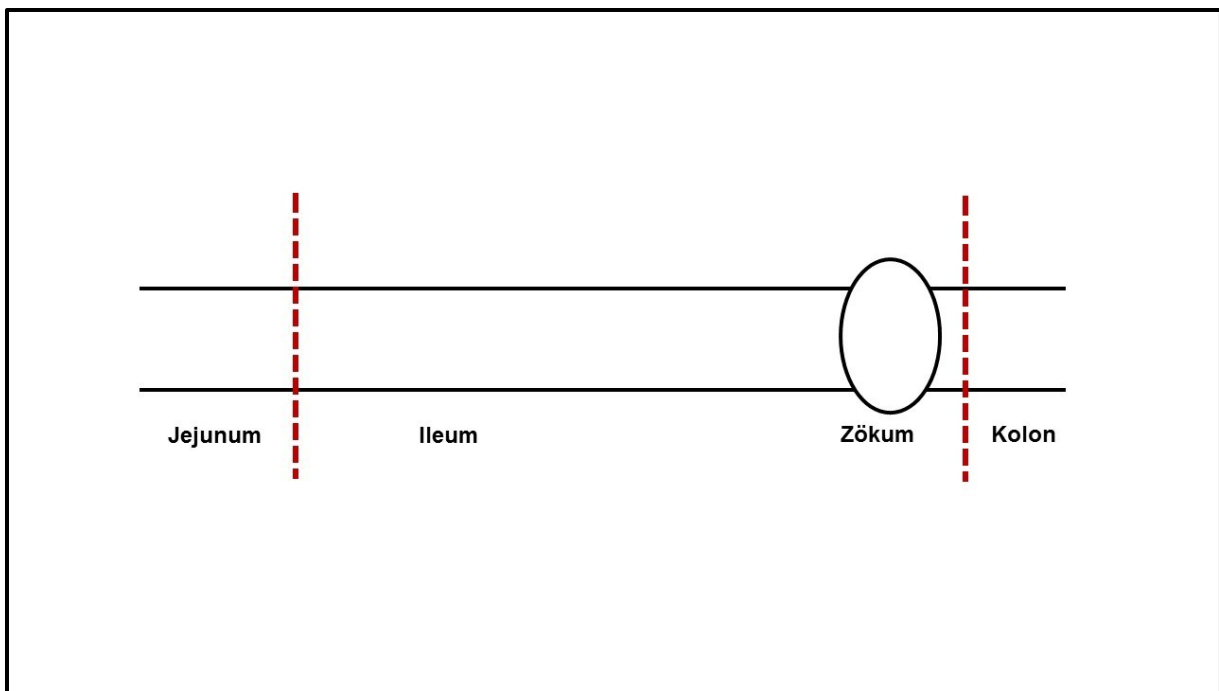


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Darms zur Operation (0 h); Die rot gestrichelten Linien entsprechen den Orten der Transsektion des Darms direkt distal des Zökums sowie etwa 11-12 cm proximal davon

Im Anschluss an die Operation wurden die Mäuse erneut gewogen und erhielten Carprofen (50 mg/kg KG) s. c. sowie 1 ml Sterofundin als Flüssigkeitsdepot.

In einem beheizten Aufwachkäfig mit konstanten 29 °C erholte sich die Maus für vier Stunden. Danach erfolgte das Umsetzen in den Heimatkäfig, in dem auch wieder Flüssignahrung angeboten wurde. Bis drei Tage nach der Operation und bei Bedarf darüber hinaus, wurde eine Schmerzprophylaxe mit Novaminsulfon-ratiopharm 500 mg/ml im Trinkwasser durchgeführt.

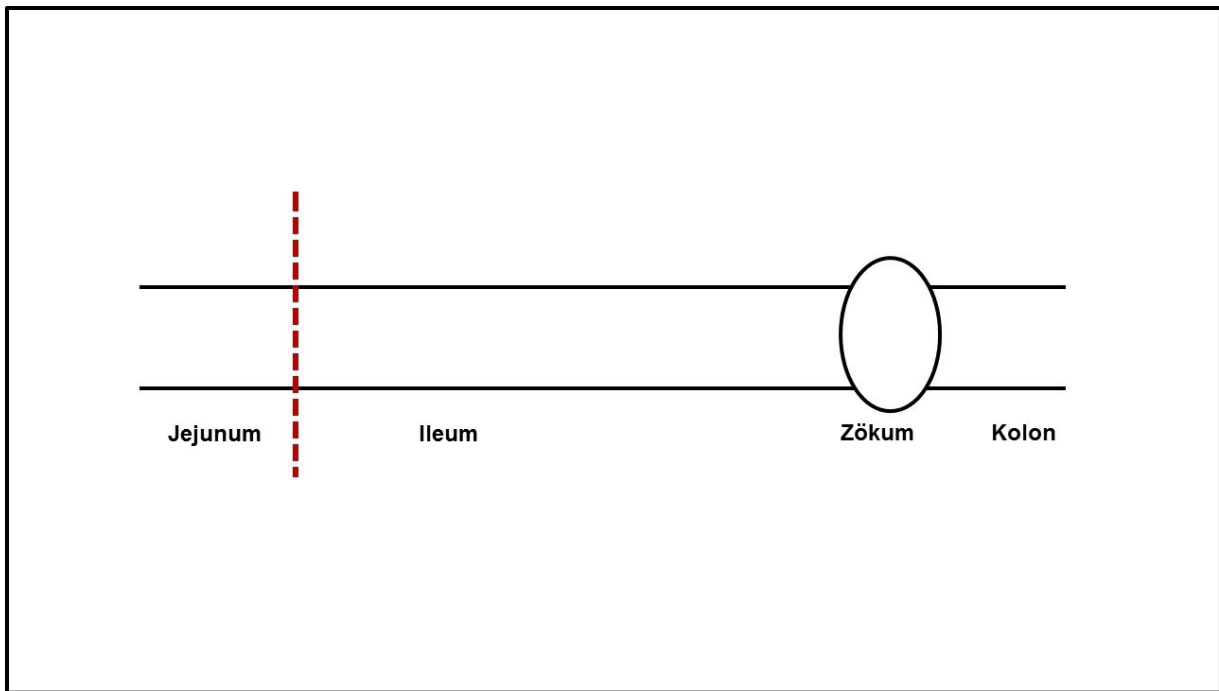


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Operation der Sham-Kontrolltiere; Situation des Darms zum Zeitpunkt der Operation (0 h). Die rot gestrichelte Linie entspricht dem Ort der Transsektion des Darms

2.2.3 Wellness-Score

Vier Stunden postoperativ wurde ein Wellness-Score, modifiziert nach Komen et al. [44] (Tabelle 1) das erste Mal erhoben und danach täglich für die nächsten 7 bzw. 14 Tage. Wenn der Score unter 4 Punkten lag oder das Gewicht auf unter 70 % des Ausgangsgewichtes gesunken war, wurde die Maus vorzeitig getötet (Abbruchkriterien). Es wurde eine Obduktion durchgeführt, in der Leber, Milz, Peritoneum und andere Organe begutachtet wurden, um die Ursache des schlechten Zustandes zu ermitteln.

Tabelle 1: Wellness-Score nach Komen et al. [44]

Parameter	Schweregrad	Score
Aktivität	normal/mittel/gering	2/1/0
Fell	glatt/aufgerichtet/struppig	2/1/0
Augen	sauber, offen/sauber, geschlossen/schmutzig, geschlossen	2/1/0
Aufrechter Stand	ja/nein	1/0
Haltung	normal/leicht buckelig/stark buckelig	2/1/0
Fußhochstand	ja/nein	1/0
Schüttelfrost	nein/ja	1/0

Zudem fand eine tägliche Kontrolle des Gewichtes und der Stuhlkonsistenz (Tabelle 2) statt. Käfig, Flüssignahrung und Trinkwasser wurden täglich erneuert.

Tabelle 2: Beurteilung der Stuhlkonsistenz

Stuhlkonsistenz	Score
Durchfall	0
Breiiger Stuhl	1
Geformter Stuhl	2

2.2.4 Entnahme des Darmgewebes

Das zum Zeitpunkt der Operation (0 h) gewonnene Gewebe diente dem histomorphologischen und molekulargenetischen Vergleich des Darmepithels vor- und nach der Operation (7, 14 d). Die Länge des resezierten Darms wurde gemessen, der Darm gespült und in Abschnitte von je einem Zentimeter Länge geteilt. Je im Wechsel wurde ein Zentimeterabschnitt in 4 %igem Formalin (für spätere Histologie) oder in flüssigem Stickstoff (für RNA Versuche) asserviert.

Nach 7 bzw. 14 d wurde die Maus in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Der Bauchraum wurde eröffnet und der Darm ab Pylorus bis Rektum reseziert. Der entnommene Darm wurde gespült und in 1 cm lange Abschnitte geteilt. Die Abschnitte wurden wie am Tag der Operation abwechselnd in 4 %igem Formalin oder Stickstoff asserviert.

2.2.5 Untersuchte Darmabschnitte

2.2.5.1 Vorarbeiten

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden die basalen Expressionsmuster von Transmembran- und Adapterproteinen entlang der Längsachse in WT und Nod2 KO Mäusen untersucht (Dissertation Daniel Bastmeyer). Die Ergebnisse zeigten, dass WT und Nod2 KO Mäuse kaum Unterschiede in der basalen Expression aufwiesen. Einzige Ausnahme war NHE3, dessen Expression im Dickdarm und Zökum (bezogen auf Zytokeratin 18), sowie im proximalen Jejunum und Duodenum (bezogen auf Villin) in Nod2 KO Mäusen signifikant höher exprimiert war. Diese Ergebnisse belegen, dass sich in den untersuchten Abschnitten die basale Expression der Gene zwischen WT und Nod2 KO Tieren nicht unterscheidet. Somit sind Veränderungen der Expression vergleichbar und auf individuelle Adaptation der Mäuse zurückzuführen.

In dieser Arbeit wurden anatomisch direkt nebeneinanderliegenden Darmabschnitte verglichen: Am Tag der Operation (0 h) wurde von dem resezierten Darm der am weitesten proximal gelegene Abschnitt untersucht. 7 bzw. 14 d nach der Operation wurde der Zentimeter proximal der Anastomose für die Untersuchung verwendet.

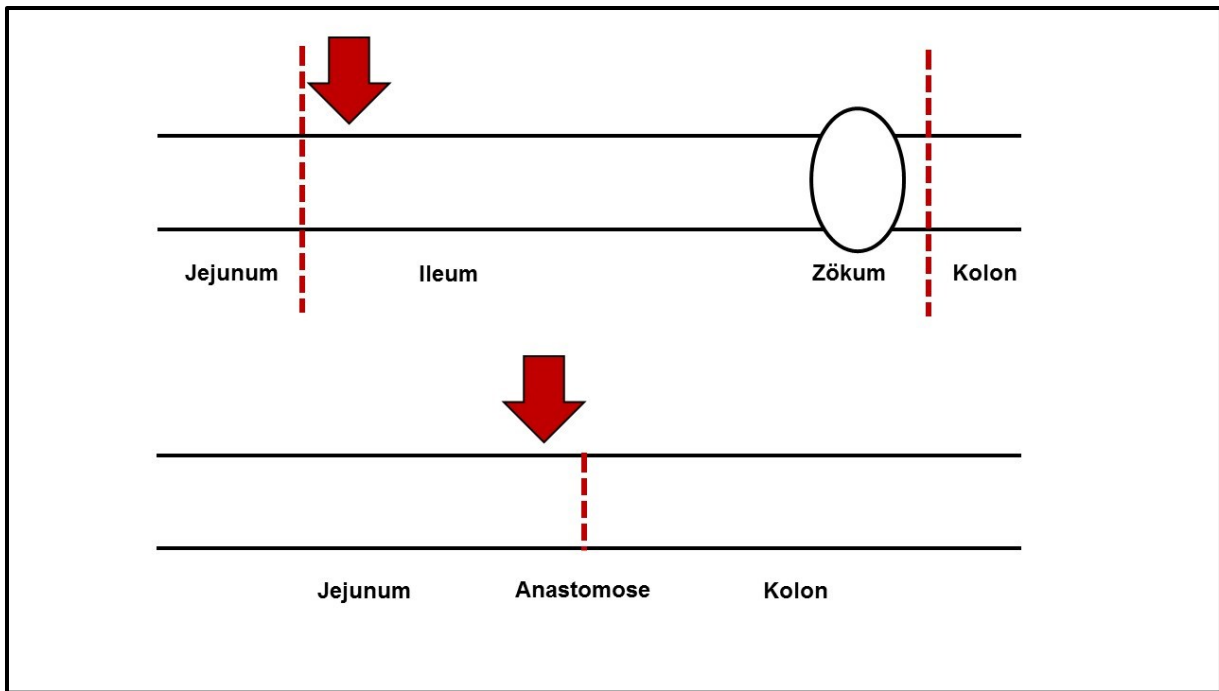


Abbildung 3: Gewebeentnahmen zum Zeitpunkt der Operation 0 h (oben) und nach 7 bzw. 14 d (unten). Die rot gestrichelte Linie entspricht dem Ort der Transektion des Darms; die roten Pfeile entsprechen jeweils den untersuchten Darmabschnitten

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA Isolation aus Darmgewebe

Zum Ausschluss einer Kontamination mit RNasen, wurden Oberflächen und Pipetten mit 70 %igem Isopropanol gereinigt.

Verwendet wurde das *RNeasy Minikit (250)* nach der Anleitung des Herstellers (*RNeasy Mini Handbook, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland*).

Es wurden maximal 30 mg des in Stickstoff konservierten Darmgewebes abgewogen und in ein vorgekühltes, RNase-freies 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe einer Stahlkugel (*Stainless Steel Beads 7 mm, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland*), sowie RLT Puffer und β -Mercaptoethanol, wurde das Gewebe im *Tissue Lyser LT (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)* für 5 min bei 50 Hz homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 min. Der abgenommene Überstand wurde mit 70 % Ethanol gemischt, auf eine *RNeasy Säule* gegeben und 15 s bei 8.000 rpm zentrifugiert.

Im Schritt der DNase-Verdauung wurde das Lysat mit RW 1-Puffer für 15 s bei 8.000 rpm gewaschen und für 15 min mit einem DNase-Mix (DNase- Stocklösung (*RNase- Free DNase Set, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland*), sowie RDD Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit RW 1- Puffer gewaschen.

Es folgten zwei weitere Waschungen mit RPE- Puffer (mit absolutem Ethanol versetzt), wobei jeweils für 15 s bzw. 2 min zentrifugiert wurde.

Nach Überführen der Säule auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß, wurde die RNA mit 30-40 μ l RNase freiem Wasser für 1 min bei 8.000 rpm eluiert und stand für weitere Verwendungen bereit.

2.3.2 Bestimmung der RNA Konzentration mit dem Nanophotometer

Mit dem Nanophotometer wurde die Konzentration (ng/ μ l) der isolierten RNA bestimmt. Zudem war über die Absorption die Reinheit beurteilbar. Dies geschieht auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt das Absorptionsmaximum von RNA und DNA. Proteine werden bei 280 nm, Phenole, aromatische Verbindungen und Salze bei 230 nm absorbiert. Über die 260/280 Ratio kann der Reinheitsgrad der isolierten RNA bestimmt werden [45]. Beträgt der Wert 2,0, ist von einer reinen RNA ohne Verunreinigung auszugehen, da andernfalls die Ratio signifikant kleiner als 2,0 wäre [46]. Es wurde sichergestellt, dass nur RNA mit einem Reinheitsgrad zwischen 1,8 und 2,2 zur Verwendung kam [47].

2.3.3 Gelelektrophorese

Eine weitere Qualitätskontrolle hinsichtlich der Integrität der RNA fand mit Hilfe eines 1,5 %igen Agarosegels statt. Über Anlegen eines elektrischen Feldes wurde die RNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel bestand aus 1,5 g Agarose, die mit 100 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE- Puffer) aufgekocht und mit 4 µg Ethidiumbromid versetzt wurde. Das Gemisch härtete einige Minuten horizontal aus.

Zu je 1 µg der RNA-Probe wurden 2 µl Ladepuffer gegeben und in die Taschen des Gels aufgebracht. Als Marker (8 µl) wurde der *Mass Ruler Express DNA Ladder Mix Reverse (ThermoFisher)* verwendet. Die RNA wurde etwa eine Stunde in einer Elektrophoresekammer (50 mA, 60 V) aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde kontrolliert, ob scharf abgetrennte 28S- und 18S-Banden vorhanden waren, die das Kennzeichen der ribosomalen RNA darstellen.

