

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,  
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie)

**Intestinale Expression von Hornerin und sein Vorkommen  
in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

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

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

**vorgelegt von**

**Neukamm, Ann-Cathrine**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wehkamp
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Grundmann-Hauser

Tag der Disputation: 11.02.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) .....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des GI-Traktes .....	1
1.1.2 Das Mikrobiom des GI-Traktes .....	2
1.1.3 Die Intestinale Barriere.....	3
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) .....	6
1.2.1 Morbus Crohn (MC).....	9
1.2.2 Colitis ulcerosa (CU).....	10
1.2.3 Therapie .....	11
1.3 Hornerin (HRNR) – ein Barriere- und Differenzierungsprotein .....	12
1.3.1 Regulation von HRNR .....	14
1.3.2 Klinische Bedeutung von HRNR .....	15
1.4 Ziel der Arbeit .....	16
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Geräte.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	18
2.1.3 Chemikalien, Antikörper und Kits .....	19
2.1.4 Medien und Puffer .....	21
2.1.5 Peptide .....	23
2.1.6 Primer-Sequenzen.....	23
2.1.7 Bakterien, Zelllinien und Mäuse .....	24
2.1.8 Patienten .....	25
2.1.9 Software.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Methoden in der Zellkultur.....	27
2.2.2 Molekularbiologie .....	29
2.2.3 Analyse der Proteinexpression .....	36
2.2.4 Mikrobiologie .....	39
2.2.5 In silico – Verdau .....	41
2.2.6 Statistische Auswertung .....	41

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1 Intestinale Expression von HRNR .....	43
3.1.1 Expression von HRNR in verschiedenen Darmabschnitten .....	43
3.1.2 Expression von HRNR in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) .....	45
3.1.3 Analyse der Korrelation der HRNR-Expression mit verschiedenen Patienteneigenschaften .....	47
3.1.4 Immunhistochemische Färbung von HRNR .....	51
3.2 Regulation der HRNR-Expression .....	54
3.2.1 Untersuchung der HRNR-Expression in verschiedenen Zelllinien....	54
3.2.2 Einfluss von lichtexponiertem Zellkulturmedium auf die HRNR- Expression .....	55
3.2.3 Einfluss von Bakterien auf die HRNR-Expression .....	57
3.2.4 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die HRNR-Expression .....	59
3.3 Charakterisierung von HRNR .....	61
3.3.1 Identifizierung großer HRNR-Fragmente mittels Westernblot .....	61
3.3.2 In silico Verdau von HRNR .....	63
3.3.3 Analyse antimikrobieller Eigenschaften kleiner HRNR-Fragmente ..	64
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>66</b>
4.1 Die intestinale HRNR-Expression.....	66
4.1.1 Humanes Darmepithel exprimiert HRNR .....	66
4.1.2 Unterschiede in der HRNR-Expression in Patienten mit CED .....	68
4.2 Aspekte der Regulation von HRNR .....	69
4.3 HRNR-Fragmente und ihre Funktionen .....	74
4.3.1 Fragmentierung als Möglichkeit der Aktivitätsregulierung und Vervielfältigung .....	74
4.3.2 Antimikrobielle Eigenschaften von HRNR-Fragmenten .....	75
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	79
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>81</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>83</b>
<b>7. Erklärungen zum Eigenanteil</b> .....	<b>99</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>100</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AMP	Antimikrobielles Peptid
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFU	<i>colony forming units</i>
CU	Colitis ulcerosa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FICZ	6-Formylindolo(3,2-b)carbazol
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
h	Stunden
hBD1-3	humane $\beta$ -Defensine 1-3
HD5/6	humane $\alpha$ -Defensine 5/6
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNP 1-4	humane Neutrophilen Peptide 1-4
HRNR	Hornerin
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
K	Kontrolle
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
MC	Morbus Crohn
min	Minuten
Na-Pyruvat	Natriumpyruvat

NEAS	nicht-essentielle Aminosäuren
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RDA	<i>Radial Diffusion Assay</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SFTP	S100 <i>fused-type</i> Proteine
SIHUMI	<i>simplified human intestinal microbiota</i>
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus, <i>single nucleotid polymorphism</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRX	Thioredoxin
TSB	Tryptic soy broth
u. a.	unter anderem
V	Volt
v. a.	vor allem
vs.	versus
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt)

### 1.1.1 Aufbau und Funktion des GI-Traktes

Der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) ist ein langer, kontinuierlicher Schlauch, dessen wichtigste Aufgabe die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen und von Flüssigkeit ist. Die Nahrung wird über den Mund aufgenommen, zerkleinert und durch den Speichel mit den ersten Enzymen, z. B.  $\alpha$ -Amylase, versetzt. Dieser Nahrungsbrei wird anschließend über die Speiseröhre (Ösophagus) in den Magen transportiert und dort weiter zerkleinert und durchmischt (Gekle, 2014). Im Magen herrscht ein sehr saures Milieu, je nach Verdauungsphase mit einem  $\text{pH} < 2$ , welches Proteine denaturiert und die Anzahl der Mikroorganismen stark dezimiert (Autenrieth, 2003). Anschließend wird der Speisebrei im Zwölffingerdarm (Duodenum) mit Gallensäuren und Sekret aus der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) versetzt. Dieses enthält viel Bicarbonat, um die Säure zu neutralisieren, und verschiedene Enzyme zur Aufspaltung der Nährstoffe (u. a. Trypsin, Chymotrypsin, Lipase, Amylase). Die Protease Trypsin hat dabei die wichtige Funktion andere Enzyme aus Vorstufen proteolytisch zu aktivieren und deren Aktivität zu regulieren (Whitcomb & Lowe, 2007; Horn, 2015). Der 3 – 5 m lange Dünndarm gliedert sich von oral nach aboral in die Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum (Kirsch *et al.*, 2014). Hier erfolgt der Hauptteil der Flüssigkeits- und Nährstoffresorption. Dazu ist die Oberfläche durch Zotten (*Villi intestinales*), Krypten (Lieberkühn-Krypten) und einem feinen Bürstensaum auf der Oberfläche der Epithelzellen auf etwa  $60 \text{ m}^2$  vergrößert, wobei die Dichte der Zotten zum Dickdarm hin immer weiter abnimmt und die Krypten zunehmen (Kirsch *et al.*, 2014). Die Ileocoecalklappe bildet den Übergang zwischen Dün- und Dickdarm. Sie verhindert den Rückfluss von Dickdarminhalt, welcher eine deutlich größere Anzahl an Bakterien enthält. Der Dickdarm (etwa 1,5 m lang) besteht aus dem Colon (aufgeteilt in *Coecum*, *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens* und *Colon sigmoideum*), dem Rectum und dem Analkanal. Seine wesentliche Aufgabe ist die Eindickung des Stuhls und Bildung eines Reservoirs mit Kontinenzfunktion (Kirsch *et al.*, 2014).

Die Darmwand ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut, welche über seine gesamte Länge relativ konstant sind. Die an das Darmlumen angrenzenden Epithelzellen (*Lamina epithelialis*) bilden gemeinsam mit einer darunterliegenden dünnen Muskelschicht und einer bindegewebigen Schicht (*Lamina propria*) die Darmschleimhaut (*Tunica mucosa*). Darunter folgt eine Bindegewebsschicht (*Tela submucosa*), welche Gefäße, Nerven und lymphatisches Gewebe enthält. Nach einer dickeren Schicht mit Muskeln (*Tunica muscularis*), welche für die Peristaltik notwendig ist, und weiterem Bindegewebe (*Tunica adventitia*) ist der Darm schließlich von Bauchfell (Peritoneum, *Tunica serosa*) überzogen (Lüllmann-Rauch, 2015).

### 1.1.2 Das Mikrobiom des GI-Traktes

Der GI-Trakt besitzt eine sehr große Oberfläche von 200 – 300 m<sup>2</sup> (Gebbers & Laissue, 1989), welche der Aufnahme von Nährstoffen dient, worüber er aber auch gegenüber Mikroorganismen aus der Umwelt exponiert ist. Die Zahl der im GI-Trakt lebenden Mikroorganismen wird aktuell auf circa  $4 \times 10^{13}$  geschätzt, was auch in etwa der Anzahl der Körperzellen eines Menschen entspricht (Sender *et al*, 2016). Die Gesamtheit der den Menschen besiedelnden Mikroorganismen wird als Mikrobiom bezeichnet, welches sich neben Bakterien auch aus Pilzen, Viren, Archaeen und Protozoen zusammensetzt (Sekirov *et al*, 2010). Der weit größte Anteil der Mikroorganismen befindet sich im Darm und dort insbesondere im Dickdarm (Savage, 1977; Sender *et al*, 2016). Dabei kommen sowohl schädliche (pathogene) als auch in großer Mehrheit nützliche (kommensale) Mikroorganismen vor, welche für den Menschen von essentieller Bedeutung sind. Bakterien tragen im Darm einen wichtigen Beitrag zur Aufspaltung und Aufnahme von Nahrungsmitteln, wie z. B. pflanzlicher Kohlenhydrate (Polysaccharide), Vitamine und essentieller Aminosäuren, bei (Bäckhed *et al*, 2004; Gill *et al*, 2006). Zudem schützen Kommensale durch ihre Besiedlung des Darms vor einer übermäßigen Vermehrung pathogener Mikroorganismen, können aber z. B. bei Verletzungen der Darmwand oder bei einer Immunschwäche auch selbst schädlich für ihren Wirt werden (Hooper & Gordon, 2001). Der menschliche Körper lebt so in einem ständigen Gleichgewicht mit den ihn besiedelnden Mikroorganismen.

Die Anzahl der Bakterien im GI-Trakt nimmt von proximal nach distal kontinuierlich zu. Im Magen und im Duodenum finden sich aufgrund niedriger pH-

Werte, Gallensäuren und der Pankreasenzyme nur  $10^1$ - $10^3$  Bakterien / ml Darminhalt. Im Dünndarm steigt dann die Bakterienanzahl kontinuierlich an bis im Dickdarm schließlich  $10^{11}$  –  $10^{12}$  Bakterien / ml Darminhalt auftreten (O'Hara & Shanahan, 2006). Dabei verändern sich auch die vorherrschenden Bakterien-Spezies. Während im Dünndarm unter Anwesenheit von Sauerstoff noch viele aerobe und aerotolerante Bakterien wie Bacilli, insbesondere Lactobacillen, vorkommen, ist im Dickdarm fast kein Sauerstoff mehr vorhanden. Dort treten v. a. strikt anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien, wie Vertreter des Stammes Bacteroidetes, auf (Frank *et al.*, 2007; Sekirov *et al.*, 2010). Zusätzlich unterscheidet sich die Zusammensetzung der Bakterien im Lumen von der epithelnahen Schleimschicht. Insgesamt gehört die große Mehrheit der Darmbakterien den beiden Stämmen Bacteroidetes und Firmicutes an (Eckburg *et al.*, 2005).

Die Besiedlung des Körpers mit Mikroorganismen beginnt direkt nach der Geburt und entwickelt und verändert sich dann im Laufe des Lebens. Verschiedene Faktoren, wie die Ernährung, Medikamente und Krankheit beeinflussen die Zusammensetzung der Darmflora (Mändar & Mikelsaar, 1996; Koenig *et al.*, 2011). Wu *et al.* definierten verschiedene Bakterienkonstellationen als „Enterotypen“, welche mit langfristigen Ernährungsgewohnheiten korreliert waren. Die Zusammensetzung der Mikrobiota unterschied sich dabei insbesondere zwischen einer Ernährung mit viel tierischen Proteinen und Fetten gegenüber kohlenhydratreicher Kost (Wu *et al.*, 2011). In letzter Zeit wurde auch gezeigt, dass das Mikrobiom einen wichtigen Einfluss auf verschiedene Krankheiten, wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Darmkrebs und chronisch entzündliche Darmerkrankungen, hat (Ley *et al.*, 2006; Uronis *et al.*, 2009; Kostic *et al.*, 2014; Woting & Blaut, 2016).

### 1.1.3 Die Intestinale Barriere

Um das Eindringen von Mikroorganismen und die Diffusion von toxischen Substanzen in die Darmwand zu verhindern, sowie zur Kontrolle des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts, wird im GI-Trakt eine protektive Barriere gebildet. Diese besteht aus mehreren aufeinander aufgebauten Komponenten. Durch einen festen Epithelzellverband wird zunächst eine mechanische Barriere gebildet. Dafür befinden sich zwischen den Zellen sog. *tight junctions*, welche die parazelluläre Diffusion streng

kontrollieren (Madara, 1998). Über den Epithelzellen liegt eine Schleimschicht, der sog. Mukus, welcher u. a. aus verschiedenen Muzinen (Glycoproteine) besteht und von Becherzellen und Epithelzellen gebildet wird (Johansson *et al*, 2013). Im Dickdarm besteht der Mukus aus zwei Schichten. Die innere Schicht haftet dem Epithel fest an und ist weitgehend steril. Die luminale Schicht ist in der Konsistenz dünnflüssiger, locker gebunden und enthält physiologischerweise Bakterien. Im Dünndarm dagegen ist der Mukus einschichtig, durchlässiger und nicht adhärent (Atuma *et al*, 2001; Johansson *et al*, 2008; Ermund *et al*, 2013). Durch die gelartige Konsistenz des Mukus werden Bakterien bereits mechanisch vom Epithel ferngehalten. Zusätzlich enthält er viele körpereigene antimikrobielle Substanzen wie Defensine und Cathelicidin, welche einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere darstellen (Meyer-Hoffert *et al*, 2008; Antoni *et al*, 2013). Auf dieses Thema wird in 1.1.3.1 genauer eingegangen.

Zudem gibt es eine Vielzahl von Zellen zur Immunabwehr. Dabei wird das angeborene, unspezifische Immunsystem vom erworbenen, spezifischen Immunsystem unterschieden. Potenziell schädliche Mikroorganismen werden von Zellen des angeborenen Immunsystems an bestimmten Mustern, den sog. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), als körperfremd erkannt. Das können verschiedene Oberflächenmerkmale von Bakterien wie Lipopolysaccharide, welche sich auf gram-negativen Bakterien befinden, und Flagellin aber auch doppelsträngige RNA von Viren sein. Die Bakterien werden dann von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen über spezielle Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, u. a. *toll-like receptors*) erkannt und phagozytiert. Zusätzlich schütten diese Immunzellen Zytokine und Chemokine aus, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen, und antimikrobielle Peptide (AMPs) werden vermehrt synthetisiert (Gewirtz *et al*, 2001; Munford & Varley, 2006; Abraham & Medzhitov, 2011).

Dendritische Zellen und Makrophagen präsentieren außerdem Bestandteile der phagozytierten Organismen, aktivieren darüber naive T-Zellen und leiten damit eine erregerspezifische Immunantwort ein. Diese beinhaltet u. a. die Sekretion großer Mengen von polyklonalem Immunglobulin A durch Plasmazellen ins Darmlumen, was bereits auf der Darmoberfläche zu einer schnellen und spezifischen Abwehrreaktion führt (Geuking *et al*, 2012).

### 1.1.3.1 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Zum Schutz gegen Mikroorganismen produziert der Körper auf seinen Oberflächen, und damit auch im Darm, kleine Peptide und Proteine mit antimikrobieller Wirkung. Sie sind Teil der angeborenen, unspezifischen Abwehr und wirken gegen viele Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten (Lai & Gallo, 2009). Die Vielfalt der Antimikrobiellen Peptide (AMPs) ist sehr groß, ebenso wie ihre Wirkungsweisen. Beim Menschen sind zum jetzigen Zeitpunkt (Dezember 2018) 126 verschiedene AMPs bekannt (Wang *et al.*, 2016). Dabei sind es meist kleine, positiv geladene (kationische) Moleküle (mit amphipathischer Struktur) mit einer Länge von 10 bis 149 Aminosäuren und einer durchschnittlichen Nettoladung von +5,6 bei humanen AMPs (Wang, 2014). Diese Eigenschaften ermöglichen die Interaktion mit der überwiegend negativ geladenen Zellhülle von Bakterien. Dadurch können in der Zellhülle Poren gebildet werden, was zur Lyse des Bakteriums führt oder die Zellwand wird durch die Auflagerung von AMPs direkt zerstört (Shai, 1999; Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Yount & Yeaman, 2013). Weitere Strategien sind die Bildung von Netzen, in welchen sich Mikroorganismen verfangen (Schroeder *et al.*, 2015; Raschig *et al.*, 2017), sowie eine intrazelluläre Störung des bakteriellen Stoffwechsels (Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Wendler *et al.*, 2018). Die genauen Wirkweisen der AMPs sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Neben einer direkt antimikrobiellen Wirkung besitzen AMPs noch weitere Funktionen in der Abwehr von Mikroorganismen. Sie können zusätzlich die Immunantwort modulieren, indem sie u. a. die Produktion von Chemokinen induzieren oder selbst als solche wirken, die Wirkung von Immunzellen beeinflussen oder die Wundheilung fördern (Territo *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1999; Baroni *et al.*, 2009; Lai & Gallo, 2009).

AMPs werden anhand ihrer Struktur in Gruppen eingeteilt. Zwei wichtige und gut untersuchte Gruppen sind die Cathelicidine, z. B. LL-37, und die Defensine (Lai & Gallo, 2009). Defensine besitzen eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und drei Disulfidbrücken und werden anhand ihrer Konfiguration nochmals in die beim Menschen vorkommenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine eingeteilt (White *et al.*, 1995). Im Darm werden Defensine sowohl dauerhaft (konstitutiv) exprimiert, wie das humane  $\beta$ -Defensin 1 (hBD1), als auch als Antwort auf Bakterienbestandteile oder andere Entzündungsreize ausgeschüttet, wie die humanen  $\beta$ -Defensine 2 und 3 (hBD2, hBD3) (O'Neil *et al.*, 1999; Ayabe *et al.*, 2000;

Wehkamp *et al.*, 2002; Zilbauer *et al.*, 2005).  $\beta$ -Defensine (hBD1-3) werden überwiegend von Epithelzellen im ganzen Körper, aber auch von Makrophagen und dendritischen Zellen synthetisiert (O’Neil *et al.*, 1999; Duits *et al.*, 2002). Die zu den  $\alpha$ -Defensinen gehörenden humanen Neutrophilen Peptide (HNP1-4) werden vorwiegend in Granulozyten gebildet (Selsted *et al.*, 1985; Wilde *et al.*, 1989), während die Synthese der beiden humanen  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 auf die Paneth-Körnerzellen in den Krypten des Dünndarms beschränkt ist (Jones & Bevins, 1992; Wehkamp & Stange, 2010).

## 1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die Hauptvertreter der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Wie der Name beschreibt handelt es sich dabei um eine chronische Entzündung des Darms, welche schubweise verläuft, sich jedoch auch außerhalb des Darms manifestieren kann. Die Häufigkeit beider Erkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten weltweit angestiegen, wobei die Zahlen in stärker industrialisierten Ländern höher sind (höchste Inzidenzraten in Skandinavien, Kanada und Australien) (Molodecky *et al.*, 2012). Deutschland liegt mit einer Inzidenz von etwa 3,5 - 6,6 / 100.000 für MC und 2 - 3,9 / 100.000 für CU im Mittelfeld (Daiss *et al.*, 1989; Timmer *et al.*, 1999; Timmer & Goebell, 1999; Ott *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu werden weltweit höhere Inzidenzraten für CU als für MC erfasst. Frauen und Männer sind insgesamt ähnlich häufig betroffen. Der Altersgipfel der Erstmanifestation liegt bei MC zwischen 20 und 30 Jahren und bei CU etwa 10 Jahre höher (Ott, 2016).

CED können sich in unterschiedlicher Weise äußern. Typische Symptome sind Allgemeinbeschwerden, wie Schwäche, Fieber und Gewichtsverlust oder Wachstumsstörungen, Bauchschmerzen und Durchfall. Die Schmerzen können diffus oder kolikartig sein und sind abhängig vom Ort der Entzündung, bei MC häufig im rechten und bei CU häufig im linken Unterbauch, lokalisiert. Die Durchfälle sind bei CU typischerweise blutig und schleimig, während dies bei MC eher selten vorkommt. Außerdem treten in bis zu 50 % extraintestinale Symptome, z. B. an den Gelenken, der Haut oder am Auge, auf (Harbord *et al.*, 2016). Probleme bereiten zudem mögliche Komplikationen. Der MC kann Fisteln, Strikturen, Abszesse, Malabsorptionssyndrome

und Obstruktionen bis hin zum Darmverschluss verursachen. Bei der CU stehen eher Blutungen und eine dadurch bedingte Anämie, Perforationen, die Gefahr eines toxischen Megakolons und das erhöhte Risiko für die Entstehung von Darmkrebs im Vordergrund. Das Risiko für Darmkrebs hängt dabei u. a. vom Ausmaß, der Schwere und der Dauer der Entzündung ab. CED können mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einhergehen, sowohl durch die Krankheitsaktivität an sich als auch durch die häufig mit chronischen Erkrankungen verbundenen Ängste, Schuldgefühle, sozialen Rückzug sowie psychische Begleiterkrankungen. (Spang *et al*, 2016; Brüning & Homann, 2018; Herold, 2018)

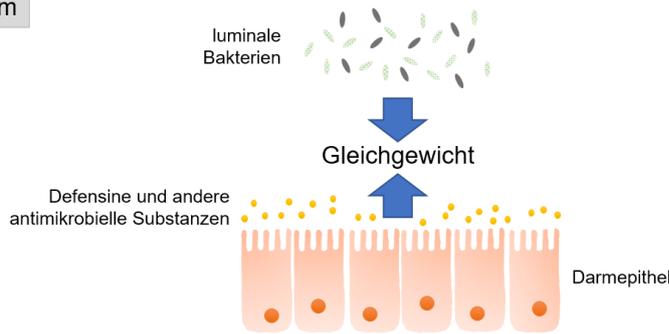
Die Ätiologie der CED ist multifaktoriell. Sowohl die Genetik als auch Umweltfaktoren, immunologische und mikrobielle Faktoren tragen zur Krankheitsentstehung bei. Mittlerweile sind zahlreiche Gene bekannt, welche im Zusammenhang mit CED stehen. Das bekannteste ist NOD2, welches für einen Bakterienoberflächen erkennenden Rezeptor auf Makrophagen kodiert (Ogura *et al*, 2001). Eineiige Zwillinge erkranken jedoch nur in etwa 50 % ebenfalls an MC, bei der CU sind es nur 18 % (Orholm *et al*, 2000; Halfvarson *et al*, 2003). Die Genetik spielt somit eine wichtige Rolle, stellt jedoch nicht die alleinige Ursache dar. Da CED in Industrieländern vermehrt auftreten, wird ein großer Einfluss von Umweltfaktoren angenommen. Raucher haben ein höheres Risiko an MC zu erkranken und dann auch schwerere Verläufe, während Rauchen bei CU eine protektive Wirkung zu haben scheint (Cosnes *et al*, 2001; Mahid *et al*, 2006). Weitere Faktoren wie z. B. verschiedene Ernährungsgewohnheiten (Hou *et al*, 2011), vermehrte Hygiene in der Kindheit (Koloski *et al*, 2008) und frühes Abstillen (Klement *et al*, 2004) werden diskutiert. Eine mögliche Verbindung zwischen Umweltfaktoren und der Genetik sind epigenetische Modifikationen, wie z. B. die Methylierung von DNA und die Modifikation von Histonen u. a. durch Histondeacetylasen (HDACs). Bei Patienten mit CED liegen andere Methylierungsmuster vor als in gesunden Probanden (Nimmo *et al*, 2012; Ventham *et al*, 2016; Rogler *et al*, 2018). Zudem konnte in DSS-induzierter Colitis bei Mäusen die Entzündungsaktivität durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren gesenkt werden (Glauben *et al*, 2006, 2008; Felice *et al*, 2015).

Des Weiteren weisen Patienten mit CED eine gegenüber gesunden Probanden veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms auf. Die Diversität des Mikrobioms von

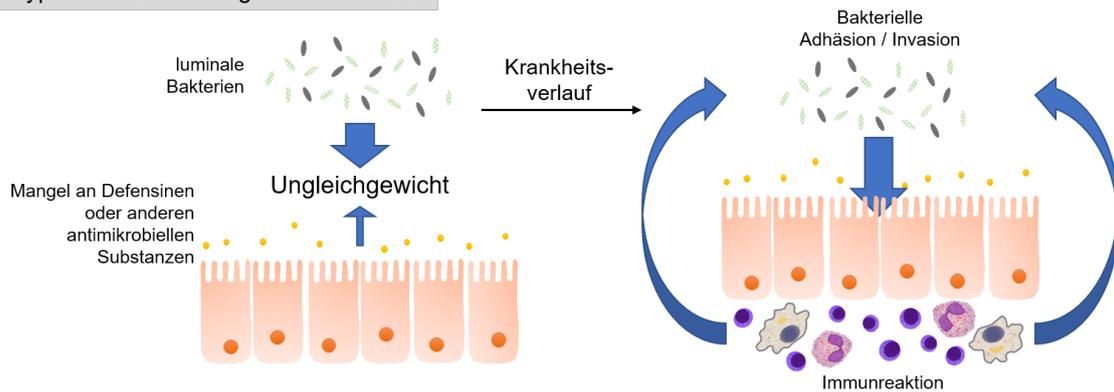
Patienten mit CED ist geringer und bestimmte Bakterienstämme wie Clostridien und Bifidobakterien kommen weniger vor, wohingegen andere – u. a. Fusobakterien und Enterobakterien – erhöht sind (Lepage *et al*, 2011; Gevers *et al*, 2014; Kostic *et al*, 2014). Dazu passend ist eine häufige Antibiotika-Einnahme in der Kindheit und Jugend mit der Entwicklung von CED assoziiert (Kronman *et al*, 2012). Eine Alteration des Mikrobioms könnte sowohl die Entstehung von CED begünstigen als auch durch die Erkrankung selbst bedingt sein. Darüber hinaus könnte eine gestörte Toleranz der nicht-pathogenen Darmflora, z. B. durch *toll like receptors*, eine überschießende Immunantwort auslösen, welche auch das erworbene Immunsystem miteinschließt (Cario, 2003).

Die genaue Ätiologie der Erkrankungen ist jedoch weiterhin unklar. Die mittlerweile in den Fokus gerückte Hypothese zur Krankheitsentstehung ist eine gestörte Darmbarriere. Im Darm besteht ein ständiges Gleichgewicht zwischen den ihn besiedelnden Mikroorganismen und der körpereigenen Abwehr (Abbildung 1). Um das Wachstum der Mikrobiota zu kontrollieren und die intestinale Barriere aufrechtzuerhalten, bedient sich der Körper verschiedener Mechanismen, u. a. der Produktion von Mukus und von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) wie Defensinen (Näheres dazu in 1.1.3). In CED ist die Sekretion von AMPs vermindert und die Mukusproduktion eingeschränkt (Wehkamp *et al*, 2005, 2008; Strugala *et al*, 2008), wodurch es zu vermehrtem Kontakt und Invasion der Bakterien in die Darmschleimhaut kommt. Bei Patienten mit CED findet sich in der Mukosa eine deutlich höhere Konzentration an Bakterien als in Kontrollen (Schultz *et al*, 1999; Swidsinski *et al*, 2002). Dadurch wird eine Immunantwort getriggert, welche eine Entzündungsreaktion hervorruft, die wiederum chronifizieren kann. Ursächlich ist damit eine Barriestörung, welche zu einer unspezifischen und spezifischen Immunantwort auf bakterielle Bestandteile führt (Wehkamp *et al*, 2005, 2008; Ostaff *et al*, 2013). Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass keimfrei gehaltene Mäuse trotz starker genetischer Prädisposition keine Entzündung im GI-Trakt entwickeln. Erst bei Exposition gegenüber Bakterien bildet sich eine Entzündung aus (Kang *et al*, 2008; Schaubeck *et al*, 2016). Zudem kann durch Antibiotikagabe bei Patienten mit CED Remission induziert und bei CD auch erhalten werden (Khan *et al*, 2011).

gesunder Darm



Hypothese zur Pathogenese von CED



**Abbildung 1: Hypothese zur Pathogenese von CED**

Im Darm herrscht ein ständiges Gleichgewicht zwischen den Mikroorganismen im Darmlumen und der körpereigenen Abwehr. Um das Bakterienwachstum zu kontrollieren, werden verschiedene antimikrobielle Substanzen, wie Defensine, produziert und eine Schleimschicht, der Mukus, gebildet. Sind diese Abwehrmechanismen gestört, wie z. B. durch einen Defensinmangel, kommt es zur Adhäsion der Bakterien an das Darmepithel und zur Einwanderung. Dadurch wird eine Immunreaktion ausgelöst und es kommt zur Entzündung. Abbildung modifiziert nach Wehkamp *et al*, 2008, und Wehkamp & Stange, 2016.

MC und CU haben sehr viele Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich jedoch auch in einigen wichtigen Merkmalen. Im Folgenden wird auf die spezifischen Charakteristika der einzelnen Krankheiten und die jeweiligen Veränderungen in der intestinalen Barriere gesondert eingegangen.

**1.2.1 Morbus Crohn (MC)**

Der MC kann grundsätzlich den gesamten Gastrointestinal-Trakt befallen. Mit jeweils ca. 70 % sind das terminale Ileum und das Colon (insbesondere der rechte Teil) am häufigsten betroffen (Farmer *et al*, 1975). Aber auch obere Anteile des GI-Traktes wie der Mund, die Speiseröhre und der Magen können entzündet sein. Der Befall ist dabei diskontinuierlich verteilt und kann alle Wandschichten betreffen. Die Lokalisation des

MC kann nach der Wien-Klassifikation folgendermaßen eingeteilt werden: L1: Ileum, L2: Colon, L3: Ileum / Colon, L4: oberer GI-Trakt (Gasche *et al*, 2000).