2.3.4 Synthese der cDNA

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo fisher scientific)* verwendet. Es wurde ein Mastermix, wie in Tabelle 3 aufgeführt, pipettiert. Von der RNA wurden je 2 µg eingesetzt. Über die vorher im Nanophotometer gemessene Konzentration wurde das Volumen der Probe berechnet, das 2 µg RNA im 10 µl RNA-Wasser-Gemisch enthielt. Durch Zugabe von je 10 µl Mastermix ergänzte sich das Reaktionsvolumen auf 20 µl. Im *ThermoCycler (Biozym)* wurde nach dem in Tabelle 4 aufgeführten Temperaturprotokoll die cDNA synthetisiert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die cDNA Synthese

Komponenten	Volumen [µl]
10x Reverse Transcription Buffer	2,0
25x Deoxynucleotide (dNTP) Mix (100 mM)	0,8
10x Reverse Transcription Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0
RNase Inhibitor 100	1,0
Nuklease-freies H ₂ O	3,2
Gesamtvolumen pro Reaktion	10,0

Tabelle 4: cDNA-Synthese Temperaturprotokoll

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

2.3.5 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (real-time qPCR)

Nukleinsäuren können über eine PCR vervielfältigt werden. Die quantitative real-time PCR ermöglicht zusätzlich über Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung der Zielsequenzen in Echtzeit. Ein Anstieg der Fluoreszenz zeigt sich, wenn die Zielsequenz amplifiziert wurde [48]. Dabei wurden TaqMan[®]-Sonden verwendet, die über einen Primer an Oligonukleotide binden und einen Fluoreszenzfarbstoff tragen [49]. Die Phase der exponentiellen Vervielfältigung ermöglicht eine Quantifizierung. Der CT-Wert (Threshold Cycle) gibt dabei an, in welchem Zyklus erstmals die Fluoreszenz größer als die Hintergrundfluoreszenz ist [49]. Die Expression der Zielgene DRA (*Mm01291072_m1*), NHE3 (*Mm01352483_m1*), CFTR (*Mm00445197_m1*) und Lysozym (*Mm00727183_s1*) wurde gegen die Haushaltsgene β -Aktin (*Mm00607939_s1*) und Villin (*Mm00494146_m1*) abgeglichen.

Nach dem Ansatz aus Tabelle 5 wurden die Proben als Triplikate auf eine 96-Well-Reaktionsplatte aufgetragen. Es wurden je 15 ng der cDNA verwendet. Außerdem wurden für jedes Triplikat Negativkontrollen mit 3 μ l Nuklease-freiem Wasser mitgeführt. Die PCR Reaktion erfolgte am *ViiATM 7* Echtzeit-PCR Cycler (*Thermo fisher scientific*). Das Temperaturprotokoll der real-time qPCR ist in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches

Komponenten	Volumen [μ l/Reaktion]
2x TaqMan [®] -Universal PCR Master Mix	6,25
H ₂ O	3,125
cDNA (15 ng)	3,0
TaqMan [®] -Assay	0,625
Summe	13

Tabelle 6: real-time qPCR Temperaturprotokoll

	1 Zyklus	40 Zyklen	
	Aktivierung Poly- merase	Denaturierung	Annealing/ Elonga- tion
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit	10 min	15 s	1 min

Die Auswertung wurde mit der ViiA™ 7 Software vorgenommen. Als ΔCT wird dabei die Differenz des CT-Wertes des Zielgens vom CT-Wert des Haushaltsgens bezeichnet. Diese ΔCT Werte wurden potenziert und als $2^{-(\Delta CT)}$ dargestellt.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Vorbereitungen der Gewebeprobe

Während der Operation bzw. Gewebeentnahme wurde jeder zweite Zentimeterabschnitt des Darms in 4 % Formafix® konserviert und später in Biopsiekassetten getan, bzw. aufgenäht (Anastomose), die nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Schema in der Histokinette fixiert wurden. Nach Ablauf der 24 h wurden die Proben am Einbettautomaten in Paraffin (56 °C) eingelassen und nach Abkühlung mit Hilfe eines Mikrotoms (*Zeiss HYRAX M55*) geschnitten.

Tabelle 7: Fixierung des Gewebes in der Histokinette

Position	Lösung	Zeit
C1	Frei-Trocknen	2 min
C2	Aqua dest.	20 min
C3	Ethanol 50 %	1 h
C4	Ethanol 70 %	1 h
C5	Ethanol 80 %	1 h
C6	Ethanol 96 %	1 h
C7	Ethanol absolut	1 h
C8	Ethanol absolut	1 h
C9	Xylol	4 h
C10	Xylol	4 h
C11	Paraffin	4 h
C12	Paraffin	4 h

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Die Gewebeproben (Schnittdicke 6 µm) des Darms sollten mikroskopisch nach der Zottenlänge und der Kryptentiefe beurteilt werden. Die H.E. Färbung diente hierbei als Übersichtsfärbung, bei der das Eosin eosinophile Strukturen (Kollagen, Keratin, Zellplasmaproteine, Mitochondrien, glattes endoplasmatisches Retikulum) rot anfärbt [50, 51], während basophile Zellbestandteile (Zellkern, raues endoplasmatisches Retikulum) eine blaue Färbung erhalten [51]. Der Ablauf der Färbung ist in Tabelle 8 dargestellt. Nach Trocknung wurde jeder Schnitt mit Eindeckmedium (*PERTEX*[®]) benetzt und mit einem Deckglas versehen.

Von jedem Tier wurden pro Untersuchungszeitpunkt je 10 Zotten und Krypten vermessen.

Tabelle 8: Ablauf der H.E.-Färbung

Lösung	Zeit	Vorgang
Xylol	1 min	Entparaffinieren
Xylol	1 min	Entparaffinieren
96 % Ethanol, vergällt	1 min	Wässern
96 % Ethanol, vergällt	1 min	Wässern
70 % Ethanol, vergällt	1 min	Wässern
Hämalaun	8 min	Färbung basophiler Zellbestandteile
Aqua nondest	7 min	Spülen
Eosin	1 min	Färbung eosinophiler Zellbestandteile
Aqua dest	1 min	Spülen
70 % Ethanol, vergällt	1 min	entwässern
96 % Ethanol, vergällt	1 min	entwässern
96 % Ethanol, vergällt	1 min	entwässern
Xylol	1 min	entwässern
Xylol	1 min	entwässern

2.4.3 Immunhistologische Färbungen

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen sollte die Verteilung des Haushaltsgens *Villin* entlang der Krypt-Villus-Achse visualisiert werden.

2.4.3.1 Problematik der Normierung

Da die Lokalisation der funktionell-aktiven Transporter an der Oberfläche des Epithels beschrieben wird, kommt man zu dem Schluss, dass ein möglichst epithelspezifisches Haushaltsgen für die Normierung herangezogen werden muss. Um die Lokalisation des Haushaltsgens Villin in der Darmwand zu visualisieren, wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen.

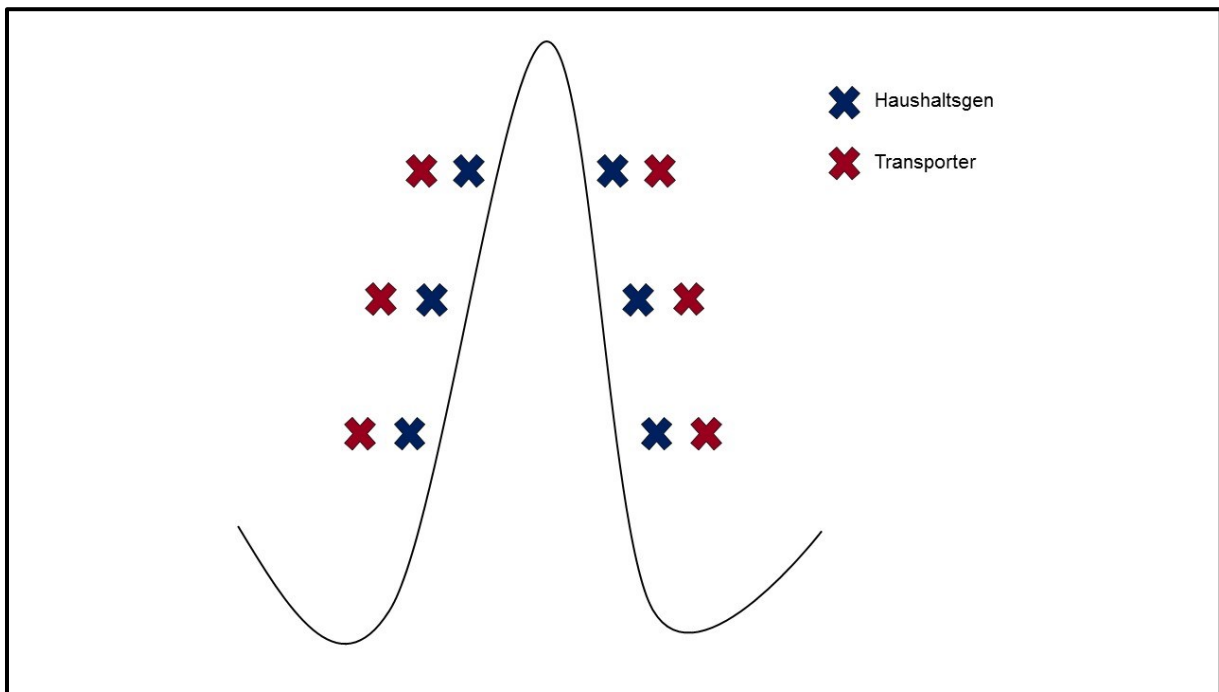


Abbildung 4: Schematische Abbildung eines Villus mit möglicher Verteilung von Haushaltsgen zu Transporter an der Oberfläche

Ein Villus ist schematisch abgebildet. Die Kreuze stellen jeweils einen Ort der Expression eines Haushaltsgens (blau), bzw. Transporters (rot) dar. Wenn Villin, wie die Transporter, nur an den Spitzen der Zotten exprimiert wäre, würde der ΔCT Wert der einzelnen Transporter von 0 h zu 7/14 d im Verhältnis zum Haushaltsgen gleichbleiben. Ist Villin aber über das Epithel der gesamten Zotte exprimiert und der Transporter nur an der Spitze, ist ein Anstieg der Expression von 0 h auf 7/14 d messbar. Daher wurde mit der Immunhistochemie gezeigt, dass Villin über die gesamte Krypt-Villus-Achse gleichmäßig exprimiert und damit als Haushaltsgen geeignet

ist. Als andere Haushaltsgene wurden β -Aktin und Zytokeratin 18 gemessen, hier jedoch auf die Darstellung verzichtet, da bei der Normierung keine nennenswerten Unterschiede auftraten.

2.4.4 Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Als Detektionssystem für die immunhistochemischen Färbungen wurde Meerrettich-Peroxidase (HRP) verwendet. Die Meerrettich-Peroxidase kann mithilfe von Wasserstoff viele Zellbestandteile oxidieren, was durch einen Farbumschlag gekennzeichnet wird [52]. Verwendet wurden die Antikörper Aktin (*13E5, rabbit, mAb, cell signaling technology*) und Villin (*ab 3304, mouse anti mouse, abcam*).

Zur Deparaffinierung und anschließenden Rehydrierung wurde der Objektträger mit den Gewebeproben je eine Minute erst zweimal in Xylol sowie 96 % Ethanol, dann je einmal in 70 % Ethanol und Aqua dest getaucht.

Der folgende Schritt diente der Hitze-induzierten Antigen-Demaskierung. 10x konzentrierter Citratpuffer wurde 1:10 mit Aqua dest verdünnt und auf den pH 6,0 eingestellt. In diesem Puffer wurde das „Antigen-Retrieval“ mit Hilfe eines Schnellkochtopfes (*Retriever2100*) über Nacht durchgeführt. Die Proben wurden hierbei für 20 min auf 95 °C erhitzt und kühlten dann langsam ab.

Es wurden 5 l Waschpuffer (1x Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-Tween-20) 0,1 %) nach Tabelle 9 angesetzt.

Tabelle 9: Waschpuffer Immunhistologie

140 mM NaCl
15 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
0,1 % Tween-20
Auffüllen auf 5 l mit Aqua dest.
ph 7,6 einstellen

Die Schnitte wurden mit 1x TBS-Tween-20 0,1 % gewaschen und mit Fettstift umrandet.

Um endogene Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur mit Bloxall Blocking Solution inkubiert. Es folgte eine Waschung mit 1x TBS/0,1 % Tween-20 für 5 min auf dem Wipptisch.

Um die spezifische Färbung mit einem aus der Maus stammenden Antikörper auf Mausgewebe zu ermöglichen, erfolgte ein zusätzlicher Blockierungsschritt mit dem DCS Crystal Maus Block (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg). Die Schnitte wurden für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit Crystal A inkubiert. Nach 3x 2 min Waschung in 1x TBS/0,1 % Tween-20 fand für 5 min eine Inkubation mit Crystal B bei Raumtemperatur statt, worauf drei erneute Waschungen für 2 min folgten.

Im nächsten Schritt erfolgte eine weitere Blockierung unspezifischer Bindungen mit 2 % Ziegen Serum in Phosphate Buffered Saline (PBS). In dem Blocking-Puffer fand die Verdünnung der primären Antikörper statt (Aktin 1/100, Villin 1/50). Auf jeden Schnitt wurden 100 µl pipetiert und 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde erneut mit 1x TBS/0,1 % Tween-20 für 3x 2 min gewaschen.

Für die Inkubation mit dem Färbungsreagenz (30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer), wurden je Schnitt 50 µl Meerrettichperoxidase (HRP) und 50 µl Alkalische Phosphatase (AP) vorher gemischt und auf jeden Schnitt gegeben. Es folgten drei Waschungen für je 2 min.

Die Inkubation mit den frisch hergestellten Substratlösungen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (8 min) und Permarot (5-20 min) erfolgte nacheinander in einer feuchten Kammer. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 2 min fand die Kernfärbung mit Hämatoxylin (1 min) statt. Die Schnitte wurden 1 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und dann mit Eindeckmedium (*PERTEX*[®]) bedeckt.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics® Version 22 (*IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.*). P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen; es wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Stichproben wurden mit dem Shapiro Wilk Test auf Normalverteilung getestet. Lag keine Normalverteilung vor, wurden der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben und der Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Die Grafiken wurden mit Graph Pad Prism® 4 erstellt (*GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA*). Für einige Abbildungen wurde Microsoft® Powerpoint® 2016 verwendet.

Für alle erhobenen Daten wurde in den WT und Nod2 KO ICR Gruppen ein gepaarter Vergleich zwischen 0 h (Zeitpunkt der Operation) und 7 d bzw. 14 d vorgenommen. Darüber hinaus wurden WT ICR und Nod2 KO ICR Mäuse sowie WT Sham gegen ICR und Nod2 KO Sham gegen ICR ungepaart zum Zeitpunkt 7 d bzw. 14 d miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Klinischer Verlauf

3.1.1 Wellness-Score

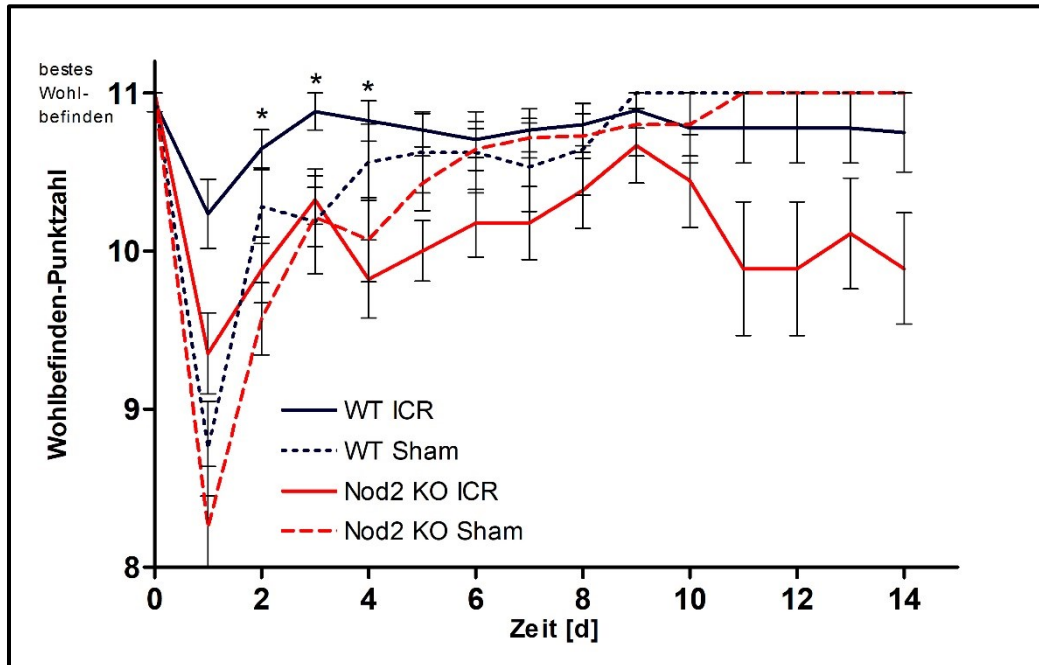


Abbildung 5: Das Wohlbefinden (Wellness-Score) von Wildtyp Mäusen (WT) und Nod2 knockout Mäusen (Nod2 KO) nimmt nach Ileozökalresektion (ICR) bzw. Sham Operation (Sham) ab. Das Wohlbefinden ist an den Tagen 2-4 signifikant schlechter in Nod2 KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen; MW \pm SEM; ICR: n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben.

* p < 0,05; WT ICR vs. Nod2 KO ICR; U-Test

Das Wohlbefinden der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen anhand des Wellness-Scores beurteilt. Elf Punkte entsprachen dabei dem maximal erreichbaren Wert (keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens).

Der Wellness-Score der WT Mäuse und der Nod2 KO Mäuse sank in beiden Gruppen nach Resektion auf minimal 9,7 Punkte (Nod2 KO, d1) ab. Der maximale Ausgangswert von elf Punkten wurde innerhalb der 14 Tage zwar nicht wieder erreicht, das Wohlbefinden beider resezierten Gruppen war jedoch während der gesamten Versuchsdauer gut.

Signifikant schlechter war das Wohlbefinden der Nod2 KO Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen in der frühen Phase nach Resektion, zwischen Tag 2 und Tag 4 (d 1 p = 0,039; d 2 p = 0,032; d 3 p = 0,003).