Genauere Untersuchungen zum Pathomechanismus des MC sowie die Beobachtung, dass die Lokalisation des MC über die Zeit relativ konstant bleibt, legen nahe, dass der MC im Dünndarm und der MC im Dickdarm eigene Krankheiten mit unterschiedlicher Ätiologie darstellen (Louis *et al*, 2001; Ostaff *et al*, 2013). Im MC des Dünndarms ist die Sekretion der beiden humanen  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 vermindert (Simms *et al*, 2008). Beide Defensine werden ausschließlich von den Paneth-Körnerzellen, welche in den Krypten des Dünndarms lokalisiert sind, synthetisiert, sodass als Ursache dieser Erkrankung ein Funktionsdefekt der Paneth-Zellen nahe liegt (Wehkamp & Stange, 2010; Courth *et al*, 2015). Zudem betreffen verschiedene genetische Defekte, welche mit ilealem MC assoziiert sind, die Funktion der Paneth-Zelle, u. a. Mutationen im NOD2-Rezeptor (Wehkamp *et al*, 2004b) oder im Autophagie-Gen ATG16L1 (Cadwell *et al*, 2008). Bei MC im Dickdarm dagegen ist die Synthese der humanen  $\beta$ -Defensine hBD2 und hBD3, welche von den Epithelzellen gebildet werden, sowie des Cathelicidins LL-37 gestört (Wehkamp *et al*, 2002, 2003; Schaubert *et al*, 2006). Zudem zeigt Gewebe aus dem Colon von Patienten mit MC eine deutlich geringere antibakterielle Wirkung als Colongewebe von Patienten mit CU oder Kontrollpersonen (Nuding *et al*, 2007).

### 1.2.2 Colitis ulcerosa (CU)

Die CU beschränkt sich normalerweise auf das Colon. Nur bei wenigen Patienten ist auch das terminale Ileum in Form der sog. *backwash*-Ileitis mitbetroffen. Die Entzündung beginnt dabei im Rectum und schreitet kontinuierlich noch oral fort. In etwa 20 - 40 % der Fälle sind schließlich das gesamte Rectum und Colon in Form einer Pankolitis befallen (Farmer *et al*, 1993; Bresci *et al*, 1997). Im Gegensatz zu MC ist nur die oberste Darmschicht, die *Tunica mucosa*, betroffen (Hartmann & Tannapfel, 2016; Brüning & Homann, 2018).

Bei der CU steht die mangelhafte Produktion von Mukus im Vordergrund. Bei den Patienten ist die Mukusschicht insgesamt dünner oder über entzündeten Arealen gar nicht ausgebildet und die Anzahl der Becherzellen ist verringert (Pullan *et al*, 1994; Strugala *et al*, 2008). Mäuse, welche einen wichtige Bestandteil des Mukus (das Muzin

Muc2) nicht produzieren können, entwickeln eine spontane Colitis und weisen ähnliche Veränderungen an der Mukosa auf wie Patienten mit CU (Wenzel *et al*, 2014). Die Synthese von AMPs scheint dagegen nicht beeinträchtigt, sondern durch die Entzündung sogar gesteigert zu sein (Wehkamp *et al*, 2003; Schaubert *et al*, 2006).

### 1.2.3 Therapie

Zur Behandlung CED stehen verschiedene Medikamente sowie chirurgische Maßnahmen zur Verfügung. Therapeutische Aspekte sind sowohl die Behandlung des akuten Schubs als auch die Verhinderung von Rückfällen (Remissionserhaltung). Zum Einsatz kommen u. a. 5-Aminosalicylsäure-Präparate, Glukokortikoide, Immunsuppressiva (z. B. Azathioprin) und Biologika (Antikörper gegen TNF- $\alpha$  und Integrin) (Johannink *et al*, 2016). Diese Medikamente zielen hauptsächlich auf die Suppression des Immunsystems ab und besitzen damit nach Annahme einer ursächlichen Barrierestörung keine kausale Wirkung. Die chirurgische Entfernung des Colons und Rectums stellt die einzige kurative Therapie der CU dar, welche naturgemäß auch mit entsprechenden Nebenwirkungen und Komplikationen einhergeht. MC kann auf diese Weise nicht geheilt werden. (Brüning & Homann, 2018; Herold, 2018)

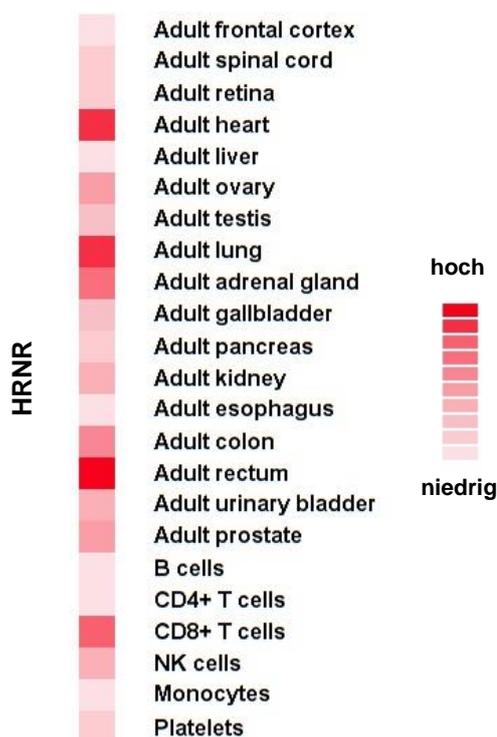
Es existieren mittlerweile jedoch Therapieansätze, welche auf die Stärkung der Darmbarriere abzielen. *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor®) ist ein Probiotikum, welches zur Remissionserhaltung bei CU zugelassen ist und eine gegenüber dem Goldstandard Mesalazin gleichwertige Wirksamkeit zeigte (Kruis *et al*, 2004). Ein möglicher Wirkmechanismus könnte dabei die Induktion von Defensinen, u. a. hBD2, und damit eine Stärkung der intestinalen Barriere sein (Wehkamp *et al*, 2004a; Schlee *et al*, 2007). Weitere probiotische Bakterienstämme, insbesondere verschiedene Lactobacillen und Bifidobakterien, zeigten ebenfalls einen positiven Effekt auf die Remissionsinduktion und den -erhalt bei CU (Shen *et al*, 2014). Auch die orale Gabe von Lecithin, welches den Mukus stabilisieren soll, scheint eine vorteilhafte Wirkung auf CU zu haben (Stremmel *et al*, 2007). Weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit dieser Therapien stehen jedoch noch aus und es besteht großer Bedarf an der Entwicklung neuer Behandlungsoptionen auf diesem Gebiet.

### 1.3 Hornerin (HRNR) – ein Barriere- und Differenzierungsprotein

Das Protein Hornerin (HRNR) wurde erstmals 2001 in der Haut von Mäusen beschrieben, wo eine Rolle des Proteins in der Differenzierung von epidermalen Keratinozyten und des Verhornungsprozesses vermutet wurde (Makino *et al*, 2001). Erst im Jahr 2004 wurde HRNR auch in humanem Hautgewebe beschrieben, zunächst jedoch nur in regenerierender oder von Psoriasis betroffener Haut (Takaishi *et al*, 2005), später dann auch in gesunder Haut (Wu *et al*, 2009).

HRNR ist in der Haut insbesondere in der obersten, verhornten Zellschicht (*Stratum corneum*) aber auch in der darunterliegenden Zellschicht (*Stratum granulosum*) zu finden (Makino *et al*, 2001; Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Makino *et al*, 2014). Im *Stratum granulosum* befindet es sich gemeinsam mit Profilaggrin in den cytoplasmatischen, lichtmikroskopisch sichtbaren Keratohyalin-Granula (Makino *et al*, 2001; Henry *et al*, 2011). In dieser Schicht werden viele für die Verhornung notwendige Substanzen synthetisiert und in die Zellperipherie transportiert. Im *Stratum corneum* dagegen ist HRNR in der Zellperipherie lokalisiert und dort ein Bestandteil des *cornified envelope* (Henry *et al*, 2011). Der *cornified envelope* ist eine etwa 5 - 20 µm dicke Schicht, welche um die Keratinozyten des *Stratum corneums* gebildet wird und nach und nach die Zellmembran der schließlich apoptotischen Zellen ersetzt. Er besteht außenseitig aus einer Lipidschicht und auf der Innenseite aus verschiedenen Proteinen, welche durch Transglutaminasen miteinander vernetzt werden und worin Keratinfilamente verankert sind. Diese verleihen der Hornschicht Form und Stabilität. Dadurch entsteht ein Schutz gegen physikalische und chemische Reize (Kalinin *et al*, 2001; Kyriiotou *et al*, 2012; Lüllmann-Rauch, 2015).

HRNR wurde nicht nur in verhornendem Gewebe nachgewiesen, sondern auch in vielen weiteren Gewebetypen. In der Brust wurde es sowohl im Epithel als auch im Stroma, insbesondere in Fibroblasten, entdeckt und steht dort im Zusammenhang mit Laktation und Involution (Fleming *et al*, 2012). HRNR wurde ebenso im Pancreas (Gutknecht *et al*, 2017), auf der Augenoberfläche und im Tränenapparat beschrieben (Garreis *et al*, 2017) sowie im Rahmen von Proteomanalysen in größerer Menge in der Niere, dem Herz, der Lunge und vielen weiteren Geweben detektiert (Kim *et al*, 2014; Wang *et al*, 2015). Auch im Colon und im Rectum fand sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, viel HRNR.



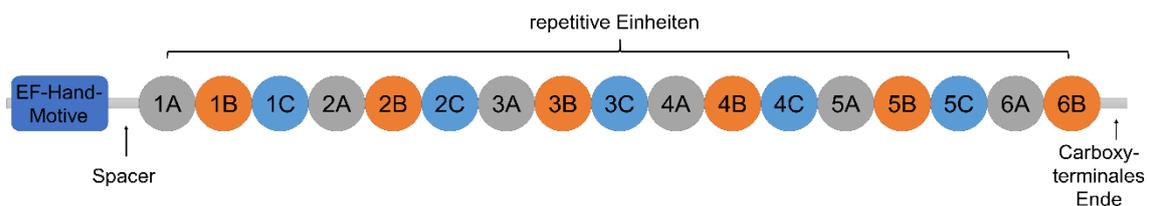
**Abbildung 2: Vorkommen von HRNR in humanem Gewebe**

Die relative Menge von HRNR in verschiedenem humanem Gewebe wurde im Rahmen einer Proteomanalyse bestimmt und farbig dargestellt. Graphik erstellt mit <http://www.humanproteomemap.org/>, (Kim *et al.*, 2014).

HRNR ist auf Chromosom 1q21 im sogenannten epidermalen Differenzierungskomplex lokalisiert (Takaishi *et al.*, 2005). Der epidermale Differenzierungskomplex enthält die kodierenden Sequenzen verschiedener Proteine, welche an der Zelldifferenzierung, der Keratinisierung (Verhornung) der Haut, sowie der Bildung des *cornified envelope* beteiligt sind (Volz *et al.*, 1993; Mischke *et al.*, 1996). Somit sind im epidermalen Differenzierungskomplex Proteine kodiert, welche insbesondere für ihre Funktionen in der Haut bekannt sind und der Bildung und Aufrechterhaltung der Hautbarriere dienen.

Der epidermale Differenzierungskomplex besteht aus drei großen Proteinfamilien: den *cornified envelope precursor* Proteinen, den S100A *Calcium-binding* Proteinen und den S100 *fused-type* Proteinen (SFTP) (Mischke *et al.*, 1996; Kyriou *et al.*, 2012). Dabei besitzen die SFTP sowohl Eigenschaften der S100A *Calcium-binding* Proteine als auch der *cornified envelope precursor* Proteine (Markova *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Krieg *et al.*, 1997; Kyriou *et al.*, 2012). HRNR gehört zu den S100 *fused-type* Proteinen und liegt zwischen Repetin und Profilaggrin, welches schließlich zu Filaggrin prozessiert wird (Ensembl Datenbank, Version 91, Zerbino *et al.*, 2018). Die SFTP bestehen jeweils aus drei Exons, wobei das zweite und das dritte Exon die kodierenden Sequenzen enthalten. Am aminoterminalen Ende stehen zunächst

zwei Calcium-bindende EF-Hand-Motive, welche denen der S100A *Calcium-binding* Proteine sehr ähnlich sind. Darauf folgen eine oder mehrere repetitive Sequenzen und abschließend ein je nach Protein unterschiedliches carboxyterminales Ende (Makino *et al*, 2001; Takaishi *et al*, 2005; Kypriotou *et al*, 2012). HRNR ist dementsprechend aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaut, wobei die Sequenz in drei Abschnitte mit je sechs bzw. fünf Wiederholungen (Takaishi *et al*, 2005) aufgeteilt werden kann (Abbildung 3). Die Sequenzen der repetitiven Einheiten ähneln sich stark und sind zudem sehr serin- und glycinreich (Takaishi *et al*, 2005). In voller Länge besteht HRNR aus 2850 Aminosäuren und besitzt eine prädiktive Masse von 280 kDa (Henry *et al*, 2011; Kypriotou *et al*, 2012). Zudem ist das große Protein anfällig gegenüber Degradierung und liegt häufig in Form von Fragmenten vor (Takaishi *et al*, 2005; Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Fleming *et al*, 2012; Hsu *et al*, 2017; Garreis *et al*, 2017).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau des humanen HRNR**

Aufbau des humanen HRNR: zu Beginn stehen Calcium-bindende EF-Hand-Motive, welche denen der S100A Proteine sehr ähnlich sind, gefolgt von einer Spacer-Sequenz, repetitiven Einheiten und einem carboxyterminalen Ende (Takaishi *et al*, 2005; Wu, 2005). Die dargestellten repetitiven Einheiten können nochmals in vier Abschnitte mit je  $39 \pm 2$  Aminosäuren unterteilt werden.

### 1.3.1 Regulation von HRNR

Einige Experimente geben erste Anhaltspunkte, wie die Expression von HRNR reguliert sein könnte. In sich regenerierender Haut, z. B. während der Wundheilung, ist die HRNR-Expression vorübergehend gesteigert (Takaishi *et al*, 2005; Henry *et al*, 2011; de Koning *et al*, 2012). Zudem wurden sowohl bei einer durch Calcium induzierten Zelldifferenzierung von Keratinozyten (Henry *et al*, 2011; Makino *et al*, 2001; Wu *et al*, 2009) als auch in durch UV-B-Licht zur Hyperproliferation angeregter Haut (Makino *et al*, 2014), erhöhte HRNR-Expressionen gemessen. HRNR konnte außerdem über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor) induziert werden (Sutter *et al*, 2011; van den Bogaard *et al*, 2013; Kennedy *et al*, 2013). Auch der Ah-Rezeptor steht in Zusammenhang mit Zelldifferenzierung (Sutter *et al*, 2011; Kennedy *et al*, 2013; van

den Bogaard *et al*, 2013; Furue *et al*, 2014) und ist zudem bekannt für die Vermittlung von Toxizität (Nebert *et al*, 1993; Wilson & Safe, 1998). Starke Induktoren des Ah-Rezeptors sind sowohl (häufig toxische) Stoffe aus der Umwelt wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine und Flavonoide, als auch endogene Liganden wie Photoprodukte des Tryptophans (Rannug *et al*, 1995; Öberg *et al*, 2005; Nguyen & Bradfield, 2008). Diese Beobachtungen legen nahe, dass HRNR eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und Keratinisierung und damit der Ausbildung der Hautbarriere spielt.

### 1.3.2 Klinische Bedeutung von HRNR

Es wurden bereits mehrfach Zusammenhänge zwischen der HRNR-Expression und verschiedenen Hauterkrankungen beschrieben. Die HRNR-Expression ist in der Haut von Patienten mit Psoriasis (Wu *et al*, 2009), mit atopischer Dermatitis (Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Pellerin *et al*, 2013) und chronischem Handekzem (Molin *et al*, 2015) niedriger als in Kontrollprobanden. Dabei wurden sowohl bei der Psoriasis als auch der atopischen Dermatitis in den betroffenen Hautarealen niedrigere HRNR-Level gemessen als in gesunden Hautbereichen. Allerdings lag die HRNR-Expression in der vermeintlich gesunden Haut immer noch unter derjenigen in Hautproben von Kontrollprobanden. Zusätzlich wurde eine Assoziation zwischen einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im HRNR-Gen und der atopischen Dermatitis gefunden (Esparza-Gordillo *et al*, 2009), welche jedoch zumindest in pädiatrischem Kontext nicht wiederholt gezeigt werden konnte (O'Regan *et al*, 2010). Die aufgeführten Erkrankungen gehen alle mit einer epidermalen Barriestörung einher, welche insbesondere bei der atopischen Dermatitis und dem chronischen Handekzem als ein wesentlicher Teil des Pathomechanismus angesehen wird (Taïeb, 1999; de Cid *et al*, 2009; Guttman-Yassky *et al*, 2011; Di Meglio *et al*, 2014; Molin *et al*, 2015). Auch für andere Vertreter der S100 *fused-type* Proteine, speziell für Filaggrin (Palmer *et al*, 2006; Smith *et al*, 2006; Rodríguez *et al*, 2009), sind Zusammenhänge mit Hauterkrankungen bekannt (Kypriotou *et al*, 2012; Pellerin *et al*, 2013; Molin *et al*, 2015).

Des Weiteren zeigten aus der Haut isolierte HRNR-Fragmente eine antimikrobielle Wirkung gegen die gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und

*Pseudomonas aeruginosa* sowie teilweise gegen den Pilz *Candida albicans* (Wu, 2005; Latendorf, 2015). Darüber hinaus wurden bereits mehrfach Zusammenhänge zwischen der HRNR-Expression und verschiedenen Tumoren beschrieben (Wang *et al*, 2006; Fleming *et al*, 2012; Gutknecht *et al*, 2017; Fu *et al*, 2018). Dabei zeigte HRNR u. a. einen Einfluss auf die Angiogenese und die Zellproliferation in Carcinomen (Gutknecht *et al*, 2017; Fu *et al*, 2018) und scheint im Zusammenhang mit Apoptose-Induktion zu stehen (Fleming *et al*, 2012). Inwiefern HRNR eine pathophysiologische Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben könnte wurde bis dato noch nicht untersucht und ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Nach heutiger Sicht spielt bei der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) eine gestörte Darmbarriere eine essentielle Rolle und es bestehen bisher keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Das Protein Hornerin (HRNR) wurde bisher insbesondere in der Haut untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass Patienten mit Psoriasis, atopischer Dermatitis und chronischem Handekzem in der Haut weniger HRNR exprimieren als gesunde Probanden (Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Pellerin *et al*, 2013; Molin *et al*, 2015). Auch bei diesen Erkrankungen der Haut ist eine Barriestörung ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese. Nach Proteom-Analysen liegt das Protein HRNR auch im Darm vor (Kim *et al*, 2014; Wang *et al*, 2015). Es stellt sich nun die Frage, ob ebenso ein Zusammenhang zwischen HRNR und CED besteht. In dieser Arbeit soll nun die Expression von HRNR im Dün- und Dickdarm im Allgemeinen sowie in Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) untersucht werden. Zudem sollen Faktoren, welche einen Einfluss auf die HRNR-Expression haben könnten, identifiziert und dafür zunächst ein Modell für Regulationsanalysen etabliert werden. Ein wichtiger Bestandteil des Pathomechanismus von CED ist der vermehrte Kontakt von Bakterien mit der Darmschleimhaut. In Patienten mit CED ist die Bakterienanzahl im Mukus deutlich erhöht (Schultsz *et al*, 1999; Swidsinski *et al*, 2002) und in Mäusen entwickelt sich nur unter Anwesenheit von Bakterien eine Entzündung (Kang *et al*, 2008; Schaubeck *et al*, 2016). Deshalb soll insbesondere der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die HRNR-Expression untersucht werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Barrierebildung im Darm sind Antimikrobielle Peptide (AMPs) und es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der verminderten Expression mehrerer AMPs (u. a. hBD2, HD5, HD6, LL-37) und dem Auftreten von MC (Wehkamp *et al*, 2008; Schaubert *et al*, 2006; Wehkamp & Stange, 2010; Ostaff *et al*, 2013). Interessanterweise zeigten in Vorarbeiten aus der Haut isolierte HRNR-Fragmente eine antimikrobielle Aktivität (Wu, 2005; Latendorf, 2015). Das führt zu der Frage, ob HRNR auch im Darm in Fragmenten vorliegt und ob diese ebenso antimikrobielle Eigenschaften besitzen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien, die nicht in der Liste aufgeführt sind, gehören zur Standardlaborausstattung.

#### 2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
16R Megafuge	Thermo Scientific, USA
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad, USA
Dampfgarer	Braun, Deutschland
Elektrophoresekammer	Neolab, Deutschland
ElektrophoresePowerSupply	Peqlab, Deutschland
Heizblock	Neolab, Deutschland
Heracell vios 160i Brutschrank	Thermo Scientific, USA
Intas Science Imaging	Intas Science Imaging, Deutschland
Jenway 7300 Spectrophotometer	Jenway, USA
LightCycler® 480	Roche, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Deutschland
Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, USA
Nanodrop 1000	Peqlab, Deutschland
Oxoid™ AnaeroJar™ 2.5l	Thermo Scientific, USA
Plate reader Synergy HT	Biotek, USA
Slide Scanner SCN400	Leica, Deutschland
Sterilwerkbank Maxisafe 2020	Thermo Scientific, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Wärmeschrank	Witeg, Deutschland
X120 Handheld Homogenizer Drive	Cat Scientific, USA

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
12 well, 24well Zellkulturplatten	Greiner Bio-one, Österreich
4–20 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, 12 well, 20 µl	Bio-Rad, USA
96 well Plate, pp, F-Boden, natur	Greiner Bio-one, Österreich
Collection Tubes	Qiagen, Deutschland
Columbia Agar Platten mit 5 % Schafblut	Becton Dickinson, USA

Küvetten	Sarstedt, Deutschland
Multiwell Plate 96, weiß für Light Cycler® 480	Sarstedt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Roth, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membrane: Amersham	GE Healthcare Life Science, USA
Protran 0,45 NC	
PCR-Strips	Roth, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-one, Österreich
Thermo Scientific™ Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 l-Beutel	Thermo Scientific, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Deutschland

## 2.1.3 Chemikalien, Antikörper und Kits

### 2.1.3.1 Chemikalien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, USA
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
Agarose NEEO	Roth, Deutschland
Albumin Fraktion V	Roth, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Bacto™ Tryptic Soy Broth	Becton Dickinson, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad, USA
Dampfgarpuffer pH6 / pH9	Dako, Dänemark
Difco™ Luria Bertani Broth	Becton Dickinson, USA
Dimethyl Sulfoxide	Sigma-Aldrich, USA
DMEM (hoher Glukosegehalt)	Lonza, Schweiz
DMEM (hoher Glukosegehalt, HEPES)	Life Technologies, USA
DMEM (hoher Glukosegehalt, HEPES, ohne Phenolrot)	Life Technologies, USA
DMEM (hoher Glukosegehalt, HEPES, ohne Phenolrot, ohne L-Tryptophan (Sonderanfertigung))	Biowest, Frankreich
EDTA	Roth, Deutschland
Endogene Peroxidase Blockinglösung	Dako, Dänemark
Ethanol 99 %	VWR, USA
Ethidiumbromid Lösung 0,025 %	Roth, Deutschland
fetal calf serum	Biochrom, Deutschland
Gentamicin / Amphotericin	Life Technologies, USA
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II, 25 %	Merck, Deutschland
Lipopolysaccharide von E. coli Serotyp O111:B4	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Tryptophan, Cellpure®	Roth, Deutschland
Milchpulver	Roth, Deutschland

MS-275 (Entinostat)	Selleckchem, USA
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumpyruvat (100 nM)	Life Technologies, USA
NEBuffer™ 2	New England Biolabs, USA
Neo-Clear®	Merck, Deutschland
Neo-Mount®	Merck, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	Life Technologies, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Deutschland
Passive Lysis Buffer	Promega, USA
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Life Technologies, USA
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific, USA
RNA <sup>later</sup> RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Deutschland
Saccharose	Roth, Deutschland
SAHA (Vorinostat)	InvivoGen, USA
SDS / Natriumlaurylsulfat ≥ 95 %	Roth, Deutschland
Sorbitol	Fisher Scientific, Deutschland
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, USA
TRIS Hydrochlorid, PUFFERAN® ≥ 99 %, p.a.	Roth, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trizma® base	Sigma-Aldrich, USA
TRIzol® Reagenz	Thermo Fischer Scientific, USA
Trypsin-EDTA	Roth, Deutschland
Tween 20	Merck, Deutschland
X-Gal	Roth, Deutschland
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, USA

### 2.1.3.2 Enzyme, Antikörper und Kits

<b>Enzym, Antikörper, Antigen, Kit</b>	<b>Hersteller</b>
AMV Reverse Transkriptase Kit	Promega, USA
Anti-HRNR	Atlas Antibodies, Schweden
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Deutschland
Dako REAL EnVision DetectionSystem	Dako, Dänemark
Direct-zol™ RNA Miniprep	Zymo-Research, Deutschland
dNTP Mix, PCR Grade	Qiagen, Deutschland
EcoRI-HF® Restriktionsenzym	New England Biolabs, USA
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam, Großbritannien
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam, Großbritannien
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Deutschland
PrEST Antigen HRNR	Atlas Antibodies, Schweden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland

QIAquick PCR Purification Kit  
 Quick-RNA™ Miniprep  
 Topo® TA Cloning® Kit

Qiagen, Deutschland  
 Zymo-Research, Deutschland  
 Thermo Fischer Scientific, USA

## 2.1.4 Medien und Puffer

### 2.1.4.1 Zellkultur

<u>Medium für CaCo2, LS174T, HCT116, 18Co, CoN</u>	
DMEM (hoher Glukosegehalt, HEPES)	435 ml
FCS	50 ml
Na-Pyruvat	5 ml
Pen/Strep	5 ml
NEAS	5 ml

<u>Medium für TR146</u>	
DMEM (hoher Glukosegehalt)	450 ml
FCS	50 ml
Gentamicin	0,5 ml

<u>Medium für Biopsien</u>	
DMEM (hoher Glukosegehalt, HEPES)	430 ml
FCS	50 ml
Na-Pyruvat	5 ml
Pen/Strep	10 ml
NEAS	5 ml

### 2.1.4.2 Bakterienanzucht

<u>TSB Medium</u>	
Bacto™ Tryptic Soy Broth	30 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

<u>LB Medium</u>	
Difco™ Luria Bertani Broth	25 g
H <sub>2</sub> O	ad 250 ml

### 2.1.4.3 Sonstige Lösungen

<u>PBS (10x)</u>	
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

<u>TAE (50x)</u>	
TRIS-HCl	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

<u>0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)</u>	
TRIS	30 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
mit HCl auf pH 6,8 einstellen	

<u>100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4)</u>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	47,5 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	202,5 ml
H <sub>2</sub> O	250 ml

<u>200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,6 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

<u>200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></u>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35,6 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

<u>Agarose-Gel (1 % bzw. 1,5 %)</u>	
Agarose	1 g bzw. 1,5 g
TAE	ad 100 ml
Ethidiumbromid	3 Tropfen
aufkochen und auf 50 °C abkühlen	

<u>Bromphenolblau/Xylencyanol-Laufpuffer</u>	
Bromphenolblau oder Xylencyanol	0,25 g
Saccharose	40 g
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml

<u>Lysepuffer (1x)</u>	
TRIS – HCl	3,94 g
NaCl	7,3 g
Triton-X-100	500 µl
EDTA	0,73 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
1 Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (PIC) pro 25ml Puffer	

<u>SDS-Puffer (2x)</u>	
0,5M TRIS (pH 6,8)	2,5 ml
Glycerol	2 ml
10% (w/v) SDS	4 ml
0,1% Bromphenolblau	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

<u>Elektrophoresepuffer (5x)</u>	
TRIS	15 g
Glycin	72 g
10% (w/v) SDS	50 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

<u>Transferpuffer (1x)</u>	
TRIS	15,2 g
Glycin	72 g
Methanol	500 ml
10% (w/v) SDS	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 5 l

<u>TBS (10x) (pH 7,4)</u>	
NaCl	400 g
KCl	10 g
Tris	150 g
H <sub>2</sub> O	ad 5 l

<u>TBS-T (1x)</u>	
10 x TBS	500 ml
50 % Tween	10 ml
H <sub>2</sub> O	ad 5 l

<u>Underlay Gel (nährstoffarm)</u>	
EEO-Agarose	0,1 g
100 mM Natriumphosphatpuffer	1 ml
flüssiges TSB-Medium	0,1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
mit HCl auf pH 7,4 einstellen	

<u>Overlay Gel (nährstoffreich)</u>	
EEO-Agarose	0,1 g
100 mM Natriumphosphatpuffer	1 ml
Bacto™ Tryptic Soy Broth	0,6 g
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
mit HCl auf pH 7,4 einstellen	

### 2.1.5 Peptide

Alle in dieser Arbeit genutzten Peptide wurden von EMC microcollections (Tübingen, Deutschland) bezogen. Sie wurden synthetisch hergestellt, mittels Präzipitation aufgereinigt und weisen eine Reinheit von  $\geq 90\%$  auf. Die Peptide wurden in 0,01 % Essigsäure gelöst und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide**

Abschnitt aus dem Vollängenprotein	Sequenz	Abkürzung
Hornerin (HRNR)		
AS 1038-1053 AS 1978-1993 AS 2448-2463	GPYESGSGHSSGLGHR	A
AS 1443-1461 AS 2383-2401	HGSSSGSSSYQHGSGSR	B
AS 1268-1277 AS 1738-1747 AS 2208-2217 AS 2678-2687	SSSRGPYESR	C
AS 554-567	QSSSYGPHGYGSGR	D
AS 897-908	GSGSGQSPSYGR	E
AS 1689-1697 AS 2159-2167	YGQHGSGSR	F

### 2.1.6 Primer-Sequenzen

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von Biomers.net, Deutschland, synthetisiert und sind HPSF (high purity salt free) aufgereinigt. Die lyophilisierten Oligonucleotide wurden in nuklease-freiem Wasser gelöst und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer**

Zielgen	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
human		
HRNR	CAA GTT GGA GTG CAG GAG AGA	AGT CGG AGT TTT GCT CAC CA
$\beta$ -Aktin	GCC AAC CGC GAG AAG ATG A	CAT CAC GAT GCC AGT GGT A