Aus Abbildung 5 ist ebenfalls ersichtlich, dass alle Sham-operierten Tiere schnell wieder zu einem guten Wohlbefinden gelangten und auch den maximalen Ausgangswert wieder erreichten.

3.1.2 Gewicht

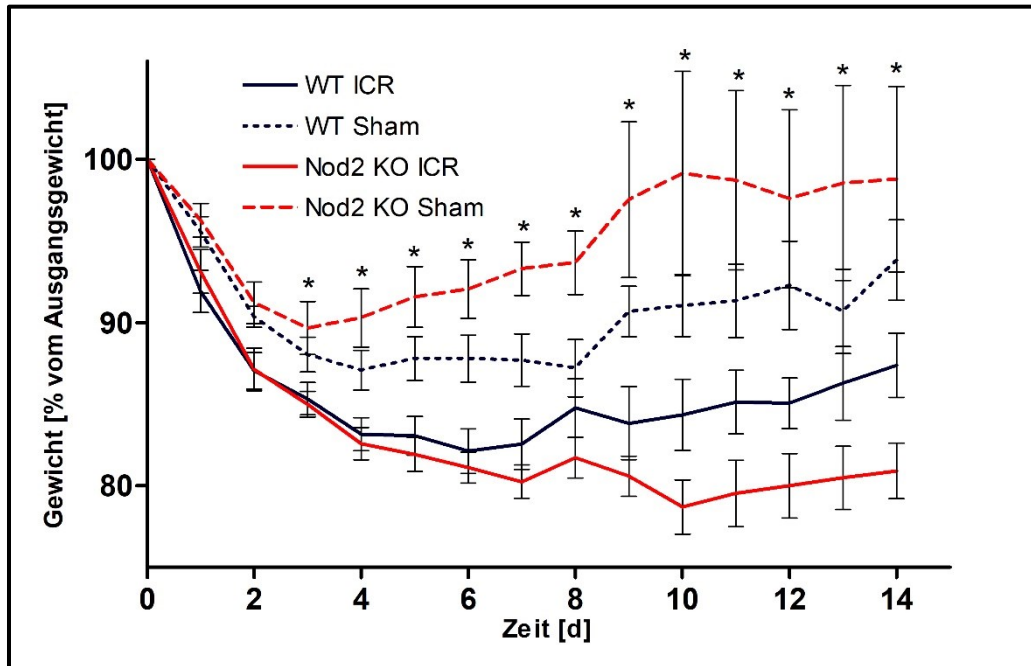


Abbildung 6: Verlauf des Gewichtes von Wildtyp Mäusen (WT) und Nod2 knockout Mäusen (Nod2 KO) nach Ileozökalresektion (ICR) bzw. Sham-Operation (Sham); MW \pm SEM; ICR n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben. * p < 0,05; Nod2 KO Sham vs. Nod2 KO ICR; U-Test

Über 14 Tage wurde die prozentuale Änderung des Gewichtes bezogen auf das Ausgangsgewicht (entspricht 100 %) erhoben. Die Gewichtsabnahme der resezierten WT Mäuse lag bei minimal 80,8 % an Tag 7 (21,7 \pm 0,33 g). Danach stieg das Gewicht relativ konstant auf 86,7 % (d 14; 23,0 \pm 0,22 g).

Eine ähnliche Entwicklung war in der Gruppe der Nod2 KO Mäuse zu beobachten. Das Gewicht sank auf minimal 80,2 % an Tag 7 (22,0 \pm 0,6 g), stieg jedoch lediglich auf 80,6 % (d 14; 23,2 \pm 0,6 g) wieder an. Das Gewicht der Nod2 KO ICR Tiere unterschied sich jedoch statistisch nicht signifikant von dem der WT ICR Tiere.

In der Gruppe der WT Sham Mäuse sank das Gewicht bis Tag 3 auf 86,9 % (25,4 \pm 0,43 g) und stieg dann kontinuierlich bis Tag 14 auf 94,4 % (27,2 \pm 1,15 g).

Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, wiesen die Nod2 KO Sham Mäuse den höchsten Gewichtszuwachs auf. Das Gewicht stieg nach initialer Abnahme bis Tag 2 auf 89,3 % ($27,2 \pm 0,57$ g) kontinuierlich an und hatte nach 14 Tagen den Ausgangswert erreicht. Signifikante Unterschiede zwischen Nod2 KO Sham und Nod2 KO ICR Mäusen lagen an Tag 3 bis 14 vor (d 1 $p = 0,022$; d 2 $p = 0,002$; d 3-7 $p = 0,000$; d 8 $p = 0,010$; d 9 $p = 0,004$; d 10 $p = 0,008$; d 11 $p = 0,012$; d 12 $p = 0,009$; d 13 $p = 0,018$, d 14 $p = 0,005$).

3.1.3 Stuhlkonsistenz

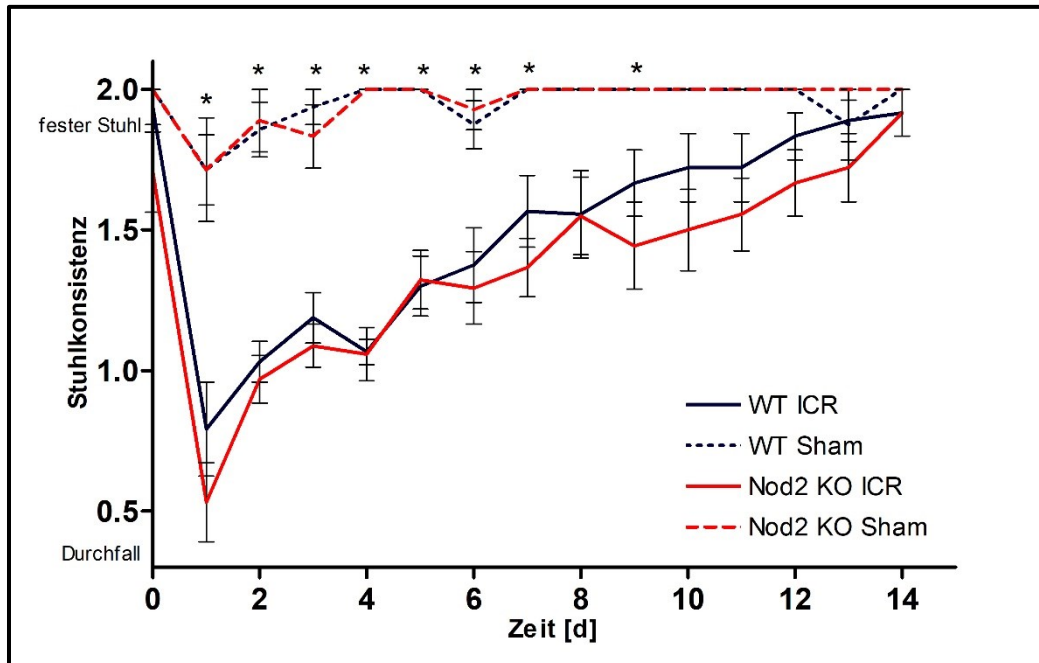


Abbildung 7: Verlauf der Stuhlkonsistenz von Wildtyp Mäusen (WT) und Nod2 knockout Mäusen (Nod2 KO) nach Ileozökalresektion (ICR) bzw. Sham-Operation (Sham); MW \pm SEM; Score: 0 (Durchfall), 1 (breiiger Stuhl), 2 (fester Stuhl); Tiere ICR n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben.

* $p < 0,05$; WT Sham vs. WT ICR; U-Test

* $p < 0,05$; Nod2 KO Sham vs. Nod2 KO ICR; U-Test

Für die Beurteilung der Stuhlkonsistenz im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen, wurde täglich ein Score erhoben. Die Ziffer 0 entsprach Durchfall (ungeformter Stuhl), die 1 breiigem Stuhl und ein Wert von 2 festem Stuhl.

In den beiden resezierten Gruppen entwickelten die Mäuse in den ersten 2 Tagen Durchfall. In den nächsten Tagen wurde der Stuhl zunehmend breiiger und erreichte bis Tag 14 seine normale Konsistenz. Die Stuhlkonsistenz unterschied sich in beiden Gruppen nach Resektion nicht signifikant voneinander.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich ist, war die Stuhlkonsistenz der Sham-operierten Mäuse beider Gruppen nicht verschlechtert. Signifikante Unterschiede lagen zwischen WT Sham und WT ICR Mäusen an Tag 1-7 und an Tag 9 (d 1-6 p = 0,000, d 7 und d 9 p = 0,046), sowie zwischen Nod2 KO Sham und Nod2 KO ICR Tieren an den Tagen 1-7 (je p <0,0001) vor.

3.1.4 Mortalität

Die Mortalität aller operierten Tiere bis Tag 14 lag über alle Gruppen verteilt bei 35 %. Dabei lag die Mortalität der WT Tiere (32 %) unter der Mortalität der Nod2 KO Mäuse (38,5 %).

Bei Betrachtung der Kurzdarm-bedingten Mortalität werden perioperative Komplikationen von Tag 0-3 nicht betrachtet. Die Kurzdarm-bedingte Mortalität lag insgesamt bei 26 %.

Die perioperativen Komplikationen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die perioperativen Komplikationen traten in der Gruppe der Nod2 KO Mäuse häufiger als in den WT Tieren auf.

Tabelle 10: perioperative Komplikationen d 1-3 bei WT vs. Nod2 KO Mäuse

Perioperative Komplikation	Anzahl bei WT	Anzahl bei Nod 2 KO
Anastomoseninsuffizienz	1	3
Ileus	2	6
Sepsis	1	0
Stenose	1	0
Andere/ nicht identifizierbare Todesursache	3	6

Bei den späten Komplikationen (d 4-14) dominierte der Ileus als Todesursache (3x, d 4, d 8 bzw. d 11). Dabei wurden jedoch in der Autopsie weniger Obstruktionen gefunden, sondern vermehrt ein massiv dilatierter Darm ohne Kalibersprung distal der Anastomose.

3.2 Histologische Ergebnisse

Im nächsten Untersuchungsschritt wurden histomorphologische Veränderungen der Darmschleimhaut analysiert. Dabei wurden WT sowie Nod2 KO Mäuse nach ICR und nach Sham-Operation verglichen. In Abbildung 8 sind repräsentative H.E.-Übersichtsfärbungen abgebildet. Diese H.E. gefärbten Schnitte dienten der Messung der Zottenlänge und Kryptentiefe.

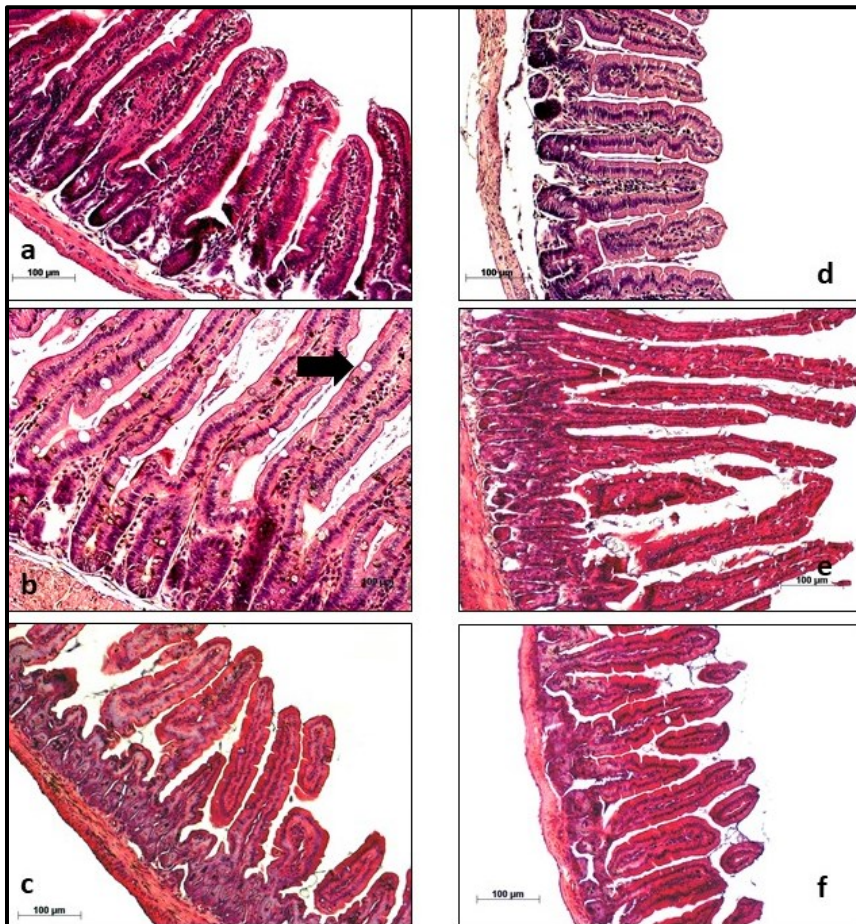


Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbungen des Darms am Beispiel einer Wildtyp (WT) und einer Nod2 knockout (Nod2 KO) Maus zum Zeitpunkt der Ileozökalresektion (ICR) (0 h) und nach 7 d, sowie je einer Sham-Kontrollmaus (Sham) nach 7 d.

a) WT ICR 0 h; b) WT ICR 7 d; c) WT Sham 7 d; d) Nod2 KO ICR 0 h; e) Nod2 KO ICR 7 d; f) Nod2 KO Sham 7 d

Der Pfeil in Abbildung 8 b weist exemplarisch auf eine Becherzelle

Zum Zeitpunkt 0 h stellte sich das typische histologische Bild des Ileums dar (fünfgliedrige Wandschichtung, Peyer-Plaques, Kerckring-Falten). Die Schnitte der WT und Nod2 KO Mäuse wiesen zum Zeitpunkt der Operation keine Unterschiede auf. Nach 7 Tagen (Abbildung 8 b und e) sahen die Zotten der resezierten Tiere in beiden Gruppen deutlich höher, schmaler und fingerförmiger aus und die Anzahl der Becherzellen war erhöht (Pfeil in Abbildung 8 b). Außerdem waren die Krypten tiefer. In den Mäusen nach Sham OP veränderte sich die Gestalt der Zotten nicht.

3.2.1 Zotten

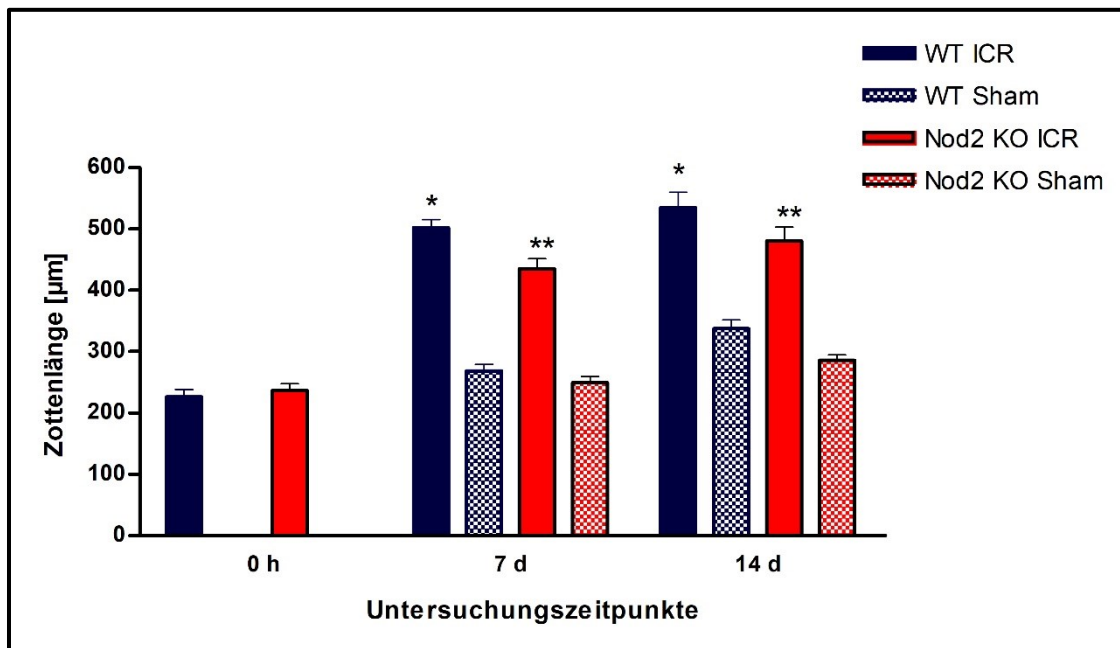


Abbildung 9: Länge der Zotten zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d in Wildtyp (WT), Nod2 knockout (Nod2 KO) und Sham-Kontrolltieren (Sham); MW ± SEM;

Tiere ileozökalresektion (ICR): n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gemessen wurden Tiere, die den geplanten Endpunkt erreichten.

* p < 0,05; WT ICR 0 h vs. 7 d und 0 h vs. 14 d; Wilcoxon-Test

* p < 0,05; Nod2 KO ICR 0 h vs. 7 d und 0 h vs. 14 d; Wilcoxon-Test

Die Ausgangswerte der Zottenlängen zum Zeitpunkt der Operation unterschieden sich in WT und Nod2 KO Tieren nicht voneinander und betragen im Mittelwert $228 \pm 4 \mu\text{m}$ (WT) und $237 \pm 5 \mu\text{m}$ (Nod2 KO). Für Sham-operierte Tiere lag zum Zeitpunkt 0 h kein Untersuchungsmaterial vor, da nur eine Transsektion des Darmes erfolgte.