## 2.1.7 Bakterien, Zelllinien und Mäuse

### 2.1.7.1 Bakterien

**Tabelle 3: verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Charakteristik	Quelle
Bacteroides vulgatus (DSM 1447)	Referenzstamm	DSMZ
Bifidobacterium adolescentis Ni3, 29c	Klinisches Isolat	RBK
Bifidobacterium breve PZ1343	Klinisches Isolat	RBK
Corynebacterium amycolatum	Referenzstamm	DSMZ
Escherichia coli MC1000	Referenzstamm	UCL
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (Serotyp: O6:K5:H1)	Referenzstamm	IMIB
Lactobacillus fermentum PZ 1186	Klinisches Isolat	RBK
Lactobacillus johnsonii PZ1112	Klinisches Isolat	RBK
Propionibacterium acnes (DSM 1897)	Referenzstamm	DSMZ
SIHUMI ( <i>simplified human intestinal microbiota</i> )	Enthält folgende Bakterien: Anaerostipes caccae, Bacteroides thetaiotaomicron, Bifidobacterium longum, Blautia producta, Clostridium ramosum, Escherichia coli, Lactobacillus plantarum	bereitgestellt von GAMI, DIfE (Becker <i>et al</i> , 2011)
Staphylococcus epidermidis Evans 1916	Referenzstamm	DSMZ

DIfE: Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, Abteilung für gastrointestinale Mikrobiologie (GAMI), Nuthetal, Deutschland

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Deutschland

IMIB: Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg, Deutschland

RBK: Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland

UCL: De Duve Institute, Université catholique de Louvain (UCL), Brüssel, Belgien

### 2.1.7.2 Zelllinien

Für die meisten Zellkulturexperimente wurde die humane Zelllinie LS 174T verwendet. Diese epithelialen Zellen entstammen einem kolorektalen Adenokarzinom (Duke-Stadium B) einer 58-jährigen Kaukasierin. Sie erscheinen becherzellähnlich und produzieren Muzine (van Klinken *et al*, 1996). Die Zellen wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) erworben. Außerdem wurden

humane Zellen der Linie HCT116 benutzt. Diese sind ebenfalls epitheliale kolorektale Karzinomzellen, welche von einem männlichen Spender stammen und u. a. Keratin synthetisieren. Die Zelllinie CaCo-2 entstammt einem kolorektalen Adenokarzinom eines männlichen 72-jährigen Kaukasiers, besitzt ähnliche Eigenschaften wie Enterozyten und produziert ebenfalls Muzine (van Klinken *et al*, 1996). In dieser Arbeit wurde mit dem Klon TC7 gearbeitet. Diese beiden Zelllinien wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Deutschland) bezogen. Weitere Zelllinien, CCD-18Co (ATCC® – CRL 1459™) und CCD 841 CoN (ATCC® CRL-1790™), wurden uns von Prof. Lauer und Prof. Bitzer (Universitätsklinikum Tübingen) überlassen, welche ursprünglich von DSMZ bezogen wurden. Bei der Linie CCD-18Co handelt es sich um Fibroblasten eines 2,5 Monate alten Kindes. CCD 841 CoN sind epitheliale Vorläuferzellen eines 21 Wochen alten Fetus.

### **2.1.8 Patienten**

Im Rahmen einer Studie seit 2001 am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, sowie am Universitätsklinikum Tübingen wurden verschiedene Patientengewebeproben entnommen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Tübingen liegt vor (Nr. 687/2012B01).

Alle Patienten und Kontrollpersonen wurden zuvor über den Vorgang der Probenentnahme, sowie deren mögliche Risiken aufgeklärt und es wurde das schriftliche Einverständnis eingeholt. Die Probenentnahmen erfolgten dann während einer geplanten endoskopischen Untersuchung. Die Diagnosen wurden anhand der gängigen Kriterien gestellt, welche klinische, radiologische, endoskopische und histopathologische Befunde berücksichtigen. Patienten mit Morbus Crohn wurden anhand des Befallsmusters der Darmabschnitte nach der Wien-Klassifikation weiter unterteilt (L1: nur Ileum; L2: nur Colon; L3: Ileum und Colon betroffen). Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs ist in Tabelle 4 angegeben.

**Tabelle 4: Patientenkollektiv**

<b>Biopsien aus dem Ileum</b>				
Kontrollen n = 32	Morbus Crohn n = 92		Colitis ulcerosa n = 49	
	entzündet n = 45	nicht entzündet n = 47	entzündet n = 2	nicht entzündet n = 47

<b>Biopsien aus Colon und Rectum</b>				
Kontrollen n = 56	Morbus Crohn n = 104		Colitis ulcerosa n = 77	
	entzündet n = 33	nicht entzündet n = 71	entzündet n = 24	nicht entzündet n = 53

### 2.1.9 Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
ExPASy – PeptideMass	Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz
Geneious 8.0	Biomatter Ltd., New Zealand
GraphPad Prism Version 6.07	GraphPad Software Inc., USA
Image Lab Software Version 5.1	Bio-Rad, USA
Light Cycler Software release 1.5.0	Roche, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden in der Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zellanzucht

Die in 10 % DMSO gefrorenen Zellen wurden zunächst aufgetaut und in Zellkulturmedium überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden sie 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in ZK-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> überführt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Sie wurden 2x pro Woche bei einer Konfluenz von ca. 70 – 80 % gesplittet. Zur Vermehrung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mithilfe von Trypsin (3 ml, 5 min bei 37 °C) vom Flaschenboden gelöst. Die Reaktion wurde mit ZK-Medium gestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun wieder in Medium aufgenommen und verdünnt in neue ZK-Flaschen überführt. Die Zellen wurden höchstens bis zu einer Passage von 40 verwendet. Alle hier verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Na-Pyruvat, 1 % NEAS und 1 % Pen/Strep kultiviert.

#### 2.2.1.2 Stimulationsversuche

Die Zellen wurden 30 h bzw. 24 h vor Stimulationsbeginn ausgesät. Pro Well wurden 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 500 µl Medium in eine 24-Well-Platte (Zelllinie LS174T) bzw. 1,25 x 10<sup>5</sup> Zellen in 1 ml Medium in eine 12-Well-Platte (Zelllinie HCT116) eingesetzt. Dazu wurden sie zunächst mit Trypanblau angefärbt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Vor der Stimulation wurden die Zellen mit 500 µl / Well PBS gewaschen. Die Stimulanzien wurden in Zellkulturmedium in der entsprechenden Konzentration vorbereitet (siehe Tabelle 5) und anschließend 1 ml / Well (HCT116) bzw. 500 µl / Well (LS174T) auf die Zellen gegeben. Es wurde für 3 h, 7 h, 18 h oder 48 h behandelt. Bei einer Stimulation von 48 h erfolgte nach 24 h ein Mediumwechsel. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen wiederum mit

500  $\mu$ l / Well PBS gewaschen und anschließend wie in 2.2.2.2 beschrieben die RNA isoliert.

Für die Stimulation der Zelllinie HCT116 wurde als ZK-Medium DMEM mit Phenolrot (Life Technologies, USA) mit 1 % Na-Pyruvat und 1 % NEAS benutzt. Für die Zelllinie LS174T kam für die Aussaat sowie die Stimulation DMEM ohne Phenolrot (Life Technologies, USA) mit 10 % FCS, 1 % Na-Pyruvat und 1 % NEAS zum Einsatz. Die Zellkulturexperimente mit dieser Linie erfolgten unter möglichst großem Ausschluss von Licht. Um den Einfluss von Photoprodukten des L-Tryptophans zu untersuchen, wurde ZK-Medium für 30 min, 1 h oder 2 h mit UV-C-Licht (Wellenlänge 254 nm, 60 W) bestrahlt (Thermo Scientific, USA). Es wurde außerdem tryptophanfreies ZK-Medium (Biowest, Frankreich) benutzt, welchem L-Tryptophan Cellpure® (Roth, Deutschland) nachträglich hinzugefügt wurde. Dadurch sollten Photoprodukte des Tryptophans im ZK-Medium möglichst ausgeschlossen werden. Die Stimulation wurde jeweils mindestens 3-mal wiederholt und der Durchschnitt  $\pm$  SEM angegeben.

**Tabelle 5: Stimulanzen in der Zellkultur**

Stimulationsmedium	eingesetzte Menge
Mikrobiologie	
<i>E. coli</i> Nissle 1917	OD = 0,3
SIHUMI	OD = 0,3
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E. coli</i>	1 $\mu$ g / ml
HDAC-Inhibitoren	
SAHA (Vorinostat)	5 $\mu$ M
MS-275 (Entinostat)	2 $\mu$ M
Natriumbutyrat	3 mM

### 2.2.1.3 Kultivierung von Biopsien

Die frischen Biopsien wurden zunächst 2-3-mal mit kaltem PBS und 10 % Pen/Strep gewaschen und dann für 2 h in je 1 ml DMEM mit 10 % FCS, 1 % Na-Pyruvat, 1 % NEAS und 2 % Pen/Strep in einer 24-Well-Platte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Behandlung mit HDAC-Inhibitoren (siehe Tabelle 5) wurden die jeweiligen Inhibitoren direkt nach dem Waschvorgang zu den Biopsien gegeben. Anschließend

erfolgte für 18 h die Stimulation mit Zellkulturmedium und *E. coli* Nissle 1917. Dazu wurde die Suspension abgetöteter Bakterien in Zellkulturmedium auf eine OD von 0,3 eingestellt und 1 ml/Well auf die Biopsien gegeben. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden die Biopsien in je 250 µl RNAlater (Qiagen, Deutschland) zunächst über Nacht bei 8 °C gelagert und dann bei -20 °C eingefroren. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem Kit Direct-zol® RNA Miniprep (Zymo-Research, Deutschland) (siehe 2.2.2.2). Manche Biopsien wurden nativ in RNAlater gegeben und wie oben beschrieben die RNA isoliert. Angegeben ist der Durchschnittswert ± SEM.

## 2.2.2 Molekularbiologie

### 2.2.2.1 Aufarbeitung der Biopsien

Die gewonnenen Biopsien wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -196 °C gelagert. Zur RNA-Isolation wurden sie dann in Reaktionsgefäße überführt und in möglichst kalter Umgebung (mithilfe von flüssigem Stickstoff) mit einer Pistille geknackt und zu feinem Pulver zermahlen. Anschließend wurden pro Biopsie 500 µl TRIzol® Reagenz (Thermo Fisher, USA) hinzugegeben, um die DNA und die Proteine zu lösen und Letztere zu denaturieren. Anschließend wurde mit der RNA-Isolation fortgefahren.

### 2.2.2.2 RNA-Isolation

#### Biopsien

Die RNA-Isolation aus den Biopsien erfolgte nach dem Protokoll des Kits Direct-zol® RNA Miniprep (Zymo-Research, Deutschland). Zu den in TRIzol® Reagenz (Thermo Fisher, USA) gelösten Biopsien wurden 500 µl 99%iges Ethanol (VWR, USA) hinzugefügt und durch vortexen gut gemischt. Diese Mischung wurde anschließend auf eine Zymo-Spin® IIC Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die RNA an die Silikamembran zu binden. Daraufhin wurde zweimal mit 400 µl Direct-zol® RNA PreWash sowie mit 700 µl RNA Wash Buffer gewaschen und zwischen den Schritten jeweils 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurden weitere 2 min zentrifugiert, um restliche Flüssigkeit vollständig zu entfernen. Nun wurden jeweils

30 µl DNase/RNase freies Wasser zugegeben und 1 min zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **Zellkultur**

Auf die mit PBS gewaschenen Zellen wurden 150 µl / well RNA Lysis Buffer aus dem Kit Quick-RNA® MiniPrep (Zymo-Research, Deutschland) gegeben. Die Lösung aus jeweils drei Well wurde gepoolt, in einen Spin-Away™ Filter überführt und 1 min mit 13.000 rpm zentrifugiert, wodurch genomische DNA herausgefiltert wurde. Zum Durchfluss wurden nun 450 µl 99%iges Ethanol (VWR, USA) hinzugefügt, diese Mischung auf eine Zymo-Spin™ IICG Säule gegeben und 30 s zentrifugiert. Dadurch bindet die RNA an eine Silikamembran. Nun wurde die RNA in mehreren Schritten mit 400 µl RNA Prep Buffer, sowie anschließend zweifach mit RNA Wash Buffer (700 µl und 400 µl) gewaschen und jeweils zwischen den einzelnen Schritten für 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung der Flüssigkeit wurden zum Schluss 2 min zentrifugiert. Daraufhin wurde die RNA in 30 µl DNase/RNase freiem Wasser eluiert und dafür 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.2.3 Analyse der RNA**

Die RNA wurde quantitativ und qualitativ im NanoDrop 1000 untersucht. Das Spektrophotometer misst die Absorption von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm. Verunreinigungen in der Probe, insbesondere durch Protein oder Phenol, absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von etwa 280 nm. In einer reinen Probe sollte das Verhältnis 260 nm / 280 nm bei ca. 2,0 liegen. Außerdem wurde die RNA-Konzentration bestimmt.

#### **2.2.2.4 Reverse Transkription**

Da die quantitative Echtzeit-PCR DNA als Substrat benötigt, wurde die RNA mittels reverser Transkription zunächst in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben.

## Biopsien

Die Biopsie-Proben wurden mithilfe des AMV Reverse Transkription Systems (Promega, USA) umgeschrieben. Pro Probe wurden 500 ng RNA eingesetzt und das Volumen dann mit Nuklease-freiem Wasser auf 10,625  $\mu$ l aufgefüllt. Alle weiteren für die reverse Transkription nötigen Komponenten wurden gemischt (Mastermix, siehe Tabelle 6) und nach dem ersten Inkubationsschritt hinzugegeben. Um nur die mRNA zu amplifizieren wurden Oligo-dT Primer benutzt, welche an den Poly(A)-Schwanz binden. Die Lösung wurde nun wie in Tabelle 7 beschrieben im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde mit 30  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, um eine Endkonzentration von 10 ng /  $\mu$ l RNA zu erreichen.

In Fällen zu geringer RNA-Konzentration wurden nur 250 ng RNA eingesetzt und die Mengen des Mastermixes wie in Tabelle 6 beschrieben angepasst. In diesem Fall musste zum Schluss kein Wasser mehr zugegeben werden. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermixes im AMV Reverse Transkription System (Promega, USA)**

Komponente	Mastermix beim Einsatz von 500 ng RNA	Mastermix beim Einsatz von 250 ng RNA
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l	5 $\mu$ l
AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l
10mM dNTP Mix	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Oligo(dT)	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
AMV RT	0,375 $\mu$ l	0,375 $\mu$ l
Gesamtvolumen	9,375 $\mu$ l	14,375 $\mu$ l

## Zellkultur

Für RNA aus der Zellkultur wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA) benutzt. Pro Probe wurden 500 ng RNA (bzw. 200 ng bei zu geringer RNA-Konzentration) eingesetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 15  $\mu$ l aufgefüllt. Dann wurden zusätzlich jeweils 1  $\mu$ l *iScript reverse transcriptase* und 4  $\mu$ l *iScript reaction mix* zugegeben. Das Gemisch wurde im Thermocycler wie in Tabelle 7 beschrieben inkubiert. Anschließend wurde mit 30  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, sodass

wiederum in jeder Probe 10 ng /  $\mu$ l RNA vorhanden sind. Wurden nur 200 ng RNA eingesetzt, so wurde auch hier nicht mehr mit Wasser aufgefüllt. Die cDNA wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 7: Thermocycler-Programme zur Reversen Transkription**

<b>AMV Reverse Transkription System (Promega, USA)</b>		<b>iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA)</b>	
Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
70 °C	10 min	25 °C	5 min
12 °C	$\infty$	42 °C	30 min
Mastermix dazugeben		85 °C	5 min
42 °C	15 min	4 °C	$\infty$
95 °C	5 min		
12 °C	$\infty$		

$\infty$  : Diese Temperatur wird so lange beibehalten, bis der Mastermix hinzugefügt oder die DNA entnommen wird.