Sieben Tage nach Operation war die Zottenlänge in den WT ICR Mäusen signifikant auf 229 % gesteigert (p = 0,028), was einer Länge von $524 \pm 17 \mu\text{m}$ entsprach. Bis zu Tag 14 fand eine

weitere leichte Steigerung auf $559 \pm 28 \mu\text{m}$ statt, was einer signifikanten Steigerung auf 245 % im Vergleich zu 0 h entsprach ($p = 0,028$).

Auch bei den resezierten Nod2 KO Tieren lag nach 7 Tagen eine signifikante Steigerung der Zottenlänge auf 191 % vor ($454 \pm 19 \mu\text{m}$, $p = 0,028$). Nach 14 Tagen war im Vergleich zu 0 h eine geringe weitere Steigung auf 197 % messbar ($467 \pm 16 \mu\text{m}$, $p = 0,028$). In beiden resezierten Gruppen fand also das Hauptwachstum der Zotten innerhalb der ersten Woche nach ICR statt.

Der Anstieg der Zottenlänge nach ICR war im Vergleich der WT Gruppe zur Nod2 KO Gruppe weder an Tag 7 noch an Tag 14 signifikant unterschiedlich ($p = 0,2$). Die histomorphologische Adaptation verlief also in beiden Gruppen gleich.

Die Zottenlänge der Sham-operierten Mäuse war weder in WT noch in Nod2 KO Tieren nach Operation verändert.

3.2.2 Krypten

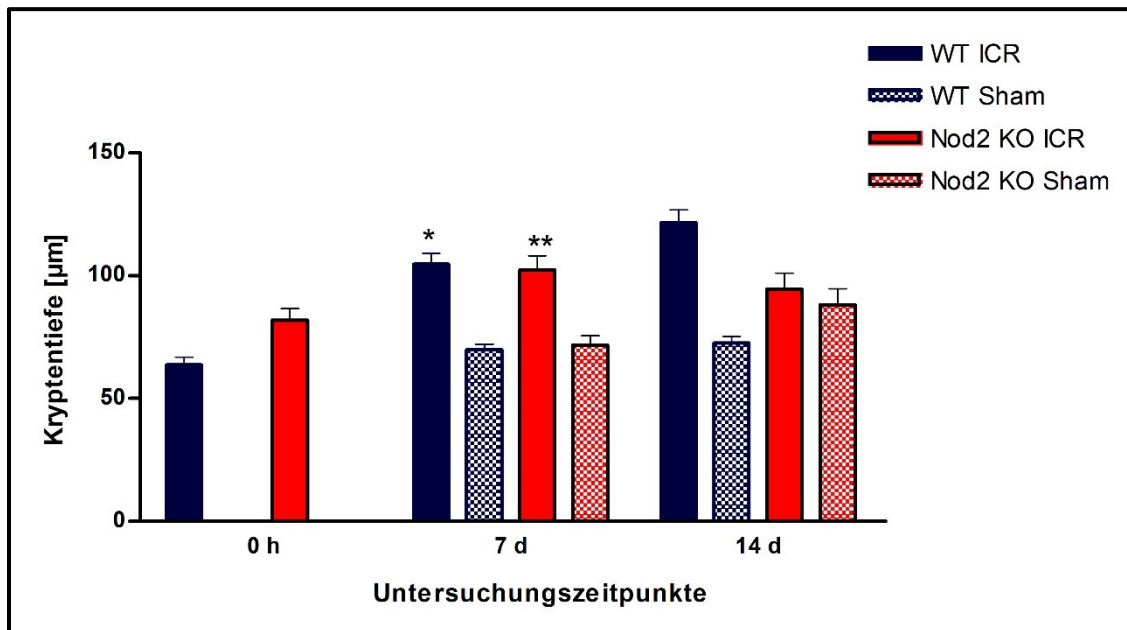


Abbildung 10: Kryptentiefe zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d in Wildtyp (WT), Nod2 knockout (Nod2 KO) und Sham-Kontrolltieren (Sham); MW \pm SEM;

Tiere Ileozökalresektion (ICR): n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gemessen wurden Tiere, die den geplanten Endpunkt erreichten.

* p < 0,05; WT ICR Mäuse 0 h vs. 7 d; Wilcoxon-Test

** p < 0,05; Nod2 KO ICR Tiere 0 h vs. 7 d; Wilcoxon-Test

Neben der Vermessung der Zotten wurde zudem die Kryptentiefe vermessen. Es wurden die gleichen Schnitte untersucht, an denen auch die Zotten gemessen wurden und je etwa zehn Krypten analysiert. Für Sham-Mäuse, die nur eine Transsektion des Darmes erhielten, lag zum Zeitpunkt 0 h kein Untersuchungsmaterial vor.

Zum Zeitpunkt der Operation (0 h) wurde bei den WT Mäusen eine durchschnittliche Kryptentiefe von $75 \pm 2 \mu\text{m}$ gemessen, was in etwa den Nod2 KO Tieren entsprach ($83 \pm 2 \mu\text{m}$).

Nach 7 Tagen wurde bei den WT ICR Mäusen im Vergleich zu 0 h eine signifikante Steigerung der Kryptentiefe auf 153 % erreicht ($115 \pm 8 \mu\text{m}$, p = 0,028). Nach 14 Tagen wurde bei den WT ICR Mäusen eine weitere leichte, aber nicht signifikante Steigerung der Kryptentiefe auf 176 % gemessen ($132 \pm 8 \mu\text{m}$).

Auch die Kryptentiefe der Nod2 KO ICR Tiere war nach 7 Tagen signifikant gesteigert (129 %, $107 \pm 4 \mu\text{m}$, p = 0,028), jedoch nach 14 Tagen wieder leicht auf 120 % abgefallen ($100 \pm 6 \mu\text{m}$).

Das Wachstum der Krypten fand in beiden resezierten Gruppen also hauptsächlich in der ersten Woche nach ICR statt. Zwischen WT ICR und Nod2 KO ICR Mäusen gab es weder an Tag 7 noch an Tag 14 signifikante Unterschiede in der Kryptentiefe.

In beiden resezierten Mausgruppen waren die Krypten tiefer als in ihrer jeweiligen Sham-Kontrollen.

3.3 Immunhistochemische Färbungen

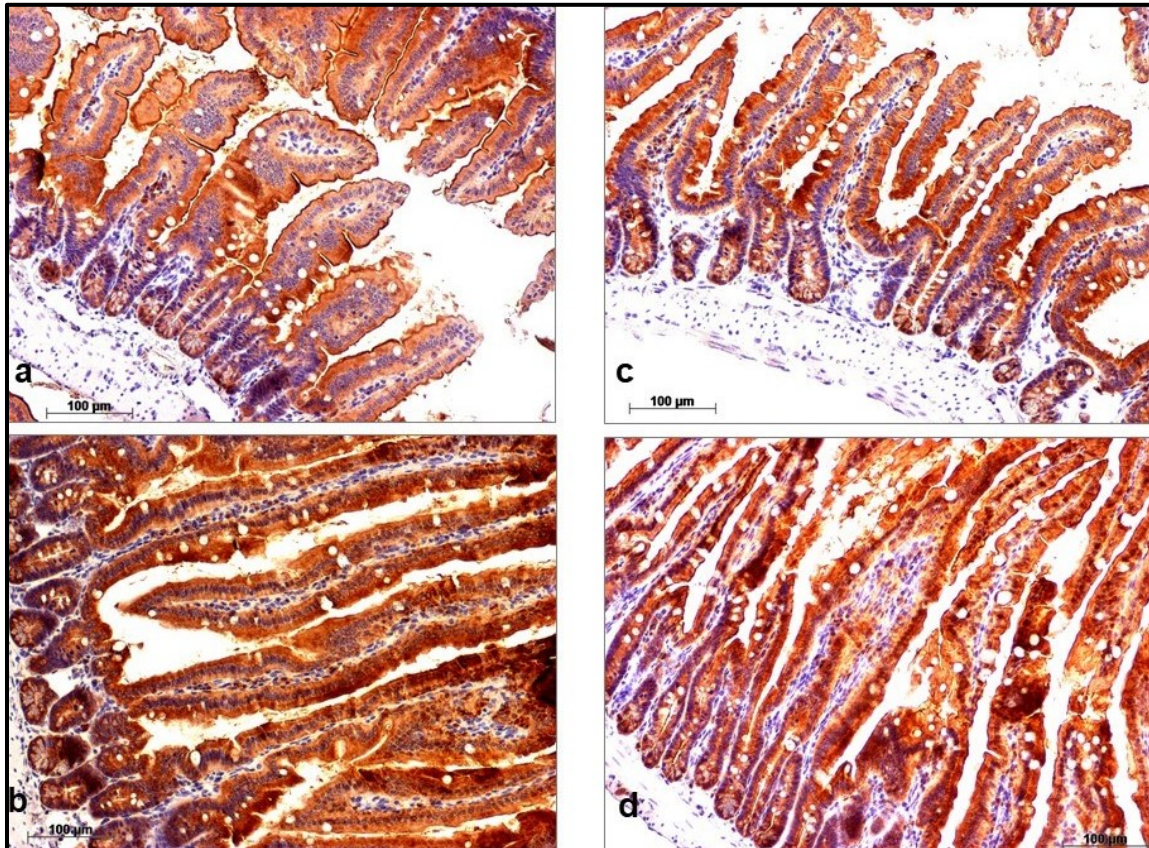


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Villin am Beispiel einer Wildtyp (WT) und einer Nod2 knockout (Nod2 KO) Maus zum Zeitpunkt der Ileozökalresektion (ICR) und nach 14 d.

a) WT ICR 0 h, b) WT ICR 14 d, c) Nod2 KO ICR 0 h, d) Nod2 KO ICR 14 d

In Abbildung 11a ist am Beispiel einer WT Maus das histologische Bild des Ileums zum Zeitpunkt der Operation ersichtlich. Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass Villin Epithelzell-spezifisch sowohl entlang der gesamten Zotte als auch in der Krypte exprimiert ist. Diese Verteilung ist in Nod2 KO Mäusen identisch (Abbildung 11c).

Nach 14 Tagen (Abbildung 11b und d) haben die Zotten ein längeres, schmaleres, fingerförmiges Aussehen. Das Zottenstroma nimmt ab. Villin ist auch zu diesem Zeitpunkt nur in den Epithelzellen und entlang der gesamten Zottenachse exprimiert. Auf diesen Untersuchungen basiert, dass Villin als Epithel-spezifisches Haushaltsgen zum Abgleich gegen die untersuchten Transporter verwendet wurde.

Abbildung 12 (siehe unten) zeigt, dass β -Aktin ubiquitär sowohl im Stroma als auch an der Oberfläche der Zotten und Krypten exprimiert wird. Da es in der Normierung jedoch keine Unterschiede zu Villin gab, wurde hier auf die Darstellung der Expressionsdaten verzichtet.

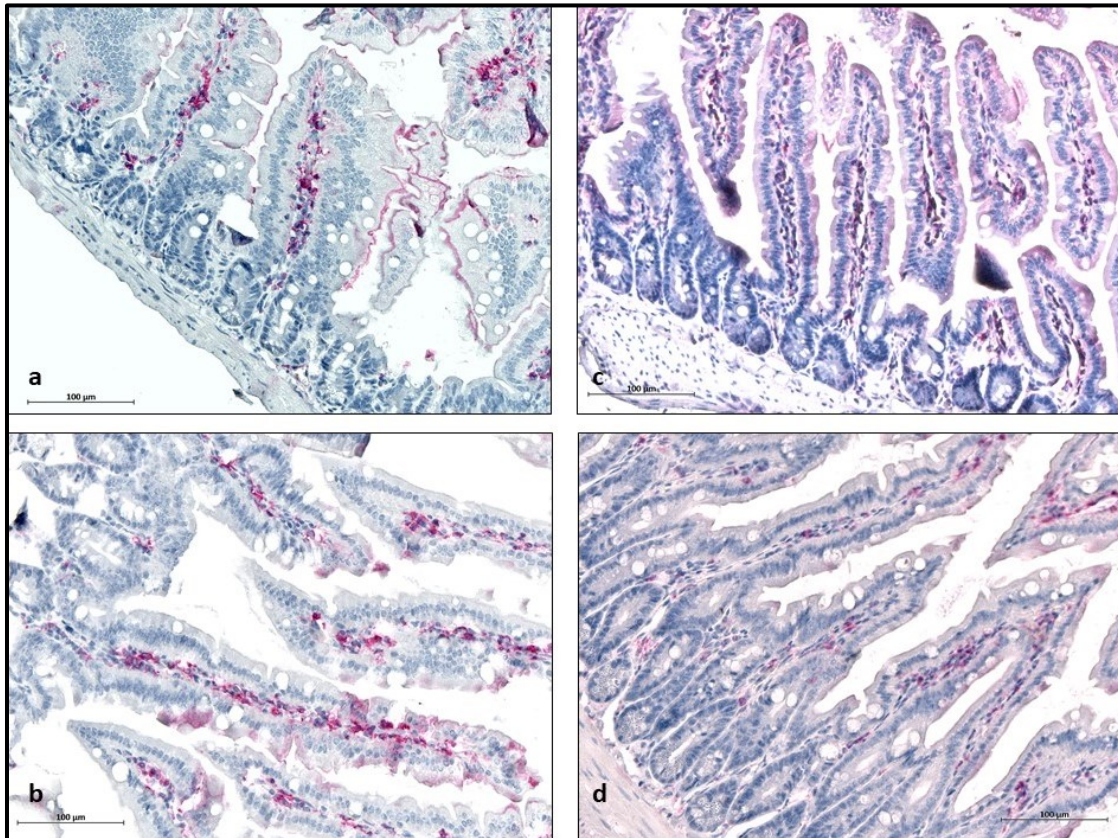


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von β -Aktin am Beispiel einer Wildtyp (WT) und einer Nod2 knockout (Nod2 KO) Maus zum Zeitpunkt der Ileozökalresektion (ICR) und nach 14 d.

a) WT ICR 0 h, b) WT ICR 14 d, c) Nod2 KO ICR 0 h, d) Nod2 KO ICR 14 d

3.4 PCR Ergebnisse

3.4.1 Genexpression von *Downregulated in adenoma* (DRA)

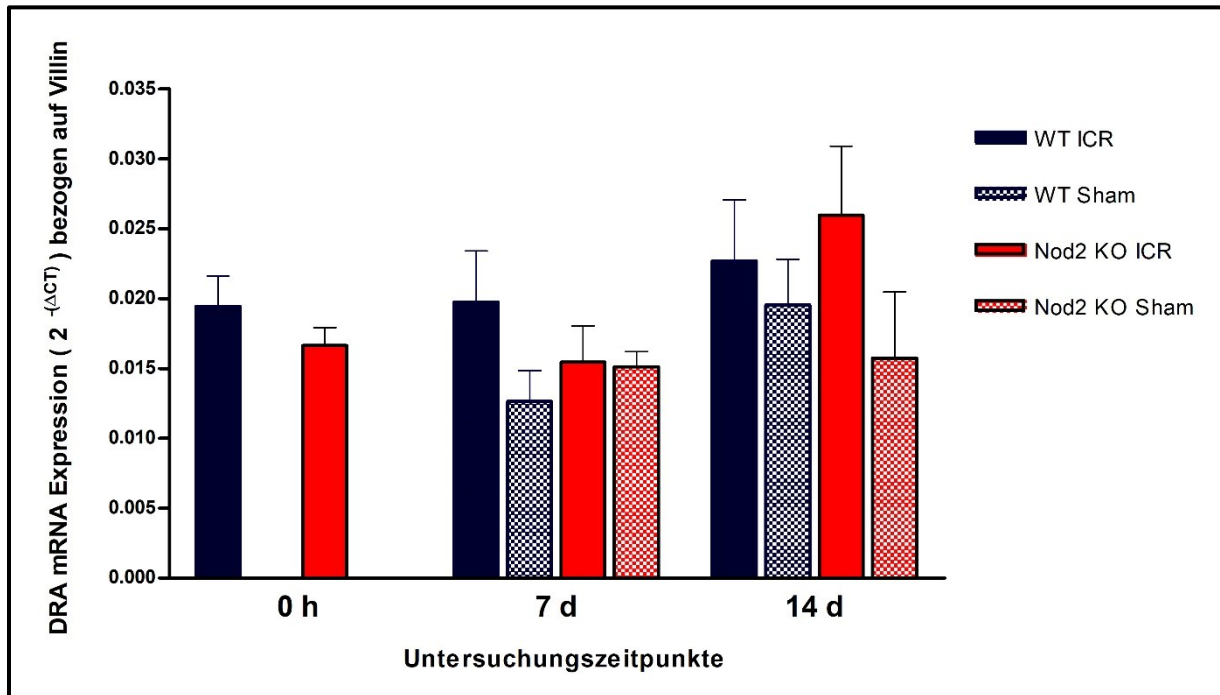


Abbildung 13: DRA-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d in Wildtyp (WT), Nod2 knockout (Nod2 KO) und Sham-Kontrolltieren (Sham); MW ± SEM; Tiere Ileozökalresektion (ICR): n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben.

Mit Hilfe der real-time qPCR wurde die Expression von Transportern des Darms untersucht. In Abbildung 13 ist die mRNA-Expression des Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers DRA bezogen auf Villin dargestellt.

In den untersuchten Darmabschnitten war die DRA-Expression zwischen WT ICR und Nod2 KO ICR zum Zeitpunkt der Operation (0 h) nicht signifikant unterschiedlich. Für Sham-operierte Tiere lag zum Zeitpunkt 0 h kein Untersuchungsmaterial vor, da nur eine Transsektion des Darmes erfolgte.