### 2.2.2.5 Klonierung und Primerdesign

Für eine absolute Quantifizierung bestimmter DNA-Sequenzen benötigen die meisten Methoden eine Vergleichsprobe. Dafür wurden Plasmide hergestellt, welche die gesuchte Sequenz enthalten. Mithilfe des Programms „Primer-Blast“ des NCBI und der Software „Geneious“ wurden zunächst passende Primer etabliert. Um eine Amplifizierung genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer dabei so gewählt, dass sie über die Grenze zweier Exons hinweg reichen. Die Primersequenzen enthalten 19 bis 24 Basenpaare und die Produktgrößen liegen zwischen 90 und 170 Basenpaaren. Die Spezifität der Primer wurde anschließend nochmals in „Primer-Blast“ überprüft. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer finden sich in Tabelle 2.

Mit diesen Primern und einer cDNA-Probe wurde nun eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dafür wurde die HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Deutschland) benutzt. Die Taq Polymerase produziert TA-Überhänge, welche zur anschließenden Ligation mit dem Vektor nötig sind, da dieser ebenfalls Überhänge von Thymidin und Adenin besitzt. Für den PCR-Ansatz wurde jeweils ein Mastermix verwendet (Tabelle 8). Für die PCR wurde ein Programm benutzt, welches in Tabelle 9 aufgelistet ist. Dabei sind die ersten 15 Minuten Inkubationszeit für die Aktivierung der

HotStarTaq Polymerase notwendig. Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Anschließend folgte die Aufreinigung des PCR-Produkts mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Deutschland). Dazu wurden jeweils 5 Teile PB Puffer mit einem Teil des PCR-Produkts gemischt, auf eine QIAquick Säule gegeben und 60 s mit 13.000 rpm zentrifugiert, um die DNA binden. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 750  $\mu$ l PE Puffer und 60 s Zentrifugation, sowie das Eluieren der DNA in 30  $\mu$ l EB Puffer, wobei nach dem Hinzufügen des Puffers 4 min gewartet und dann 60 s zentrifugiert wurde. Dann folgte die Überprüfung der Produktgröße mittels einem 1,5 %igen Agarosegel (Zusammensetzung in 2.1.4.3). Als Ladungspuffer wurden 2  $\mu$ l / Probe Xylencyanol-Probenpuffer benutzt (2.1.4.3). Die Laufzeit betrug 1 h bei 100 V bei RT.

Nach der Aufreinigung und der Überprüfung durch ein Agarosegel wurde das PCR-Produkt mithilfe des TOPO®-TA Cloning Kits (Thermo Fischer Scientific, USA) in den Vektor pCR2.1®-TOPO® TA (Thermo Fischer Scientific, USA) kloniert, indem 4  $\mu$ l mit 1  $\mu$ l der Salzlösung und 1  $\mu$ l des Vektors für 5 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde der Vektor per Hitzeschock in kompetente OneShot® TOP10 *E. coli* (Thermo Fischer Scientific, USA) transformiert. Dazu wurden der Vektor und die Bakterien 20 min auf Eis und anschließend 30 s bei 42 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann auf mit je 50  $\mu$ l X-Gal und 50  $\mu$ l Ampicillin bestrichenen LB-Blatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterienkolonien, welche das Plasmid inklusive der gesuchten DNA-Sequenz enthalten, erscheinen weiß. Einige dieser Kolonien wurden gepickt und in jeweils 5 ml flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C, 110 rpm angezogen. Anschließend wurden die Plasmide aus den Bakterien mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland) isoliert. Dafür wurde das Bakterien-Pellet zunächst in 250  $\mu$ l P1-Puffer resuspendiert, 250  $\mu$ l P2-Puffer hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Dann wurden 350  $\mu$ l N3-Puffer dazugegeben und nach vorsichtigem Mischen 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun auf eine QIAprep Spin Säule gegeben und 60 s zentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit je 750  $\mu$ l PE-Puffer und 1 min Zentrifugation. Zum Abschluss wurde eine weitere Minute zentrifugiert, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Die DNA wurde in 50  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser eluiert und nach 1 min Ruhezeit nochmals 1 min zentrifugiert. Die

Plasmid-DNA-Konzentration wurde im Nanodrop 1000 (Peqlab, Deutschland) bestimmt.

Es folgte ein Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI-HF® (New England Biolabs, USA), indem 1 µl des Enzyms, 2 µl NEBuffer™ 2 (New England Biolabs, USA) und 17 µl H<sub>2</sub>O mit 1 µg DNA für 45 min bei 37 °C inkubiert wurden. Die entstandenen Produkte wurden mit 3 µl pro Probe Bromphenolblau als Ladungspuffer verdünnt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Agarosegel wurde nach 1 h 20 min bei 90 V analysiert. Um die genaue Sequenz des DNA-Inserts zu überprüfen, wurden die Plasmide zusätzlich bei GATC Biotech, Deutschland sequenziert.

**Tabelle 8: Mastermix für die Polymerase-Kettenreaktion**

Komponente	Mastermix für eine Probe
Nuklease-freies Wasser	9 µl
5x Q-Solution	5 µl
10x PCR Buffer	2,5 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl
10mM dNTP Mix	1,25 µl
HotStarTaq	0,25 µl
Primer	jeweils 1 µl
cDNA	4 µl
Gesamtvolumen	25 µl

**Tabelle 9: PCR-Programm im Thermocycler**

Temperatur	Zeit	
95 °C	15 min	
94 °C	1 min	45 Zyklen
50 °C – 68 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

### 2.2.2.6 quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (engl. *Real time quantitative PCR*, qPCR) ermöglicht die gleichzeitige Amplifizierung und Quantifizierung der DNA. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I), welcher an doppelsträngige DNA bindet. Für die Standardkurve wurden Plasmide in verschiedenen Konzentrationen verwendet, deren Herstellung im vorangehenden Kapitel beschrieben ist. Die zugehörigen Primersequenzen befinden sich in Tabelle 2.

Die Analyse der DNA wurden mit dem Gerät LightCycler®480 (Roche, Deutschland) und der zugehörigen Reaktionslösung SYBR Green I Master (Roche, Deutschland) durchgeführt. Diese Mischung enthält den Farbstoff, sowie alle für die PCR notwendigen Komponenten. Der genaue Reaktionsansatz ist in Tabelle 10 aufgelistet. Zu Beginn der PCR erfolgte jeweils ein Denaturierungsschritt, welchem 40 Zyklen der Amplifikation folgten. Zum Abschluss wurde die spezifische Schmelzkurve der jeweiligen PCR-Produkte bestimmt, um deren Spezifität zu überprüfen. Mithilfe der Light Cycler Software wurden zudem nach jedem Lauf die Effizienz und Qualität kontrolliert. Je nach Eigenschaften der zu amplifizierenden Sequenz und der zugehörigen Primer waren unterschiedliche Temperaturen erforderlich. Sie sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 10: Reaktionsansatz für die qPCR im LightCycler®480**

Komponente	Volumen
Nuklease-freies Wasser	3 µl
Primer A	0,5 µl
Primer B	0,5 µl
SYBR Green I Master	5 µl
cDNA (aus 2.2.2.4)	1 µl

**Tabelle 11: qPCR-Programme im LightCycler® 480**

Gen	Denaturierung	Amplifikation	Schmelzkurve
HRNR	96 °C – 5 min	96 °C – 10 s 62 °C – 5 s 72 °C – 10 s	95 °C – 1 s 60 °C – 15 s 95 °C – ∞
β-Aktin	95 °C – 10 min	95 °C – 10 s 60 °C – 5 s 72 °C – 10 s	95 °C – 1 s 65 °C – 15 s 95 °C – ∞

### 2.2.3 Analyse der Proteinexpression

#### 2.2.3.1 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 3 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebettetem Gewebe (aus Resektaten) genutzt. Die Färbung erfolgte mithilfe des Dako REAL EnVision Detection Systems (Dako, Dänemark) und nach dessen Protokoll. Zunächst wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (30 min in Neo-Clear® (Merck, Deutschland), dann 100 %-, 96 %-, 70 %-Alkohol und Reinstwasser (aus Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem, Merck Millipore, Deutschland) je für 2 min) und eine Antigendemaskierung 30 min in *target retrieval* solution bei pH 9 im Dampf durchgeführt. Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde dieser mit dem zugehörigen Antigen blockiert. Dazu wurde der verdünnte Primärantikörper (1:75 in PBS) zunächst mit der 100-fachen Menge des Antigens bei 30 min RT unter gelegentlichem Mischen inkubiert und anschließend 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Mit der Antikörperlösung für die eigentliche Färbung wurde ohne Zugabe des Antigens ebenso verfahren. Der Überstand wurde dann jeweils für die Färbung verwendet. Zwischen den folgenden Behandlungen der Schnitte erfolgten jeweils mehrere Waschschrte mit TBS-T. Die endogene Peroxidase wurde mit Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution geblockt und der Primärantikörper (aus dem Überstand) auf die Schnitte gegeben. Es folgte die Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss wurde mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper 30 min inkubiert und mit DAB für 10 min die Schnitte in einer dunklen und feuchten Kammer entwickelt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin eingefärbt. Mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und im letzten Schritt mit Neo-Clear® wurden die Schnitte wieder entwässert und mit Neo-

Mount® (Merck, Deutschland) eingedeckt. Bei jeder Färbung wurden eine Negativkontrolle (ohne Antikörper) und eine Positivkontrolle mitgeführt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte jeweils durch drei unabhängige Experten. Sie vergaben für die Farbintensität der einzelnen Schnitte einen Wert zwischen 0 und 5 und beurteilt den Intensitätsunterschied zwischen Krypten und Villi bzw. oberem Epithel (-3 = stärkere Färbung in den Krypten, 0 = kein Unterschied, 3 = stärkere Färbung in den Villi bzw. im oberen Epithel).

### **2.2.3.2 Proteinextraktion**

Für die Analyse im Westernblot wurden aus den Proben zunächst die Proteine extrahiert. Dafür wurden Biopsien aus dem Sigma in möglichst kalter Umgebung (mithilfe von flüssigem Stickstoff) mit einer Pistille geknackt und zu feinem Pulver zermahlen. Anschließend wurde jeweils 30 µl Lysepuffer (Zusammensetzung siehe 2.1.4.3) hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurden kleine, in Stickstoff gefrorene Resektatstücke aus der Haut verwendet, welche in 500 µl Lysepuffer gegeben und mit einem Hand-Homogenisator (X120 Handheld Homogenizer Drive, Cat Scientific, USA) zerkleinert wurden. Die Proben inkubierten unter gelegentlichem Vortexen 30 min auf Eis und wurden dann 25 min bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Tests bestimmt. Dafür wurden zu jeweils 800 µl mit Reinstwasser (aus Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem, Merck Millipore, Deutschland) verdünnter Probe 200 µl Dye Reagent (Bio-Rad, USA) gegeben und der Farbumschlag im Photometer (Plate reader Synergy HAT, BioTek, USA) bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Für die Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration wurde zudem eine Standardreihe mit BSA erstellt.

### **2.2.3.3 Proteinnachweis mittels Westernblot**

Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 30 µg Protein mit 8–10 µl SDS-Puffer (2x) (siehe 2.1.4.3) auf 17 µl aufgefüllt, vermischt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen. Das Gel (4–20 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel, Bio-Rad, USA) wurde in die

Laufapparatur eingesetzt, die Kammer mit Elektrophoresepuffer (1x) (siehe 2.1.4.3) gefüllt und eine Spannung von 100 V für 1,5 h angelegt.

Die aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Blotting Membrane: Amersham Protran 0,45 NC, GE Healthcare Life Science, USA) transferiert. Dazu wurde das Gel in Transferpuffer (siehe 2.1.4.3) gewaschen und Filterpapier sowie Schwämme mit diesem getränkt. Auf einen Schwamm wurden nun drei Lagen Filterpapier, das Gel und die Membran geschichtet, welche wiederum mit drei Lagen Filterpapier und einem Schwamm bedeckt wurden. Störende Luftblasen wurden mit einer Walze entfernt. Der Stapel wurde mit einem Eisblock in die Blotting-Kammer eingesetzt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Das Blotten erfolgte dann unter ständigem Rühren bei 40 V und 4 °C über 15 h. Nach dem Blottvorgang wurde die Membran dreimal für mindestens 5 min mit TBST (siehe 2.1.4.3) gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit TBS (siehe 2.1.4.3). Es folgte die Blockierung der freien Proteinbindungsstellen mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T. Als Primärantikörper wurde dann der HRNR-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 (in 1 % Magermilchpulver in TBS-T) eingesetzt. Der Sekundärantikörper war HRP-konjugiert und wurde in einer Verdünnung von 1:5000 (in 0,5 % Magermilchpulver in TBS-T) verwendet. Das Blockieren, sowie die Inkubation mit den Antikörperlösungen, erfolgten jeweils für 1 h bei RT. Für die Analyse wurde ECL Substrat (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad, USA) verwendet. Die beiden Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers verwendet und für 5 min auf die Membran gegeben. Detektiert wurde final im ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA). Mithilfe der Software Image Lab Version 5.1 (Bio-Rad, USA) wurden die Banden densitometrisch vermessen sowie deren Molekulargewicht bestimmt.

Für eine Ladungskontrolle wurde die Membran nochmal mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin (Verhältnis 1:1000) gefärbt. Dazu wurden zunächst die gebundenen Antikörper mithilfe von *Stripping Buffer* (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific, USA) 10 min bei RT von der Membran gelöst. Die Membran wurde anschließend nochmals mit 5 % Magermilchsuspension blockiert und nach dem obigen Protokoll gefärbt und ausgewertet.

## 2.2.4 Mikrobiologie

### 2.2.4.1 Bakterienanzucht

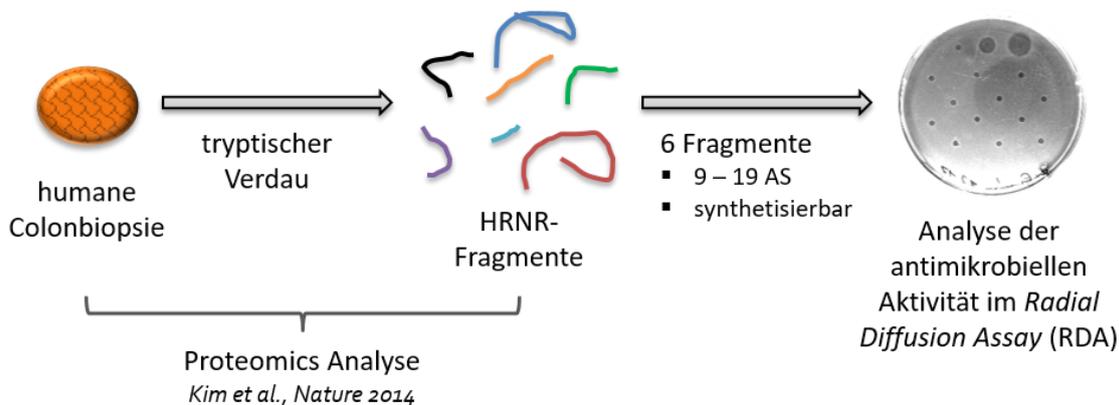
Die hier verwendeten Bakterien wurden in 10 ml TSB-Medium für 16 h, 110 rpm bei 37 °C angezogen. Anaerobe Bakterien wurden in einer Anaerobenkammer unter Einsatz eines Oxoid™ AnaeroGen™ Beutels (Thermo Scientific, USA) gezogen.

### 2.2.4.2 Herstellung abgetöteter Bakteriensuspensionen

Aus einem Bakterienstock wurden 10 ml TSB Medium beimpft und dieses für 16 h bei 37 °C und 110 rpm inkubiert. Um in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Bakterien zu erhalten, wurden 100 µl der Vorkultur in 10 ml frisches TSB überimpft und erneut bei 37 °C unter Schütteln für 2 h inkubiert. Zum Abtöten der Bakterien wurde ein Wasserbad mit 65 °C für 45 min verwendet. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Um die Bakterien zu waschen, wurden diese in PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in entsprechendem Zellkultur-Medium gelöst, welches auch für die nachfolgenden Zellkulturversuche verwendet wurde. Die optische Dichte der Suspension wurde bei 600 nm im Photometer gemessen, auf eine OD von 0,3 eingestellt und bei -20 °C gelagert. Der SIHUMI-Mix wurde als Lyophilisat überlassen, welches direkt in entsprechendem ZK-Medium gelöst und auf eine OD von 0,3 eingestellt wurde.

### 2.2.4.3 Synthese von HRNR-Fragmenten

Für die Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften von HRNR wurden zunächst aus einer Proteomics-Datenbank (Kim *et al.*, 2014) passende Fragmente gewählt. Für die dortige Analyse wurde von drei Spendern postmortem Gewebe entnommen, die Proteine isoliert und ein tryptischer Verdau durchgeführt. Die so entstandenen Fragmente wurden mittels Massenspektrometrie charakterisiert und bekannten Proteinen zugeordnet. Aus dieser Datenbank wurden dann sechs HRNR-Fragmente aus dem Colon ausgewählt und synthetisiert (Abbildung 4). Die Aminosäuresequenzen der Fragmente sind in Tabelle 1 aufgeführt.



#### Abbildung 4: Auswahl der HRNR-Fragmente für antimikrobielle Testung

Aus einer Proteom-Datenbank (<http://www.humanproteomemap.org/>) (Kim *et al.*, 2014)) wurden sechs HRNR-Fragmente aus dem Colon ausgewählt und synthetisiert. Die Fragmente wurden anschließend mittels Radial Diffusion Assay (RDA) auf antimikrobielle Eigenschaften getestet.

#### 2.2.4.4 Radial Diffusion Assay (RDA)

Für die Testung der antimikrobiellen Aktivität der HRNR-Fragmente wurden *Radial Diffusion Assays* (RDA) nach Lehrer (Lehrer *et al.*, 1991) durchgeführt. Dafür wurden zunächst in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Bakterien (aerobe Bakterien wurden dazu zuvor nochmals überimpft und 2 h inkubiert) bei 4 °C abzentrifugiert und zweimal in 10 mM Na-Phosphatpuffer gewaschen. Davon wurden  $4 \times 10^6$  CFU in 10 ml des nährstoffarmen Gels (Underlay) gegeben und in eine Petrischale gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden Löcher mit 2,5 mm Durchmesser gestanzt, in jedes 4 µl einer Peptidlösung gegeben und 3 h bei 37 °C inkubiert. Final wurde ein nährstoffreiches Gel darüber gegossen und weitere 16 h bei 37 °C inkubiert. Anaerobier wurden dafür in eine Anaerobenkammer mit einem Oxoid™ AnaeroGen™ Beutel (Thermo Scientific, USA) gegeben. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in 2.1.4.3 aufgeführt. Um die antimikrobielle Wirkung unter reduzierenden Bedingungen zu testen, wurden 20 µl Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP 1 M) in 10 ml Underlay Gel gegeben. Als Negativkontrolle wurde jeweils Essigsäure (0,01 %) und als Positivkontrollen Lysozym (1 µg / 4 µl) und humanes β-Defensin 3 (hBD3, 1 µg / 4 µl) verwendet. Jeder Versuch wurde mindestens zweimal wiederholt und die Durchschnittswerte  $\pm$  SEM angegeben.

### 2.2.5 In silico – Verdau

Der *in silico* - Verdau von HRNR wurde mit ExpPASy – Peptide Mass (Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz) durchgeführt. Es wurde sowohl allein mit der Protease Trypsin verdaut, wobei eine hohe enzymatische Spezifität gewählt wurde, als auch ein Verdau parallel mit Trypsin und Chymotrypsin. Die genauen Schnittstellen der Proteasen sind in Tabelle 12 aufgeführt, wobei jeweils maximal fünf mögliche Schnittstellen übersprungen werden durften. Für die Berechnung der Peptidmassen wurden Monoisotope, sowie die reduzierte Form von Cystein und Methionin verwendet. Die Moleküle lagen dabei jeweils einfach protoniert vor. Es wurden ausschließlich Peptide mit einer Masse größer als 500 Dalton berücksichtigt. Die Graphiken zur Darstellung der Fragmente wurden zum überwiegenden Teil mit Microsoft Excel 2016 erstellt.

**Tabelle 12: Schnittstellen der Proteasen im *in silico* - Verdau**

<b>Protease für den Verdau</b>	<b>mögliche Schnittstellen</b> (Aminosäuren im Einbuchstaben-Code angegeben)
Trypsin (hohe Spezifität)	C-terminale Seite von K oder R mit Ausnahme von: P liegt C-terminal von K oder R, nach K in CKY, DKD, CKH, CKD, KKR, nach R in RRH, RRR, CRK, DRD, RRF, KRR
Trypsin und Chymotrypsin	C-terminale Seite von K, R, F, Y, W mit Ausnahme von: P liegt C-terminal von K, R, F, Y oder W, P liegt N-terminal von Y

### 2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in GraphPad Prism. In den Diagrammen sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler aufgetragen. Die Daten wurden zunächst auf eine Gaußsche Normalverteilung geprüft (*d'agostino & pearson omnibus normality test*). Konnte diese angenommen werden, wurde für den Vergleich von zwei Gruppen ein t-Test für ungepaarte Werte durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorhanden war, wurden die Gruppen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney Test untersucht. Für die Analyse der Korrelation wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet. Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen

dargestellt:  $p > 0,05 = \text{ns}$  (nicht signifikant);  $p \leq 0,05 = *$ ;  $p \leq 0,01 = **$ ;  
 $p \leq 0,001 = ***$ ;  $p \leq 0,0001 = ****$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Intestinale Expression von HRNR

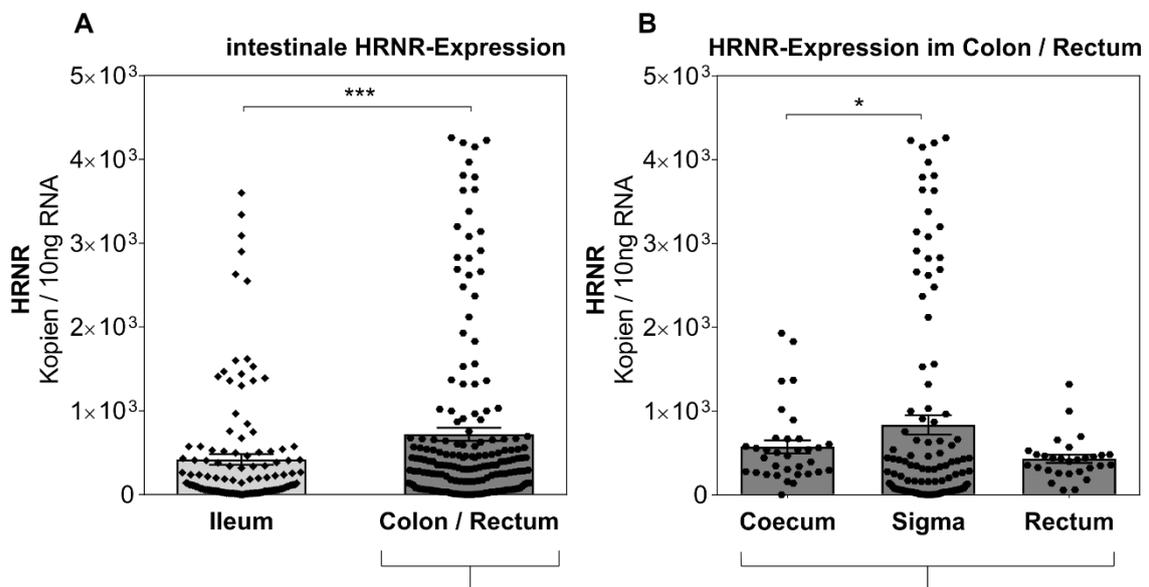
Hornerin (HRNR) ist an der Bildung der Hautbarriere beteiligt. Bei manchen Hauterkrankungen wie der Psoriasis und der atopischen Dermatitis, bei welchen die epidermale Barriere gestört ist, zeigten sich zudem erniedrigte HRNR-Werte (Wu *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2011). Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) liegt eine Barriestörung vor. Aus diesem Grund wurde die HRNR-Expression im menschlichen Darm und insbesondere auch bei Patienten mit CED analysiert und verglichen. Dazu wurde die RNA aus Biopsien des Patientenkollektivs von nicht entzündetem Gewebe isoliert. Das Patientenkollektiv bestand aus gesunden Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn (MC) oder Colitis ulcerosa (CU) (n = 306, genaue Zusammensetzung siehe 2.1.8). Die HRNR-Expression wurde dann mittels qPCR absolut quantifiziert.

Zur Normierung wird in der qPCR häufig auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin genutzt, welches auch zur Normierung von HRNR eingesetzt werden sollte. Allerdings variierte  $\beta$ -Aktin innerhalb der einzelnen Proben und insbesondere zwischen den Gruppen stark, sodass dieses Protein nicht zur Normierung geeignet war. In Abbildung 23 im Anhang ist die  $\beta$ -Aktin Expression in kultivierten sowie in nativ aufgearbeiteten Biopsien dargestellt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Garreis *et al.*, welche ebenfalls eine Variabilität des  $\beta$ -Aktins in ihrer HRNR-Analyse von Gewebeproben aus dem Auge beschrieben, sodass sie darauf nicht normieren konnten (Garreis *et al.*, 2017).

##### 3.1.1 Expression von HRNR in verschiedenen Darmabschnitten

Zunächst wurde die intestinale Expression von Hornerin (HRNR) in verschiedenen Darmabschnitten untersucht. In der Analyse zeigte sich eine hohe Variabilität der HRNR-Expression, welche auch innerhalb der Abschnitte Ileum und Colon / Rectum bestand (Abbildung 5A). In einigen Biopsien lag die Expression oberhalb von  $4 \times 10^3$  Transkripten pro 10 ng RNA, während in anderen Biopsien kaum HRNR vorhanden war. Die durchschnittliche Expression im Ileum war signifikant niedriger ( $p = 0,002$ ) als im Colon / Rectum. Zudem wurden die Biopsien aus dem Colon / Rectum nochmals in

Unterabschnitte aufgetrennt und in Abbildung 5B dargestellt. In dieser genaueren Untersuchung zeigte sich im Sigma eine durchschnittlich höhere HRNR-Expression in Relation zu den anderen Abschnitten. Dieser Unterschied ist im Vergleich zum Coecum signifikant ( $p = 0,0413$ ), nicht jedoch im Vergleich zum Rectum. Zudem fiel im Sigma eine Gruppe von Patienten mit deutlich überdurchschnittlicher HRNR-Expression auf. Im Coecum und im Rectum zeigten sich dagegen nur vereinzelt höhere HRNR-Werte. Vom überwiegenden Teil der Patienten wurden mehrere Biopsien verschiedener Darmabschnitte entnommen. So konnte außerdem die HRNR-Expression an verschiedenen Stellen innerhalb eines Patienten verglichen werden. Dabei zeigte sich eine hohe intraindividuelle Variabilität der HRNR-Expression.



**Abbildung 5: HRNR-Expression in verschiedenen humanen Darmabschnitten**

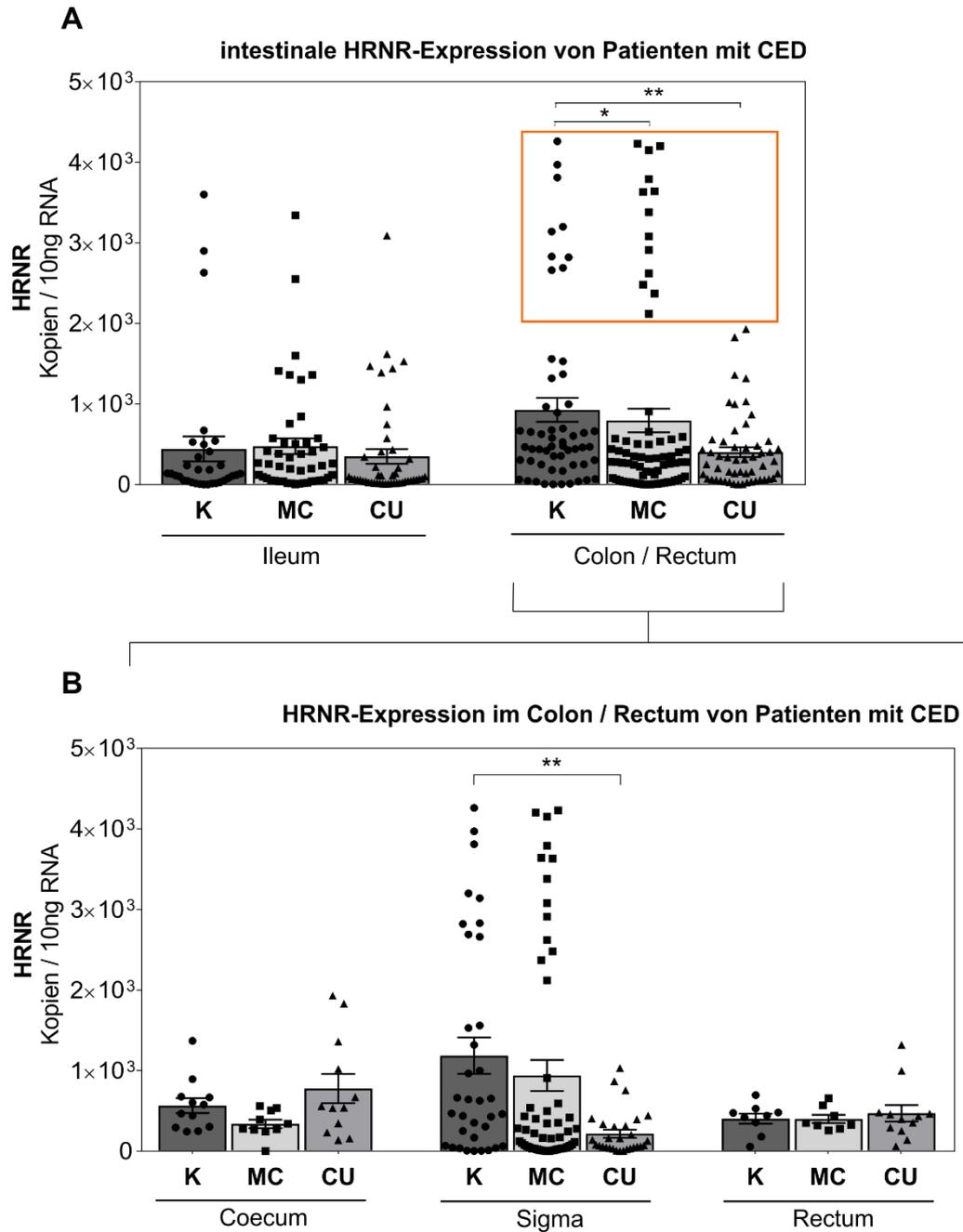
In humanen Biopsien aus verschiedenen Darmabschnitten ohne aktive Entzündung wurde die Expression von HRNR gemessen. A) Analysiert wurden die Abschnitte Ileum ( $n = 126$ ) und Colon / Rectum ( $n = 180$ ). \*\*\*  $p = 0,002$ . B) Colon / Rectum wurde nochmals in die Abschnitte Coecum ( $n = 34$ ), Sigma ( $n = 117$ ) und Rectum ( $n = 29$ ) unterteilt. \*  $p = 0,0413$ . Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test und ergab – soweit nicht anders gekennzeichnet – keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend zeigten sich im Colon / Rectum – und insbesondere im Sigma – durchschnittlich höhere HRNR-Level im Vergleich zum Ileum. Die HRNR-Expression war jedoch sehr variabel ausgeprägt. Im darauffolgenden Schritt wurden die Unterschiede in der HRNR-Expression in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) untersucht.