An den Tagen 7 und 14 nach ICR war die DRA-Expression in den WT Mäusen bezogen auf den Ausgangswert (0 h) nicht signifikant verändert. In WT Sham Tieren blieb die Expression auf gleichem Niveau.

Bei den Nod2 KO ICR Mäusen wurde bezogen auf den Ausgangswert nach 7 und 14 Tagen keine signifikante Steigerung der DRA-Expression gemessen. Die Expression blieb in Nod2 KO Sham Tieren unverändert.

3.4.2 Genexpression von *Na⁺/H⁺-exchanger 3* (NHE3)

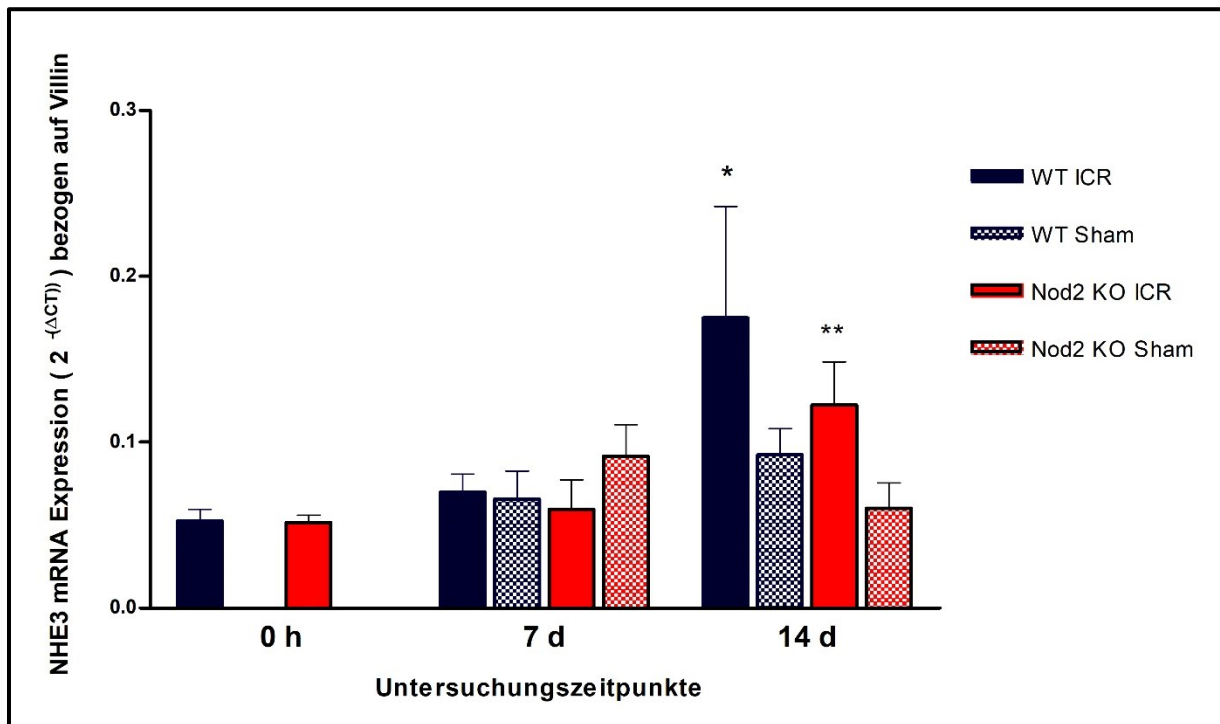


Abbildung 14: NHE3-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d in Wildtyp (WT), Nod2 knockout (Nod2 KO) und Sham-Kontrolltieren (Sham); MW \pm SEM; Tiere Ileozökalresektion (ICR): n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben.

* p < 0,05; WT ICR 0 h vs. 14 d; Wilcoxon-Test ** p < 0,05; Nod2 KO ICR 0 h vs. 14 d; Wilcoxon-Test

In Abbildung 14 ist die NHE3-mRNA-Expression dargestellt.

Zum Zeitpunkt der Operation (0 h) war die Expression zwischen WT und Nod2 KO Mäusen gleich. Für Sham-Mäuse, die nur eine Transsektion des Darmes erhielten, lag zum Zeitpunkt 0 h kein Untersuchungsmaterial vor.

Die NHE3-Expression war 7 Tage nach ICR im Vergleich zu 0 h weder in WT noch in Nod2 KO Mäusen signifikant verändert.

Eine signifikante Steigerung trat hingegen in beiden resezierten Gruppen nach 14 Tagen auf, wobei in WT ICR Tieren eine Steigerung auf 399 ± 125 % (p = 0,021) und bei Nod2 KO Mäusen auf 258 ± 52 % (p = 0,011) vorlag. Dabei lag zwischen WT und Nod2 KO Mäusen zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied vor.

Die NHE3-Expression der WT Sham und der Nod2 KO Sham Mäuse blieb auf dem Ausgangsniveau.

3.4.3 Genexpression von *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)

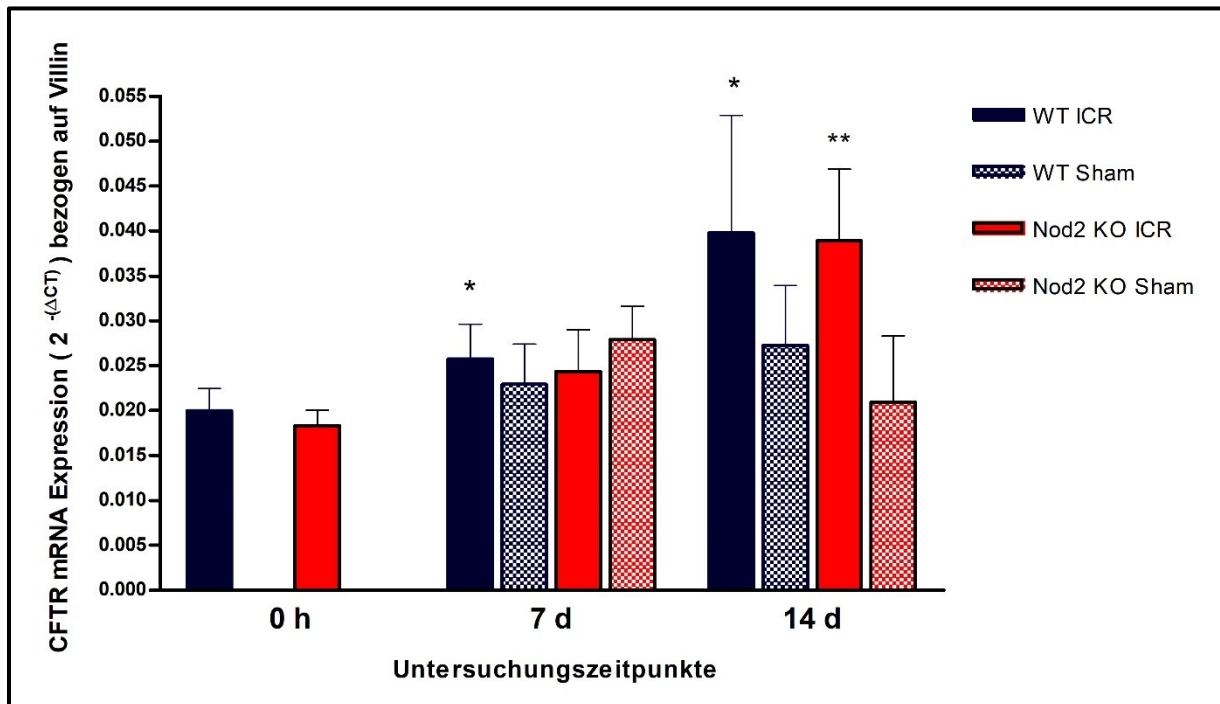


Abbildung 15: CFTR-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d in Wildtyp (WT), Nod2 knockout (Nod2 KO) und Sham-Kontrolltieren (Sham); MW \pm SEM; Tiere ileozökalresektion: n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben.

* p < 0,05; WT ICR 0 h vs. 7 d und 0 h vs. 14 d; Wilcoxon-Test ** p < 0,05; Nod2 KO ICR 0 h vs. 14 d, Wilcoxon-Test

Abbildung 15 stellt die CFTR-mRNA- Expression dar.

Zum Zeitpunkt der Operation (0 h) unterschied sich die CFTR-Expression zwischen den WT und Nod2 KO Mäusen nicht. Für Sham-operierte Tiere lag zum Zeitpunkt 0 h kein Untersuchungsmaterial vor, da nur eine Transsektion des Darmes erfolgte.

Die basale CFTR-Expression unterschied sich nicht zwischen WT und Nod2 KO Mäusen.

7 und 14 Tage nach Resektion war die CFTR-Expression in WT Mäusen signifikant auf 148 ± 16 % (p = 0,036, d 7) und 193 ± 46 % (p = 0,028, d 14) erhöht.

In den Nod2 KO ICR Tieren konnte 14 Tage nach Resektion eine signifikante Steigerung der CFTR-Expression auf 235 ± 54 % (p = 0,008) nachgewiesen werden.

Die CFTR-Expression war nach der Sham Operation in beiden Mausgruppen nicht signifikant verändert.

3.4.4 Genexpression von Lysozym

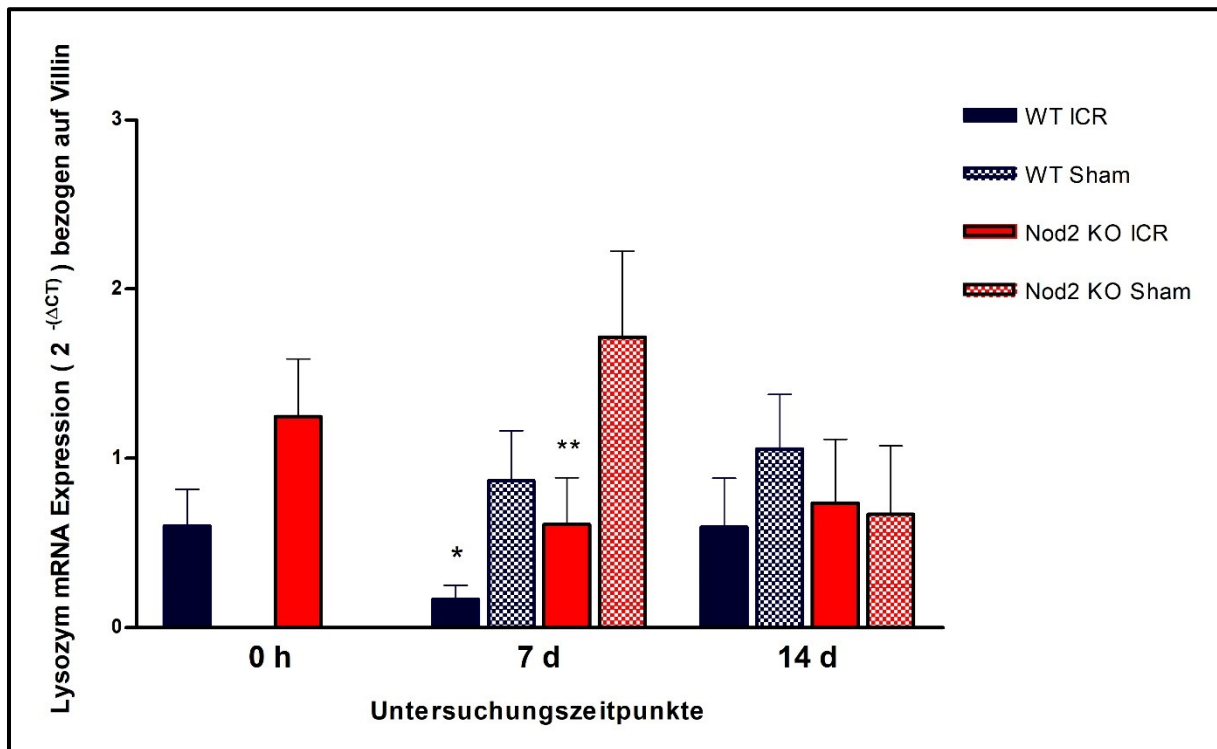


Abbildung 16: Lysozym-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d in Wildtyp (WT), Nod2 knockout (Nod2 KO) und Sham-Kontrolltieren (Sham); MW \pm SEM; Tiere Ileozökalresektion: n = 8-9 je untersuchtem Zeitpunkt; Sham-Kontrolltiere: n = 6-9 je untersuchtem Zeitpunkt; gezeigt sind Tiere, die bis zum geplanten Endpunkt überlebt haben.

* p < 0,05; WT ICR 0 h vs. 7 d; Wilcoxon-Test

** p < 0,05; Nod2 KO ICR 0 h vs. 7 d; Wilcoxon-Test

Die basale mRNA-Expression von Lysozym war zum Zeitpunkt der OP (0 h) nicht signifikant unterschiedlich, es besteht aber der Trend, dass die Nod2 KO Tiere eine höhere Lysozym-Expression haben (p = 0,067). Für Sham-Mäuse, die nur eine Transsektion des Darmes erhielten, lag zum Zeitpunkt 0 h kein Untersuchungsmaterial vor.

In WT Mäusen wurde 7 Tage nach Resektion eine signifikante Verringerung der Lysozym-Expression auf 55 ± 13 % (p = 0,017) nachgewiesen. In Sham-operierten Kontrolltieren war die Expression unverändert.

Auch in Nod2 KO ICR Tieren sank die Lysozym-Expression 7 Tage nach Resektion signifikant auf 39 ± 8 % (p = 0,012). In Nod2 KO Sham Mäusen blieb die Expression unverändert.

Infolge der Resektion kam es in beiden Versuchsgruppen zu einem transienten Abfall der Lysozym-Expression. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt lag die Lysozym-Expression in Nod2 KO ICR Tieren über den WT ICR Tieren, war jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

4. Diskussion

Darmversagen ist eine Komplikation des schweren KDS nach umfangreicher ICR [20]. Beim KDS kommt es aufgrund der verringerten Darmoberfläche nach multiplen Resektionen zu einer ungenügenden Resorption von Flüssigkeit, Makro- und Mikronährstoffen, Proteinen und Energieträgern [20]. Eine der häufigsten nicht-malignen Indikation zur Darmresektion ist der komplikativ verlaufende M. Crohn. *NOD2* Polymorphismen treten gehäuft in M. Crohn Patienten auf [36, 40, 53, 54]. Zudem gelten *NOD2* Mutationen als Risikofaktor für das kombinierte Darm- und Leberversagen im Kindesalter [55] und sind auch mit einer erhöhten Abstoßungsrate nach Darm- oder multiviszeraler Transplantation assoziiert [56]. Darüber hinaus sind *NOD2* Mutationen, unabhängig von M. Crohn, mit der Entwicklung eines schweren KDS und Darmversagens assoziiert [34, 57]. Es ist noch nicht hinreichend bekannt, ob *NOD2* Defekte zu vermehrten initialen postoperativen Komplikationen auf dem Weg zum KDS führen oder ob es einen negativen Einfluss auf die Adaptation als Reaktion auf ein KDS gibt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer *Nod2*-Defizienz auf das klinische Outcome und die intestinale Adaptation im Mausmodell des Kurzdarmsyndroms untersucht.

Als intestinale Adaptation wird der physiologische Prozess bezeichnet, die Funktion und Struktur des entnommenen Darms zu kompensieren, damit die Verdauungs- und Absorptionsfunktion gewährleistet werden kann [27]. Diese Adaptation kann u. a. auf histomorphologischer und auf funktioneller Ebene, im Sinne veränderter Ionentransportprozesse stattfinden. Um die Pathophysiologie des schweren KDS und des Darmversagens besser zu verstehen, sind tierexperimentelle Modelle notwendig. Dabei wurde in dieser Arbeit im Mausmodell untersucht, inwieweit sich das klinische Outcome nach einer ICR verändert. Dabei wurde, neben klinischen Aspekten, die RNA Expression von *DRA*, *NHE3* und *CFTR* sowie Lysozym und die Änderung der Zottenhöhe und Kryptentiefe untersucht.

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell wurde ursprünglich von Dekaney et al. [27] 2007 beschrieben und von unserer Arbeitsgruppe modifiziert [43]. Dekaney et al. [27] verwendeten männliche Mäuse des selben Stammes (C57BL/6J) von der selben Firma *Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA* wie in der vorliegenden Arbeit. Die Mäuse ähnelten sich ebenfalls hinsichtlich ihres Ausgangsgewichts, waren zum Zeitpunkt der Operation jedoch etwas jünger (2-3 Monate) als in unseren vorliegenden Versuchen (3-6 Monate). Dies könnte insofern einen Einfluss haben, da die Tiere im Alter von 2-3 Monaten prä-adult sind und möglicherweise eine bessere Adaptationsfähigkeit haben. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hierzu konnten jedoch keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Komplikationen und dem Alter der Mäuse feststellen [43].

Um die Mortalität des Modells im Hinblick auf frühe Komplikationen wie Anastomosenstenosen und Obstruktionen zu verbessern, verwendeten wir für die Anastomose 10-0 Faden und hielten während des gesamten Versuchszeitlaufs die Gabe von Flüssignahrung aufrecht.

Bei Dekaney et al. [27] wurde eine Flüssigdiät im Gegensatz dazu lediglich bis sieben Tage nach Operation beibehalten. Trotz der Optimierung starben 6 % der Mäuse in dieser Versuchsreihe an intestinalen Obstruktionen. Devine et al. [58] gaben die Flüssignahrung bereits 4 Tage vor geplanter OP und bis 7 Tage nach der Operation, da sie sonst eine höhere Rate an Obstruktionen und eine erhöhte Mortalität feststellten. In unserem eigenen Experiment brachte dieses Vorgehen keinen weiteren Überlebensvorteil, als erst zwei Tage vor der OP mit Flüssignahrung zu beginnen (Daten nicht gezeigt).

Weitere Unterschiede im perioperativen Management der ICR gab es bei der Narkose. Anders als bei Dekaney et al. [27] und auch bei Shin et al. [59], die eine Inhalationsnarkose aus 2 % Isofluran in Kombination mit Sauerstoff verwendeten, wurde in dem von uns angewandten Modell eine intraperitoneale Narkose mit Ketamin und Xylazin in Kombination mit einer mechanischen Beatmung durchgeführt. Dadurch wurde eine hohe Stabilität mit kontinuierlicher gleichmäßiger Oxygenierung erlangt. Auf diese Weise wurden zudem respiratorische Azidosen vermieden (weniger Atemdepression als Isofluran) [60], die einen Einfluss auf die untersuchten Ionentransporter haben könnten. Außerdem führt die Inhalationsnarkose mit Fluranen vermehrt zur Relaxation der glatten Muskulatur [61]. Die intraperitoneale Narkose sorgt aber für längere Nachschlafphasen bei den operierten Tieren, weswegen die Mäuse postoperativ zur Vermeidung einer Hypothermie in einen beheizten Käfig gelegt wurden.

Des Weiteren wurden in anderen Arbeitsgruppen perioperativ Antibiotika eingesetzt, um Sepsen und andere postoperative Komplikationen zu verringern. Unsere Arbeitsgruppe gab keine Antibiose im perioperativen Verlauf, um ein Einwirken auf das intestinale Mikrobiom zu vermeiden, das mit der Adaptation an das KDS interferieren könnte [58, 62]. Da in der Versuchsreihe zu dieser Arbeit nur ein Fall von Sepsis auftrat, scheint es vertretbar, eine Antibiotikaphylaxe zu unterlassen.

Es gibt einige experimentelle Modelle des KDS, die in Nagetieren durchgeführt wurden. Bei einem großen Teil handelt es sich jedoch um Rattenmodelle. Liu et al. [63] resezierte bei Ratten rund 60 % des Ileum und Jejunums, sowie das Zökum. Auch der Versuchsaufbau von Kripke et al. [64], beinhaltete eine 60 % distale Resektion des Darms mit Entnahme des Zökums bei Ratten. Ferner fanden in einigen Arbeitsgruppen proximale Resektionen des Rattendarms statt, in denen Teile des Jejunums und Ileums entfernt wurden [65, 66].

Es gibt nur wenige experimentelle Mausmodelle für das KDS. Mausmodelle bieten den Vorteil, dass die Tiere leichter genetisch veränderbar sind, um daran verschiedene Einflüsse genetischer Polymorphismen oder Mutationen zu analysieren. Bei einem Teil der Modelle wurde eine proximale Resektion des Dünndarms durchgeführt [67, 68]. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine ICR durchgeführt, was der häufigsten anatomischen Variante des KDS entspricht (Typ II Anatomie) [21] und daher besonders hohe klinische Relevanz hat.

In Nagern erfüllt das Zökum zusätzlich wichtige Funktionen. Snipes [69] beschrieb 1981 die Anatomie des Zökums in Mäusen und Ratten: Im Vergleich zu Pflanzenfressern haben sie ein kleineres und weniger differenziertes Zökum, im Vergleich zu Fleischfressern ist es jedoch größer und weiter entwickelt. Damit erfüllen sie die Merkmale des Zökums eines Omnivoren. Das Zökum ist bei einseitigem Nahrungsangebot fähig, Zellulose zu verdauen. Es besitzt zudem gute Absorptionsfähigkeiten für Ca^{2+} , Mg^{2+} , Vitamin K, Flüssigkeit und Elektrolyte. Als Reservoir zwischen Dünn- und Dickdarm ermöglicht es so, weitere 10-20 % der im Dünndarm nicht aufgenommenen Nahrungsbestandteile zu absorbieren und dem Dickdarm zur Verfügung zu stellen. Diese Absorptionsfähigkeit liegt hauptsächlich an der mikrobiellen Besiedlung des Darms, die auch eine Fermentation ermöglicht. Überdies fungiert die Muskulatur des ileozökalen und zökokolischen Übergangs als eine Art Sphinkter und verlangsamt somit den Transport der Nahrung durch den Darm [69].

Das Zökum scheint somit auch eine wichtige Funktion für das Mikrobiom des Dickdarms zu haben. Devine et al. [58] zeigten, dass bei Entfernung des Zökums die Diversität der Darmbakterien abnimmt mit besonders starkem Abfall im Kolon. Unsere Arbeitsgruppe beschrieb, dass die alpha-Diversität in Stuhlproben von Mäusen nach ICR unabhängig vom WT bzw. *Nod2* Status reduziert ist [70]. Der spezifische Einfluss des Mikrobioms auf die Adaptationsprozesse unter Kurzdarmsbedingungen wird derzeit in Folgeprojekten der Arbeitsgruppe untersucht.

Barros et al. [71] beobachteten in ihren Versuchen an einem Ratten-KDS-Modell, dass nach operativer Darmresektion, die Tiere mit Erhalt der Ileozökalklappe höhere postoperative Werte bezüglich u.a. Gewicht und histomorphologischer Anpassung aufwiesen. Dies kann zum einen am Erhalt des Zökums liegen, zum anderen aber auch an der Länge des belassenen Darms. Denn die Länge des resezierten Darms hat ebenfalls einen großen Einfluss auf das Überleben der Tiere. In unserer Arbeitsgruppe wurden in Anlehnung an das Modell von Dekaney et al. etwa 40 % des Dünndarms inklusive Zökum entfernt. Die Mortalität lag in dieser Arbeit bei 26 % ohne perioperative Komplikationen (d 0-3; Anastomoseninsuffizienz, Ileus). Auch andere Arbeitsgruppen stellten ein schlechtes Überleben der Tiere bei zunehmender Länge des resezierten Darms fest. Wakeman et al. [67] publizierten, dass bei der von ihnen vorgenommenen proximalen Dünndarmresektion das Überleben der Mäuse deutlich schlechter war, wenn 75 % (73 % Überleben) statt 50 % (90 % Überleben) des Dünndarms reseziert wurden. Auch

Helmrath et al. [68] berichteten, dass eine proximale Resektion von bis zu 50 % der Gesamtlänge des Dünndarms von den Mäusen überlebt wurde und Resektionen von größeren Anteilen mit höherer Mortalität einhergingen. Die genannten Arbeitsgruppen beobachteten mit zunehmender Resektionslänge eine höhere Rate an schwerwiegenden Komplikationen, berichteten dabei aber keine genaueren Autopsiebefunde. Die Untersuchungen von Matsumoto et al. [72] zeigen weiterführend sogar, dass nach einer 75 % ICR keine Maus den postoperativen Zeitraum von 35 Tagen überlebte und zeigen damit, dass auch das Langzeitüberleben problematisch ist.

Der ursprünglich im Zusammenhang mit der Feststellung/Vorhersage von Anastomoseninsuffizienzen von Komen et al. [44] publizierte Wellness-Score ist für die klinische Beurteilung des KDS in dem hier angewandten Mausmodell gut geeignet [43].

Signifikante Unterschiede im Wohlbefinden der untersuchten Mausgruppen bestanden zwischen WT ICR und Nod2 KO ICR Mäusen in der frühen Adaptationsphase an den Tagen 2-4, an denen die WT ICR Tiere ein besseres Wohlbefinden zeigten. Im Einzelnen hatten Nod2 KO Tiere ein insgesamt struppigeres Fell, die Tiere waren weniger aktiv und auch die Haltung war eingeschränkt (weniger gleichmäßige Belastung auf allen vier Füßen; gebuckelte Haltung). Dazu passt unsere Beobachtung, dass alle vorzeitig getöteten/verstorbenen Nod2 KO Mäuse im perioperativen Zeitraum (d 0-3) verstarben und damit eine Neigung zu den frühen Komplikationen hatten (Anastomoseninsuffizienz und Ileus).

Gemessen am Score hatten Nod2 KO ICR Mäuse über den gesamten Beobachtungszeitraum ein geringeres Wohlbefinden als WT ICR oder Sham-Versuchstiere. Das lässt einen Einfluss vom *Nod2* Gen auf den klinischen Verlauf nach einer ICR vermuten.

Andere Arbeitsgruppen bestätigten ein schlechteres Outcome bei *NOD2*-Defizienz in einem anderen Zusammenhang: Brenmoehl et al. [73] haben über ein schlechteres Outcome von menschlichen Patienten mit *NOD2* Mutationen bei abdomineller Sepsis berichtet. Dies könnte den initial komplizierteren Verlauf bestätigen und eine Neigung zur Sepsis vermuten lassen. In Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte jedoch im Vergleich zu WT-Kontrolltieren weder eine erhöhte Sterblichkeit und bakterielle Translokation noch eine veränderte Zytokinsekretion in Nod2 KO Mäusen nach abdomineller Sepsisinduktion durch „*Cecal-Ligation and Puncture*“ nachgewiesen werden. WT und Nod2 KO Tiere hatten also keine unterschiedliche Neigung zur Sepsis. Auch andere Arbeitsgruppen konnten in der experimentellen, abdominalen Sepsis kein schlechteres Überleben bei *Nod2*-Defizienz finden, so dass wir davon ausgehen, dass die *Nod2*-Defizienz im Modell der ICR nicht zu vermehrten frühen Komplikationen führt [74], [75].

Um das klinische Outcome der Versuchstiere weiter einzuschätzen, wurde zusätzlich zum Wellness-Score der Gewichtsverlauf der Tiere erhoben. Sowohl die ICR als auch die Sham-Operation induzierten in beiden Versuchsgruppen zunächst einen Gewichtsverlust.

Der Gewichtsverlust der Sham-Mäuse war postoperativ aber weniger stark als in resezierten Tieren. Zudem nahm ihr Gewicht in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraums wieder zu, während es in resezierten Tieren niedriger blieb. Die fehlende Signifikanz in der WT Sham Gruppe könnte durch den Selektionsbias bedingt sein. Der postoperative Gewichtsverlust in Sham Tieren wurde auch bei Dekaney et al. [27] beschrieben: Die Sham Mäuse verloren dort bis 4-5 Tage nach der Operation Gewicht, das aber nach 6 Wochen wieder auf das Ausgangsgewicht gestiegen war.

Dies zeigt, dass zunächst alle Tiere nach der Operation einen Gewichtsverlust erlitten, dieser jedoch überwiegend auf den perioperativen Stress, z. B. Flüssigkeitsverlust zurückzuführen ist.

Das Ausgangsgewicht könnte das perioperative Outcome beeinflussen. Es ist anzunehmen, dass Mäuse mit erhöhtem viszeralen Fettanteil technisch schwieriger zu operieren waren und daher ein schlechteres Outcome hatten. Es wurde in Versuchen der Arbeitsgruppe jedoch keine signifikante Korrelation zwischen Ausgangsgewicht und dem Überleben der Tiere gefunden [43].

Der Gewichtsverlust nach ICR lag in dem angewandten Modell bei durchschnittlich 20% des Ausgangsgewichts.

Die resezierten Tiere der Arbeitsgruppe um Dekaney et al. [27] erreichten auch nach einem Beobachtungszeitraum von 16 Wochen nicht wieder ihr Ausgangsgewicht. Der in dieser Arbeit gewählte Beobachtungszeitraum lag bei zwei Wochen und auch hier erreichten die Tiere ihr Ausgangsgewicht nicht. Die klinischen Beobachtungen deckten sich dahingehend, dass das Ausgangsgewicht in den Sham Kontrollen nur transient abfällt, während es nach ICR dauerhaft verringert bleibt – passend zu einer Darminsuffizienz. Wir führten jedoch keine Langzeitstudie durch.

Während das Körpergewicht der Tiere nach Resektion, unabhängig vom Genotyp, in den ersten Wochen nach Resektion zunächst fiel, tritt in der Adaptationsphase während der zweiten Woche eine Verbesserung des Körpergewichts ein. In Nod2 KO Mäusen waren das Wohlbefinden signifikant und das Gewicht tendenziell in der zweiten Woche nach Resektion schlechter als in den WT Kontrollen, was auf eine schlechtere Adaptationsfähigkeit Nod2-defizienter Tiere hindeuten könnte.

Um das klinische Outcome der Tiere in diesem experimentellen Modell weiter zu analysieren, wurde neben dem Wellness-Score und dem Wohlbefinden auch die Stuhlkonsistenz bestimmt.

Dies ist relevant, da es unter Kurzdarmbedingungen durch die mangelnde Resorption von Flüssigkeit zu Durchfall kommt [43].

Direkt nach ICR litten die WT und Nod2 KO Mäuse unter Durchfall, der sich über den Zeitraum der 14 Tage über breiigen zu festem Stuhl normalisierte. Die Sham-Kontrollmäuse beider Gruppen hatten demgegenüber direkt nach der Operation wieder festen Stuhl. Direkt nach ICR war der Darm nicht fähig, aus dem Stuhl eine adäquate Menge an Wasser zurück zu resorbieren und die Mäuse litten unter Durchfall. Dies entsprach der Phase der Hypersekretion des KDS [20]. Nach 14 Tagen, in der Adaptationsphase, wurde der resezierte Teil soweit kompensiert, dass dem Stuhl genug Wasser zum Erreichen einer normalen festen Konsistenz entzogen wurde [20]. Auch bei Dekaney et al. [27] wurde eine Abnahme der Stuhlkonsistenz beschrieben, die sich nach etwa 2 Wochen wieder zu normaler fester Stuhlkonsistenz hin entwickelte. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen, da beide resezierten Mausgruppen nach 14 Tagen wieder festen Stuhl hatten. Zwischen den WT und Nod2 KO Tieren gab es jedoch keine Unterschiede. Die Stuhlkonsistenz wurde in dieser Versuchsreihe makroskopisch beurteilt und ein Punktwert vergeben. Genauere Messungen sind über das Stuhlwasser möglich. Weitergehende Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits in resezierten Tieren einen erhöhten Anteil des Stuhlwassers [43]. Nod2 KO Mäuse hatten an Tag 2 nach Resektion signifikant höheres Stuhlwasser als WT Mäuse [70].

Das Ausmaß der histomorphologischen Adaptation nach Resektion großer Darmabschnitte ist bedeutsam für das Überleben des Individuums.

Im Zuge der Adaptation kommt es zu histomorphologischen Veränderungen, wie ein Anstieg der Villuslänge und der Kryptentiefe sowie des Lumendurchmessers [27].

In den Mäusen dieses experimentellen Modells war die Zottenlänge in beiden Versuchsgruppen nach ICR bereits nach 7 Tagen signifikant gesteigert und nahm nach 14 Tagen nicht weiter zu. Dies zeigt, dass der Peak der histomorphologischen Adaptation bereits in den ersten Tagen nach ICR eintritt. Histomorphologische Veränderung an Villi und Kripten wurden ebenfalls in anderen Resektionsmodellen bestätigt [27, 76]. In der Arbeit von Dekaney et al. war das Längenwachstum der Zotten bis 4-5 Tage nach der ICR ausgeprägt, blieb bis zu 6 Wochen nach der Operation erhöht und fiel dann aber im Laufe der Zeit bis 16 Wochen wieder ab [27]. In Sham-Mäusen, an denen nur eine Transsektion des Darms durchgeführt wurde, nahm die Villuslänge nicht zu. Das Villuswachstum war also ein Kurzdarm-spezifischer Effekt.

Des Weiteren fand in unseren Versuchsgruppen eine Veränderung der Kryptentiefe statt. Nach 7 Tagen nahm in beiden resezierten Gruppen die Kryptentiefe signifikant zu, während sie in den Sham-Kontrollgruppen gleich blieb. Der Effekt war nach 14 Tagen nicht stärker ausgeprägt. Dekaney et al. [27] beschrieben ähnliche Ergebnisse, wobei die Veränderungen hier

nach 2-3 Tagen transient waren. Unter histomorphologischen Aspekten gab es in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Nod2 KO Mäusen. Die Zottenlänge war in beiden ICR-Gruppen signifikant nach 7 und 14 Tagen gesteigert. Die Krypten waren nur nach 7 Tagen signifikant tiefer.

Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [43] haben gezeigt, dass das Erreichen eines hohen Körpergewichtes zum Experimentende nicht mit der Länge der Villi korreliert. Dies legt nahe, dass neben der histomorphologischen Adaptation andere epitheliale Mechanismen wie die Barrierefunktion und Transportmechanismen für den Prozess der Adaptation bedeutsam sind.

Es gibt bisher wenige Untersuchungen zur funktionellen Adaptation, insbesondere hinsichtlich des Ionentransportes unter Kurzdarmbedingungen. Während auf histomorphologischer Ebene bereits in verschiedenen Arbeitsgruppen die Adaptation untersucht wurde, sind die genauen funktionellen Mechanismen größtenteils noch ungeklärt und wurden in dieser Arbeit im Hinblick auf den Ionentransport näher untersucht. Dabei wurde die mRNA-Expression von DRA, NHE3 und CFTR berücksichtigt.

Zunächst wurde die DRA-Expression 7 und 14 Tage nach ICR im Vergleich zur Ausgangssituation (0 h) und zu Kontrollbedingungen (Sham) untersucht. Übereinstimmend mit Vorarbeiten (Dissertation Daniel Bastmeyer) war zum Zeitpunkt der Resektion (0 h) die DRA-Expression zwischen WT und Nod2 KO Tieren nicht signifikant unterschiedlich. Bei der Interpretation der Daten ist zu beachten, dass die Expression von DRA entlang der Darmlängsachse zunimmt und die höchste Expression im Kolon detektiert wird (Dissertation Daniel Bastmeyer).

Verglichen mit den basalen Bedingungen, konnte in der vorliegenden Arbeit für die DRA-Expression keine signifikante Veränderung unter Kurzdarmbedingungen detektiert werden. Eine wichtige Einschränkung dieser Arbeit besteht darin, dass nur die mRNA-Expression untersucht wurde, eine Aussage zur Proteinexpression ist nicht möglich. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass Veränderungen auf Proteinebene oder funktionelle Veränderungen bestehen. Andererseits wäre es auch möglich, dass in dem hier untersuchten Modell durch die Resektion global intestinal nur eine geringe DRA-Menge verloren geht und darum tatsächlich keine Gegenregulation in der DRA-Expression erfolgt. Da DRA v.a. im Kolon funktionell relevant ist, wäre es auch möglich, dass der DRA-Verlust mit dem Ileumsegment die globale Bikarbonat-Sekretion und/ oder die NaCl-Absorption des Darms nach ICR nicht relevant beeinträchtigt und darum im verbleibenden Jejunumsegment nicht funktionell kompensiert werden muss. Möglicherweise findet die entscheidende Gegenregulation auch im Kolon statt. Dies wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wäre aber für zukünftige Arbeiten von großem Interesse. Diese Vermutung wird gestützt von Ishiguro et al. [28]. Dort wurde gezeigt, dass eine enorme DRA-Expressionssteigerung bei einer eingeschränkten Bikarbonat-Sekretion erfolgt. Die

Arbeitsgruppe hat Mäuse untersucht, in denen das *proton-coupled amino acid transporter 1* (*Pat1*) Gen ausgeschaltet war. PAT1 (Slc26a6) gehört wie DRA zur SLC26 Familie und ist ein Cl⁻/HCO₃⁻ Austauschere, der besonders im Pankreas, aber auch im Dünndarm vorhanden ist. Im Pankreas läuft über PAT1 der Hauptteil der PGE₂-stimulierten Bikarbonat-Sekretion ab. Die Arbeitsgruppe beobachtete, dass in PAT1 KO Tieren, die Expression von DRA (Slc26a3) um das Fünffache erhöht war. Diese Untersuchung bezog sich zwar auf das Pankreas, zeigt aber, dass eine kompensatorische Steigerung der DRA-Expression erfolgt, wenn die Bikarbonat-Sekretion in anderer Weise gestört ist.

DRA ist zudem im unteren Gastrointestinaltrakt funktionell an NHE3 gekoppelt [6]. Beide Transporter sind für die elektroneutrale NaCl-Absorption verantwortlich. So wird beispielsweise im alkalischen Milieu eine Steigerung der DRA-Expression und eine vermehrte Koppelung mit NHE3 beobachtet [77]. In NHE3 KO Mäusen konnte eine Hochregulation von DRA beobachtet werden [9]. Darum wurde als weiterer Mediator des elektroneutralen NaCl-Transports NHE3 untersucht. Die NHE3-Expression im Jejunum war bei WT und Nod2 KO Mäusen zum Zeitpunkt der Operation (0 h) gleich. Bemerkenswerterweise konnte 14 Tage nach Resektion in beiden Gruppen im adaptierten Jejunum eine signifikante Steigerung der NHE3-Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen der Gruppe um Warner [29]. In einem proximalen Resektionsmodell konnte eine 2,5-fach erhöhte NHE3-mRNA-Expression in Mäusen nachgewiesen werden [29]. Zudem wurde eine Steigerung der NHE3-Expression auch durch Musch et al. [30] beobachtet: Nach einer 50 %igen Dünndarmresektion kommt es im Rattenmodell zu einer 2-3-fachen Steigerung der ilealen NHE3-mRNA-Expression. Die Änderungen auf RNA-Ebene scheinen auch funktionell relevant zu sein. Sacks et al. [31] konnten nach einer 70 %igen Resektion des Dünndarms eine erhöhte NHE3-Aktivität im Rattenmodell feststellen. Zusammengefasst ist also davon auszugehen, dass im Zuge der Adaptation nach Darmresektion NHE3 im Dünndarm vermehrt exprimiert wird. Ob NHE3 im Kolon in dem hier untersuchten Modell auch verändert exprimiert wird, kann mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden, scheint aber wahrscheinlich, da das hier untersuchte Modell aufgrund der großen Menge an mitreseziertem Kolonepithel (Mauszökum) in seiner Schwere einem 70 %igem reinen Dünndarmresektionsmodell ähneln dürfte. Die durch die Adaptation vermittelte Steigerung der NHE3-Expression im Dünndarm ist allerdings nicht vom *Nod2* Status abhängig.

Im Gegensatz zum elektroneutralen NaCl-Transport via DRA und NHE3 wird die elektrogene Cl⁻-Sekretion größtenteils von CFTR vermittelt [1]. Unter basalen Bedingungen bestand wie für die beiden anderen untersuchten Transporter kein Unterschied zwischen WT und Nod2 KO Mäusen. Sieben Tage nach der ICR war eine Steigerung der CFTR-Expression erkennbar,

dabei war allerdings nur für die WT-Gruppe ein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Nach 14 Tagen bestand in beiden resezierten Gruppen eine signifikante Erhöhung der CFTR-Expression. Die Hochregulation der Expression ist dabei nicht vom *Nod2* Status abhängig. Die fehlende Signifikanz an Tag 7 in der *Nod2* KO Gruppe könnte durch die Selektionsbias bedingt sein.

Die Interaktion von CFTR mit NHE3 ist experimentell intensiv untersucht. Die einzelnen Mechanismen sind jedoch kontrovers. So wurde z.B. beschrieben, dass eine geringere Aktivität von NHE3 eine vermehrte Aktivierung von CFTR und eine Steigerung der duodenalen HCO_3^- Sekretion zur Folge haben kann [78]. Andererseits ist im Jejunum der NHE3-Verlust mit vermindertem cGMP-stimulierten Flüssigkeitstransport assoziiert [79]. In der Zellkultur [80] führt die Koexpression von NHE3 mit CFTR zur Absenkung der PKA-abhängigen apikalen CFTR-Expression und -Aktivierung um etwa 50 %.

Interessanterweise kann über einen CFTR-abhängigen Prozess eine DRA-Aktivierung stattfinden [81]. Somit ist anzunehmen, dass die hier beobachtete Steigerung der CFTR-Expression eine vermehrte DRA-Aktivität begünstigt. Zur Beurteilung, ob die DRA-Aktivität während der Adaptation beeinflusst ist, wären funktionelle Studien notwendig und DRA-spezifische Inhibitoren waren lange Zeit nicht verfügbar. Interessanterweise ist erst während der laufenden Arbeiten an dieser Studie ein spezifischer DRA-Inhibitor charakterisiert worden [82]. In zukünftigen Untersuchungen könnte damit die Frage nach der funktionellen DRA-Aktivität untersucht werden.

Zusammengenommen deuten die epithel- und transportspezifischen Untersuchungen also darauf hin, dass während der Adaptation epithelintrinsische Veränderungen ablaufen. Gerade im Hinblick auf die Funktion von *NOD2* ist eine Interaktion des Epithels mit dem Immunsystem in diesem Zusammenhang allerdings wahrscheinlich.

Neben der histomorphologischen Adaptation und der veränderten Transporterexpression ist auch die mikrobielle Besiedlung des Darms für die Barrierefunktion von Bedeutung [58].

Sowohl im Menschen [83] als auch in der Maus [58] kommt es nach einer experimentellen ICR oder bei menschlichen Erkrankungen zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms. Panethzellen sind ein wichtiger Bestandteil des intestinalen Immunsystems und exprimieren den *NOD2* Rezeptor. Sie sezernieren unter anderem das antimikrobiell wirkende Enzym Lysozym (Hydrolase) [84]. Daher wurde in dieser Arbeit die mRNA-Expression von Lysozym untersucht.

Die Lysozym-Expression war sowohl in WT ICR Mäusen als auch in *Nod2* KO ICR Mäusen nach 7 Tagen im Vergleich zu 0 h signifikant erniedrigt und normalisierte sich nach 14 Tagen auf das Ausgangsniveau. Das lässt vermuten, dass durch die Resektion Panethzellen entfernt

wurden und sich nach 14 Tagen wieder neu bildeten. Dies passt zu Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Warner et al. [68], die nach einer 50 %igen Dünndarmresektion in Mäusen bereits nach 12 Stunden einen Anstieg der Panethzellen beobachteten, der bis zu 7 Tage postoperativ weiter anhielt.

Lysozym repräsentiert nur einen kleinen Teil des intestinalen Immunsystems. Andere wichtige antimikrobielle Peptide und ihre Funktion wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, bilden aber einen Schwerpunkt weiterführender Untersuchungen in dem angewandten Modell. Des Weiteren wurde in anderen Studien der Arbeitsgruppe ein Einfluss des *NOD2*-Funktionsverlustes auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms und auf die selektive Ionenpermeabilität unter Kurzdarmbedingungen gefunden [70].

Alles in allem scheint die *Nod2*-Defizienz einen schwereren Verlauf nach Darmresektion zu begünstigen. Dies zeigte sich in einem reduzierten Körpergewicht, mehr Verlust von Wasser über den Stuhl, sowie in einem geringeren Wohlbefinden der Mäuse nach ICR. Die histomorphologische Adaptation und die intestinale Expression von Ionentransportern waren in der Adaptation an ein KDS unabhängig vom *Nod2*-Status.

5. Ausblick

Die Adaptation des Darms an die Kurzdarmsituation findet auf histomorphologischer und funktioneller Ebene statt. Über die in dieser Arbeit erhobenen deskriptiven Untersuchungen hinaus sind funktionelle Studien notwendig, um die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen des schweren KDS bzw. Darmversagens zu verstehen. Um die Rolle des NOD2 Rezeptors auf den Verlauf des KDS weiterführend zu untersuchen, sind Studien zur Barrierefunktion des Darms und des intestinalen Immunsystems geplant. Darüber hinaus liegt ein Einfluss des *NOD2* Status auf die mikrobielle Flora des Darms die Genese und den Verlauf des KDS nahe und wird in weiterführenden Studien der Arbeitsgruppe untersucht.

6. Zusammenfassung

Das Kurzdarmsyndrom (KDS) kann durch Resektion großer Darmanteile entstehen und ist der Hauptgrund für ein Darmversagen, wenn aufgrund insuffizienter intestinaler Absorption von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen die physiologischen Körperfunktionen nicht mehr gewährleistet werden können. *NOD2* Mutationen sind ein Risikofaktor für Morbus Crohn und unabhängig davon auch für schwere Verläufe beim KDS und für die Entwicklung eines Darmversagens. Ob die *NOD2*-Defizienz den Verlauf der intestinalen Adaptation negativ beeinflusst, ist ungeklärt und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Nach 40%iger Ileozökalresektion (ICR) wurde in Mäusen ein oral kompensiertes Kurzdarmsyndrom induziert, das einer Typ 2 Anatomie des Menschen entspricht und sich klinisch mit Gewichtsverlust und Durchfällen manifestiert. Das Outcome und die Adaptation nach Resektion wurden in Wildtyp (WT) und *Nod2* knockout (*Nod2* KO) Mäusen miteinander verglichen. Der Verlauf des KDS wurde anhand klinischer Parameter (Gewichtsverlauf, Wellness-Score, Stuhlkonsistenz), der histomorphologischen Adaptation (Zottenlänge, Kryptentiefe) und der mRNA-Expression der Transporter *DRA*, *NHE3* und *CFTR* sowie des antibakteriellen Peptids Lysozym, beurteilt.

Eine 40%ige ICR führte zu einem Gewichtsverlust von durchschnittlich 20% und zu einer transienten Verschlechterung des Wohlbefindens (Wellnessscore) mit Diarrhö. Der klinische Verlauf war in *Nod2*-defizienten Mäusen tendenziell schlechter, wobei signifikante Unterschiede zwischen *Nod2* KO und WT Kontrollen im Wellness-Score im frühen postoperativen Stadium nachweisbar waren. Die ICR führte sowohl in WT als auch in *Nod2*-defizienten Tieren gleichermaßen zu einer histomorphologischen Adaptation, die sich in einer signifikanten Steigerung der Villushöhe (Tag 7 und 14) und der Kryptentiefe (Tag 7) manifestierte. Auf mRNA Ebene wurden unter Kurzdarmbedingungen signifikante Veränderungen von intestinalen Ionentransportern nachgewiesen, die maßgeblich zur Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes beitragen. Die *NHE3*- und *CFTR*-Expression, nicht aber die *DRA*-Expression, waren im anastomosennahen Jejunum unabhängig vom Genotyp nach ICR signifikant erhöht, was auf eine Steigerung der Transportleistung und damit auf eine funktionelle Adaptation des verbleibenden Darms hindeuten kann. Weiterführende Untersuchungen adressieren die Lokalisation und Funktion der Ionentransporter im adaptierten Epithel von *Nod2* KO und WT Mäusen.

Das antimikrobielle Peptid Lysozym wurde im unteren Dünndarm auf RNA Ebene unter basalen Bedingungen gleichermaßen in WT und *Nod2* KO Mäusen exprimiert und war nach Resektion in beiden Genotypen transient verringert. Ob die Expression und Funktion anderer antimikrobieller Peptide unter Kurzdarmbedingungen durch die *Nod2*-Defizienz beeinflusst ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. In weiteren Studien der Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die selektive Ionenpermeabilität des adaptierten Epithels *Nod2*-abhängig verändert ist. Gegenwärtige Untersuchungen, die den Einfluss des intestinalen Immunsystems und der Kurzdarm-spezifischen Veränderungen des Mikrobioms in *Nod2*-

defizienten Mäusen adressieren, sollen helfen, die Rolle des NOD2 Rezeptors in der Pathogenese des schweren Kurzdarmsyndroms/Darmversagens zu klären.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildungstitel	Seite
Abbildung 1: Schematische Darstellung des Darms zur Operation (0 h)	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Operation der Sham-Kontrolltiere	11
Abbildung 3: Gewebeentnahmen zum Zeitpunkt der Operation 0 h (oben) und nach 7 bzw. 14 d (unten).	14
Abbildung 4: Schematische Abbildung eines Villus mit möglicher Verteilung von Haushaltsgen zu Transporter an der Oberfläche	20
Abbildung 5: Verlauf des Wellness-Scores (MW \pm SD d 1 bis d 14) der untersuchten Mausgruppen	24
Abbildung 6: Verlauf des Gewichtes (MW \pm SD d 1 bis d 14) der untersuchten Mausgruppen	25
Abbildung 7: Verlauf der Stuhlkonsistenz (MW \pm SD d 1 bis d 14) der untersuchten Mausgruppen	26
Abbildung 8: H.E. Färbungen des Darms am Beispiel einer WT und einer Nod2 KO Maus	28
Abbildung 9: Länge der Zotten zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d	29
Abbildung 10: Kryptentiefe zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d	31
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Villin am Beispiel einer WT und einer Nod2 KO Maus	33
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von β -Aktin am Beispiel einer WT und einer Nod2 KO Maus	34
Abbildung 13: DRA-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d	35
Abbildung 14: NHE3-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d	36
Abbildung 15: CFTR-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d	37
Abbildung 16: Lysozym-Expression zum Zeitpunkt der Operation (0 h), nach 7 d und nach 14 d	38

8. Tabellenverzeichnis

Tabellentitel	Seite
Tabelle 1: Wellness-Score nach Komen et al. [44]	12
Tabelle 2: Beurteilung der Stuhlkonsistenz	12
Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die cDNA Synthese	16
Tabelle 4: cDNA-Synthese Temperaturprotokoll	17
Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches	17
Tabelle 6: real-time qPCR Temperaturprotokoll	18
Tabelle 7: Fixierung des Gewebes in der Histokinette	18
Tabelle 8: Ablauf der H.E.-Färbung	19
Tabelle 9: Waschpuffer Immunhistologie	21
Tabelle 10: perioperative Komplikationen d 1-3 bei WT vs. Nod2 KO Mäuse	27

9. Quellen

1. Kato, A., Romero, M.F.: Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. *Annual review of physiology* 73, 261–281 (2011)
2. Kunzelmann, K., Mall, M.: Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological reviews* 82, 245–289 (2002)
3. Mudaliar, S., Polidori, D., Zambrowicz, B., Henry, R.R.: Sodium–Glucose Cotransporter Inhibitors: Effects on Renal and Intestinal Glucose Transport. *Diabetes care* 38, 2344–2353 (2015)
4. Barrett, K.E., Keely, S.J.: Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annual review of physiology* 62, 535–572 (2000)
5. Lamprecht, G., Hsieh, C.-J., Lissner, S., Nold, L., Heil, A., Gaco, V., Schafer, J., Turner, J.R., Gregor, M.: Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium. *The Journal of biological chemistry* 284, 19744–19753 (2009)
6. Ghishan, F.K., Kiela, P.R.: Small intestinal ion transport. *Current opinion in gastroenterology* 28, 130–134 (2012)
7. Jacob, P., Rossmann, H., Lamprecht, G., Kretz, A., Neff, C., Lin–Wu, E., Gregor, M., Groneberg, D.A., Kere, J., Seidler, U.: Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* 122, 709–724 (2002)
8. Walker, N.M., Simpson, J.E., Brazill, J.M., Gill, R.K., Dudeja, P.K., Schweinfest, C.W., Clarke, L.L.: Role of down-regulated in adenoma anion exchanger in HCO₃⁻ secretion across murine duodenum. *Gastroenterology* 136, 893–901 (2009)
9. Melvin, J.E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P.J., Shull, G.E.: Mouse Down-regulated in Adenoma (DRA) Is an Intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger and Is Up-regulated in Colon of Mice Lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ Exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 274, 22855–22861 (1999)
10. Höglund, P., Haila, S., Gustavson, K.-H., Taipale, M., Hannula, K., Popinska, K., Holmberg, C., Socha, J., La Chapelle, A. de, Kere, J.: Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum. Mutat.* 11, 321–327 (1998)
11. Höglund, P., Haila, S., Socha, J., Tomaszewski, L., Saarialho-Kere, U., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Airola, K., Holmberg, C., La Chapelle, A. de, Kere, J.: Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nature genetics* 14, 316–319 (1996)

12. Biemesderfer, D., Pizzonia, J., Abu-Alfa, A., Exner, M., Reilly, R., Igarashi, P., Aronson, P.S.: NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *The American journal of physiology* 265, F736-42 (1993)
13. Schultheis, P.J., Clarke, L.L., Meneton, P., Miller, M.L., Soleimani, M., Gawenis, L.R., Riddle, T.M., Duffy, J.J., Doetschman, T., Wang, T., et al.: Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nature genetics* 19, 282–285 (1998)
14. Gawenis, L.R., Stien, X., Shull, G.E., Schultheis, P.J., Woo, A.L., Walker, N.M., Clarke, L.L.: Intestinal NaCl transport in NHE2 and NHE3 knockout mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 282, G776-G784 (2002)
15. Walker, N.M., Simpson, J.E., Yen, P.-F., Gill, R.K., Rigsby, E.V., Brazill, J.M., Dudeja, P.K., Schweinfest, C.W., Clarke, L.L.: Down-regulated in adenoma Cl/HCO₃ exchanger couples with Na/H exchanger 3 for NaCl absorption in murine small intestine. *Gastroenterology* 135, 1645-1653.e3 (2008)
16. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073–1080 (1989)
17. Rafeeq, M.M., Murad, H.A.S.: Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of translational medicine* 15, 84 (2017)
18. Dodge, J.A.: A millennial view of cystic fibrosis. *Developmental period medicine* 19, 9–13 (2015)
19. Carroll, R.E., Benedetti, E., Schowalter, J.P., Buchman, A.L.: Management and Complications of Short Bowel Syndrome: an Updated Review. *Current gastroenterology reports* 18, 40 (2016)
20. Lamprecht, G., Pape, U.-F., Witte, M., Pascher, A.: S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin e. V. in Zusammenarbeit mit der AKE, der GESKES und der DGVS. *Aktuel Ernährungsmed* 39, e57-e71 (2014)
21. Messing, B., Crenn, P., Beau, P., Boutron-Ruault, M.C., Rambaud, J.C., Matuchansky, C.: Long-term survival and parenteral nutrition dependence in adult patients with the short bowel syndrome. *Gastroenterology* 117, 1043–1050 (1999)
22. Bielawska, B., Allard, J.P.: Parenteral Nutrition and Intestinal Failure. *Nutrients* 9 (2017)
23. Duro, D., Kamin, D., Duggan, C.: Overview of pediatric short bowel syndrome. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 47 Suppl 1, S33-6 (2008)
24. Limketkai, B.N., Parian, A.M., Shah, N.D., Colombel, J.-F.: Short Bowel Syndrome and Intestinal Failure in Crohn's Disease. *Inflammatory bowel diseases* 22, 1209–1218 (2016)
25. Baumgart, D.C., Sandborn, W.J.: Crohn's disease. *Lancet (London, England)* 380, 1590–1605 (2012)

26. Horisberger, K., Kienle, P.: Chirurgie beim M. Crohn. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 86, 1083–1094 (2015)
27. Dekaney, C.M., Fong, J.J., Rigby, R.J., Lund, P.K., Henning, S.J., Helmuth, M.A.: Expansion of intestinal stem cells associated with long-term adaptation following ileocecal resection in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 293, G1013-22 (2007)
28. Ishiguro, H., Namkung, W., Yamamoto, A., Wang, Z., Worrell, R.T., Xu, J., Lee, M.G., Soleimani, M.: Effect of Slc26a6 deletion on apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 292, G447-55 (2007)
29. Falcone, R.A., Shin, C.E., Stern, L.E., Wang, Z., Erwin, C.R., Soleimani, M., Warner, B.W.: Differential expression of ileal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoforms after enterectomy. *The Journal of surgical research* 86, 192–197 (1999)
30. Musch, M.W., Bookstein, C., Rocha, F., Lucioni, A., Ren, H., Daniel, J., Xie, Y., McSwine, R.L., Rao, M.C., Alverdy, J., et al.: Region-specific adaptation of apical Na/H exchangers after extensive proximal small bowel resection. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 283, G975-G985 (2002)
31. Sacks, A.I., Acra, S.A., Dykes, W., Polk, D.B., Barnard, J.A., Pietsch, J., Ghishan, F.K.: Intestinal Na⁺/H⁺ exchanger activity is up-regulated by bowel resection in the weanling rat. *Pediatric research* 33, 215–220 (1993)
32. Lamprecht, G., Bodammer, P.: Nutritional strategies to enhance adaptation in intestinal failure. *Current opinion in organ transplantation* 21, 140–146 (2016)
33. Fishbein, T.M.: Intestinal transplantation. *The New England journal of medicine* 361, 998–1008 (2009)
34. Schaffler, H., Schneider, N., Hsieh, C.J., Reiner, J., Nadalin, S., Witte, M., Konigsrainer, A., Blumenstock, G., Lamprecht, G.: NOD2 mutations are associated with the development of intestinal failure in the absence of Crohn's disease. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 32, 1029–1035 (2013)
35. Strober, W., Watanabe, T.: NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal immunology* 4, 484–495 (2011)
36. Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606 (2001)
37. Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nunez, G., Keshav, S.: Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125, 47–57 (2003)

38. Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., Watanabe, T.: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews. Immunology* 6, 9–20 (2006)
39. Hoffmann, J., Kroesen A., Klump, B. (eds.): Holtmann M.; Neurath M., *Das intestinale Immunsystem; In: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen; S. 28-48. Thieme, Stuttgart (2004)*
40. Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603 (2001)
41. Wehkamp, J., Stange, E.F.: NOD2 mutation and mice: no Crohn's disease but many lessons to learn. *Trends in molecular medicine* 11, 307–309 (2005)
42. Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., Flavell, R.A.: Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. *Science* 307, 731–734 (2005)
43. Berlin, P., Reiner, J., Wobar, J., Bannert, K., Glass, Ä., Walter, M., Bastian, M., Willenberg, H.S., Vollmar, B., Klar, E., et al.: Villus Growth, Increased Intestinal Epithelial Sodium Selectivity, and Hyperaldosteronism Are Mechanisms of Adaptation in a Murine Model of Short Bowel Syndrome. *Digestive diseases and sciences* (2018)
44. Komen, N., van der Wal, H.-C., Ditzel, M., Kleinrensink, G.-J., Jeekel, H., Lange, J.F.: Colorectal anastomotic leakage: a new experimental model. *The Journal of surgical research* 155, 7–12 (2009)
45. Ning, J., Liebich, J., Kastner, M., Zhou, J., Schaffer, A., Burauel, P.: Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. *Applied microbiology and biotechnology* 82, 983–993 (2009)
46. Gallagher, S.R., Desjardins, P.R.: Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] Appendix 3, 3 (2007)*
47. Olson, N.D., Morrow, J.B.: DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC research notes* 5, 668 (2012)
48. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications* 4, 357–362 (1995)
49. Holzapfel, B., Wickert, L.: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit* 37, 120–126 (2007)
50. Ramulu, S., Kale, A.D., Hallikerimath, S., Kotrashetti, V.: Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in

- paraffin embedded tissue sections. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 17, 23–30 (2013)
51. Chan, J.K.C.: The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International journal of surgical pathology* 22, 12–32 (2014)
 52. Veitch, N.C.: Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249–259 (2004)
 53. Cuthbert, A.P., Fisher, S.A., Mirza, M.M., King, K., Hampe, J., Croucher, P.J., Mascheretti, S., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J., et al.: The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 867–874 (2002)
 54. Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeier, A., MacPherson, A.J., et al.: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet (London, England)* 357, 1925–1928 (2001)
 55. Ningappa, M., Higgs, B.W., Weeks, D.E., Ashokkumar, C., Duerr, R.H., Sun, Q., Soltys, K.A., Bond, G.J., Abu-Elmagd, K., Mazariegos, G.V., et al.: NOD2 gene polymorphism rs2066844 associates with need for combined liver-intestine transplantation in children with short-gut syndrome. *The American journal of gastroenterology* 106, 157–165 (2011)
 56. Fishbein, T., Novitskiy, G., Mishra, L., Matsumoto, C., Kaufman, S., Goyal, S., Shetty, K., Johnson, L., Lu, A., Wang, A., et al.: NOD2-expressing bone marrow-derived cells appear to regulate epithelial innate immunity of the transplanted human small intestine. *Gut* 57, 323–330 (2008)
 57. Schäffler, H., Teufel, M., Fleischer, S., Hsieh, C.-J., Frick, J.-S., Lamprecht, G.: Two patients with intestinal failure requiring home parenteral nutrition, a NOD2 mutation and tuberculous lymphadenitis. *BMC Gastroenterology* 14, 43 (2014)
 58. Devine, A.A., Gonzalez, A., Speck, K.E., Knight, R., Helmrath, M., Lund, P.K., Azcarate-Peril, M.A.: Impact of ileocecal resection and concomitant antibiotics on the microbiome of the murine jejunum and colon. *PloS one* 8, e73140 (2013)
 59. Shin, C.E., Falcone, R.A., JR, Kemp, C.J., Erwin, C.R., Litvak, D.A., Evers, B.M., Warner, B.W.: Intestinal adaptation and enterocyte apoptosis following small bowel resection is p53 independent. *The American journal of physiology* 277, G717-24 (1999)
 60. Ulrike Deuse: Vergleich zweier Beatmungsgeräte für Mäuse, vorwiegend unter dem Aspekt der klinischen Tauglichkeit. München (2004)
 61. Fachinformation Isofluran Baxter, http://www.baxter.de/de_DE/assets/downloads/fachinformation/isofluran_baxter.pdf zuletzt geprüft am 14.01.2019

62. Rigby, R.J., Hunt, M.R., Scull, B.P., Simmons, J.G., Speck, K.E., Helmuth, M.A., Lund, P.K.: A new animal model of postsurgical bowel inflammation and fibrosis. The effect of commensal microflora. *Gut* 58, 1104–1112 (2009)
63. Liu, X., Nelson, D.W., Holst, J.J., Ney, D.M.: Synergistic effect of supplemental enteral nutrients and exogenous glucagon-like peptide 2 on intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 84, 1142–1150 (2006)
64. Kripke, S.A., Paula, J.A. de, Berman, J.M., Fox, A.D., Rombeau, J.L., Settle, R.G.: Experimental short-bowel syndrome: effect of an elemental diet supplemented with short-chain triglycerides. *The American journal of clinical nutrition* 53, 954–962 (1991)
65. Dahly, E.M., Gillingham, M.B., Guo, Z., Murali, S.G., Nelson, D.W., Holst, J.J., Ney, D.M.: Role of luminal nutrients and endogenous GLP-2 in intestinal adaptation to mid-small bowel resection. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 284, G670-82 (2003)
66. Martin, G.R., Le Wallace, Sigalet, D.L.: Glucagon-like peptide-2 induces intestinal adaptation in parenterally fed rats with short bowel syndrome. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 286, G964-72 (2004)
67. Wakeman, D., Longshore, S.W., McMellen, M.E., Santos, J.A., Guo, J., Erwin, C.R., Warner, B.W.: Extent of small bowel resection does not influence the magnitude of intestinal adaptation in the mouse. *Journal of pediatric surgery* 45, 1274–1279 (2010)
68. Helmuth, M.A., VanderKolk, W.E., Can, G., Erwin, C.R., Warner, B.W.: Intestinal adaptation following massive small bowel resection in the mouse. *Journal of the American College of Surgeons* 183, 441–449 (1996)
69. Snipes, R.L.: Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. *Anatomy and embryology* 162, 455–474 (1981)
70. Berlin, P., Reiner, J., Witte, M., Wobar, J., Lindemann, S., Barrantes, I., Kreikemeyer, B., Bastian, M., Schäffler, H., Bannert, K., et al.: Nod2 deficiency functionally impairs adaptation to short bowel syndrome via alterations of the epithelial barrier function. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* (2019)
71. Barros, G.G., Tannuri, A.C.A., Rotondo, Í.G., van Vaisberg, V., Sarmiento, L.S., Neto, C.M., Serafini, S., Oliveira Gonçalves, J. de, Coelho, M.C.M., Tannuri, U.: Is maintenance of the ileocecal valve important to the intestinal adaptation mechanisms in a weaning rat model of short bowel? *Pediatric surgery international* 34, 1215–1224 (2018)
72. Matsumoto, Y., Mochizuki, W., Akiyama, S., Matsumoto, T., Nozaki, K., Watanabe, M., Nakamura, T.: Distinct intestinal adaptation for vitamin B12 and bile acid absorption revealed in a new mouse model of massive ileocecal resection. *Biology open* 6, 1364–1374 (2017)

73. Brenmoehl, J., Herfarth, H., Glück, T., Audebert, F., Barlage, S., Schmitz, G., Froehlich, D., Schreiber, S., Hampe, J., Schölmerich, J., et al.: Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive care medicine* 33, 1541–1548 (2007)
74. Oh, S.J., Kim, J.H., Chung, D.H.: NOD2-mediated suppression of CD55 on neutrophils enhances C5a generation during polymicrobial sepsis. *PLoS pathogens* 9, e1003351 (2013)
75. Sônego, F., Castanheira, F.V.S., Czaikoski, P.G., Kanashiro, A., Souto, F.O., França, R.O., Nascimento, D.C., Freitas, A., Spiller, F., Cunha, L.D., et al.: MyD88-, but not Nod1- and/or Nod2-deficient mice, show increased susceptibility to polymicrobial sepsis due to impaired local inflammatory response. *PloS one* 9, e103734 (2014)
76. Sigalet, D.L., Martin, G.R.: Mechanisms underlying intestinal adaptation after massive intestinal resection in the rat. *Journal of pediatric surgery* 33, 889–892 (1998)
77. Lamprecht, G., Schaefer, J., Dietz, K., Gregor, M.: Chloride and bicarbonate have similar affinities to the intestinal anion exchanger DRA (down regulated in adenoma). *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452, 307–315 (2006)
78. Furukawa, O., Bi, L.C., Guth, P.H., Engel, E., Hirokawa, M., Kaunitz, J.D.: NHE3 inhibition activates duodenal bicarbonate secretion in the rat. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 286, G102-9 (2004)
79. Seidler, U.E., Liu, Y., Qian, J., Tan, Q., Riederer, B., Hofmann, F., Jonge, H. de: Anion and fluid secretory response of the murine jejunum to the heat-stable *Eschericia coli* enterotoxin (STa) analogue linacotide: Involvement of NHE3, Slc26a6, CFTR, proteinkinase GII (cGKII) and NHERF1-3. *The FASEB Journal* 32, 747.23-747.23 (2018)
80. Favia, M., Fanelli, T., Bagorda, A., Di Sole, F., Reshkin, S.J., Suh, P.G., Guerra, L., Casavola, V.: NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions. *Biochemical and biophysical research communications* 347, 452–459 (2006)
81. Tse, C.-M., Yin, J., Singh, V., Sarker, R., Lin, R., Verkman, A.S., Turner, J.R., Donowitz, M.: cAMP Stimulates SLC26A3 Activity in Human Colon by a CFTR-Dependent Mechanism That Does Not Require CFTR Activity. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 7, 641–653 (2019)
82. Haggie, P.M., Cil, O., Lee, S., Tan, J.-A., Rivera, A.A., Phuan, P.-W., Verkman, A.S.: SLC26A3 inhibitor identified in small molecule screen blocks colonic fluid absorption and reduces constipation. *JCI insight* 3 (2018)
83. Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A., Noordine, M.-L., Meylheuc, T., Langella, P., Messing, B., Duée, P.-H., Cherbuy, C., Thomas, M.: Drastic changes in fecal and mucosa-

associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie* 92, 753–761 (2010)

84. Peeters, T., Vantrappen, G.: The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut* 16, 553–558 (1975)

Danksagung

Zunächst möchte ich vor allen Herrn Prof. Dr. med. Georg Lamprecht für die Vergabe des interessanten Themas und die konstante gute Betreuung danken.

In besonderem Umfang möchte ich Frau Dr. rer. nat. Peggy Berlin danken, die mit viel Geduld in stundenlangen Gesprächen immer mit Rat und Tat zu Seite stand. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die schöne und konstruktive Zeit im Labor geht mein Dank an alle MitarbeiterInnen des gastroenterologischen Labors. Danke an Frau PD Dr. med. habil. Maria Witte für die Vielzahl der operierten Mäuse. Für die gute Betreuung im Labor, die nette Atmosphäre und die stetige Hilfe danke ich, Dr. rer. hum. Karen Bannert, Prof. Dr. med. Robert Jaster, Dr. med. Johannes Reiner, Julia Steinig, Madeleine Bartsch.

Für die ganze Unterstützung im Hintergrund, das Verständnis und die motivierenden Worte danke ich Robert, meiner Familie und meinen Freunden.