### 3.1.2 Expression von HRNR in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)

Das Patientenkollektiv wurde in Gruppen von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollpatienten (Kontrollen) eingeteilt und die RNA-Expression miteinander verglichen. Bei Patienten mit CED zeigte sich dabei weiterhin eine hohe Variabilität in der HRNR-Expression. Im Ileum bestanden zudem keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Allerdings fanden sich im Colon / Rectum unterschiedliche Expressionsmuster. Sowohl in Patienten mit MC ( $p = 0,0155$ ) als auch mit CU ( $p = 0,0045$ ) war das durchschnittliche HRNR-Level im Colon / Rectum signifikant niedriger als in Kontrollen. Dabei waren bei CU im Vergleich zu MC die HRNR-Werte tendenziell niedriger. Zudem fiel in den Kontrollen und bei MC eine Gruppe von Patienten mit deutlich überdurchschnittlichen HRNR-Werten auf. Diese Gruppe fand sich dagegen in Patienten mit CU nicht (Abbildung 6A, orangener Kasten). Daraufhin wurden die Biopsien aus dem Colon / Rectum nochmals in einzelne Abschnitte unterteilt und in Abbildung 6B dargestellt. Dort zeigte sich, dass die Biopsien mit deutlich erhöhtem HRNR-Level nahezu ausschließlich auf das Sigma begrenzt waren. Im Coecum und im Rectum bestanden dagegen keine Unterschiede zwischen Patienten mit CED.

Zusammenfassend war die HRNR-Expression im Colon / Rectum bei Patienten mit CED, insbesondere bei CU, durchschnittlich niedriger als in Kontrollpatienten. Außerdem zeigte sich sowohl bei Kontrollen als auch bei MC eine Patientengruppe mit deutlich erhöhten HRNR-Werten. Diese hohen Werte traten vor allem im Sigma auf und fehlten in Patienten mit CU. Im nächsten Schritt sollten mögliche Ursachen für diese Unterschiede und die hohe Variabilität in der HRNR-Expression untersucht werden.



**Abbildung 6: Intestinale HRNR-Expression in Patienten mit CED**

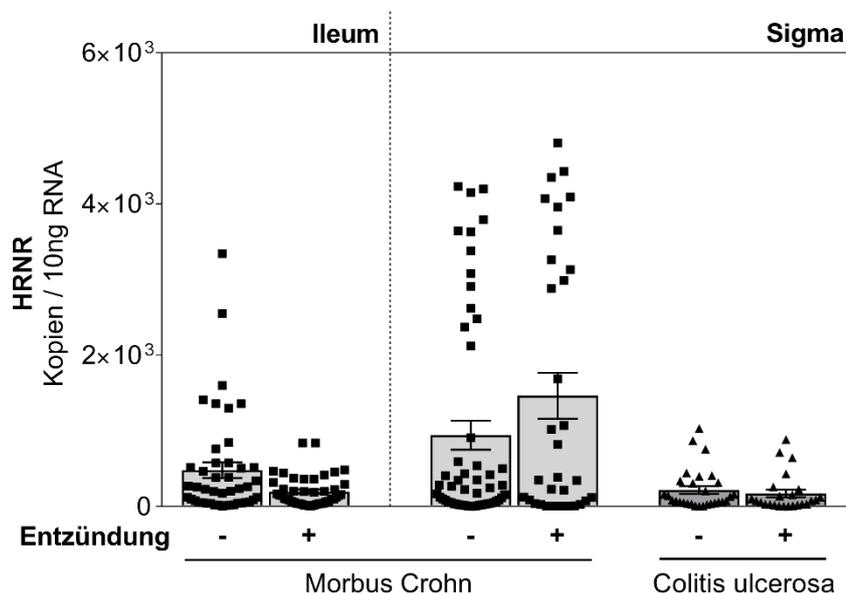
In Biopsien aus verschiedenen Darmabschnitten ohne aktive Entzündung von Patienten mit CED wurde die Expression von HRNR gemessen (K = Kontrolle, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa). (A) Analysiert wurden die Abschnitte Ileum (n = 32 – 47) und Colon / Rectum (n = 53 – 71). \* p = 0,0155, \*\* p = 0,0045. Durch den orangenen Kasten wird eine Gruppe mit deutlich überdurchschnittlichen HRNR-Werten in K und MC hervorgehoben. (B) Der Bereich Colon / Rectum wurde in folgende Abschnitte untergliedert: Coecum (n = 10 – 12), Sigma (n = 29 – 35), Rectum (n = 8 – 12). \*\* p = 0,0011. Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert ± SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Soweit nicht anders gekennzeichnet, waren die Unterschiede nicht signifikant.

### 3.1.3 Analyse der Korrelation der HRNR-Expression mit verschiedenen Patienteneigenschaften

Um mögliche Ursachen für die Unterschiede in der HRNR-Expression zu identifizieren, wurden verschiedene Patienteneigenschaften mit der HRNR-Expression korreliert. Analysiert wurde der Entzündungsstatus des biopsierten Gewebes, das Befallsmuster bei Morbus Crohn sowie Alter und Geschlecht der Patienten.

#### a) Entzündung

Zunächst wurde der Einfluss einer aktiven Entzündung auf die HRNR-Expression bei CED untersucht. Dafür wurden nun auch Biopsien aus entzündetem Gewebe analysiert und mit Biopsien aus nicht-entzündetem Gewebe verglichen (Abbildung 7). Bei Patienten mit MC zeigten sich im Ileum keine Unterschiede in der HRNR-Expression, wohingegen im Sigma die HRNR-Werte in nicht-entzündetem Gewebe tendenziell etwas niedriger waren. Dies war jedoch nicht signifikant. In Patienten mit CU bestanden keine entzündungsabhängigen Unterschiede in der HRNR-Expression (Abbildung 7).

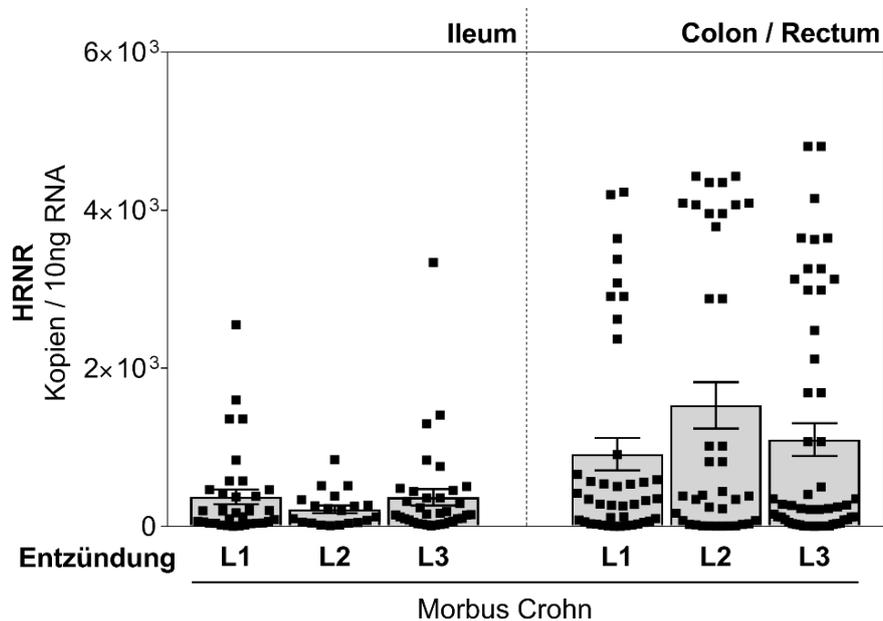


**Abbildung 7: HRNR-Expression in Abhängigkeit des Entzündungsstatus**

In Biopsien aus entzündetem (+) und nicht entzündetem (-) Gewebe von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) wurde die HRNR-Expression untersucht. MC im Ileum:  $n = 90$ , MC im Sigma:  $n = 86$ , CU im Sigma:  $n = 53$ . Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

### b) Befallsmuster bei Morbus Crohn

Bei MC können verschiedene Abschnitte des Darms von der Entzündung betroffen sein. Die Patienten wurden anhand der betroffenen Darmabschnitte nach der Wien-Klassifikation in unterschiedliche Befallsmuster unterteilt (L1: Ileum, L2: Colon, L3: Ileum und Colon). Dabei wurden Patienten mit unklarem Befallstyp ausgeschlossen. Auch in dieser Auftrennung zeigten sich weder im Ileum noch im Colon signifikante Unterschiede (Abbildung 8).



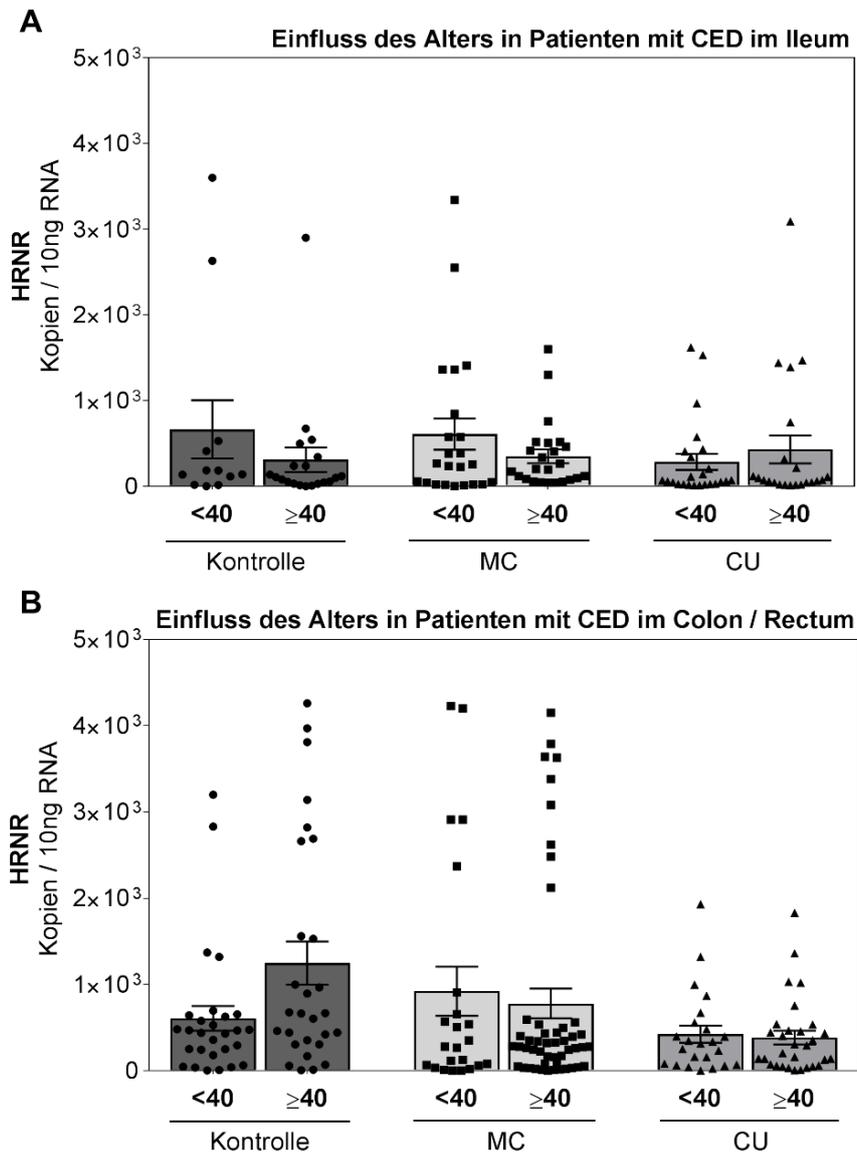
**Abbildung 8: HRNR-Expression in Abhängigkeit des Befallsmusters bei Morbus Crohn**

Patienten mit MC wurden nach dem Befallsmuster aufgetrennt und die HRNR-Expression in Biopsien untersucht. (Wien-Klassifikation: L1: Ileum, L2: Colon, L3: Ileum und Colon). Dafür wurden Biopsien aus entzündetem und nicht entzündetem Gewebe eingeschlossen. Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Ileum:  $n = 90$ , Sigma:  $n = 132$ . In der statistischen Auswertung mit dem Mann-Whitney Test bestanden keine signifikanten Unterschiede.

### c) Patientenalter

Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der HRNR-Expression untersucht, wofür alle Biopsien aus nicht entzündetem Gewebe des Patientenkollektivs eingeschlossen wurden. Die Patienten wurden in eine Gruppe  $< 40$  Jahren und eine Gruppe  $\geq 40$  Jahren aufgeteilt und getrennt nach Erkrankung ausgewertet (Abbildung 9). Weder im Ileum noch im Colon / Rectum traten bei einer

der Patientengruppen signifikante, altersabhängige Unterschiede in der HRNR-Expression auf (Abbildung 9). Lediglich bei den Kontrollpatienten im Colon / Rectum bestand ein Trend zu höheren HRNR-Werten im höheren Alter, welcher jedoch nicht signifikant war ( $n = 0,0555$ ) (Abbildung 9B).

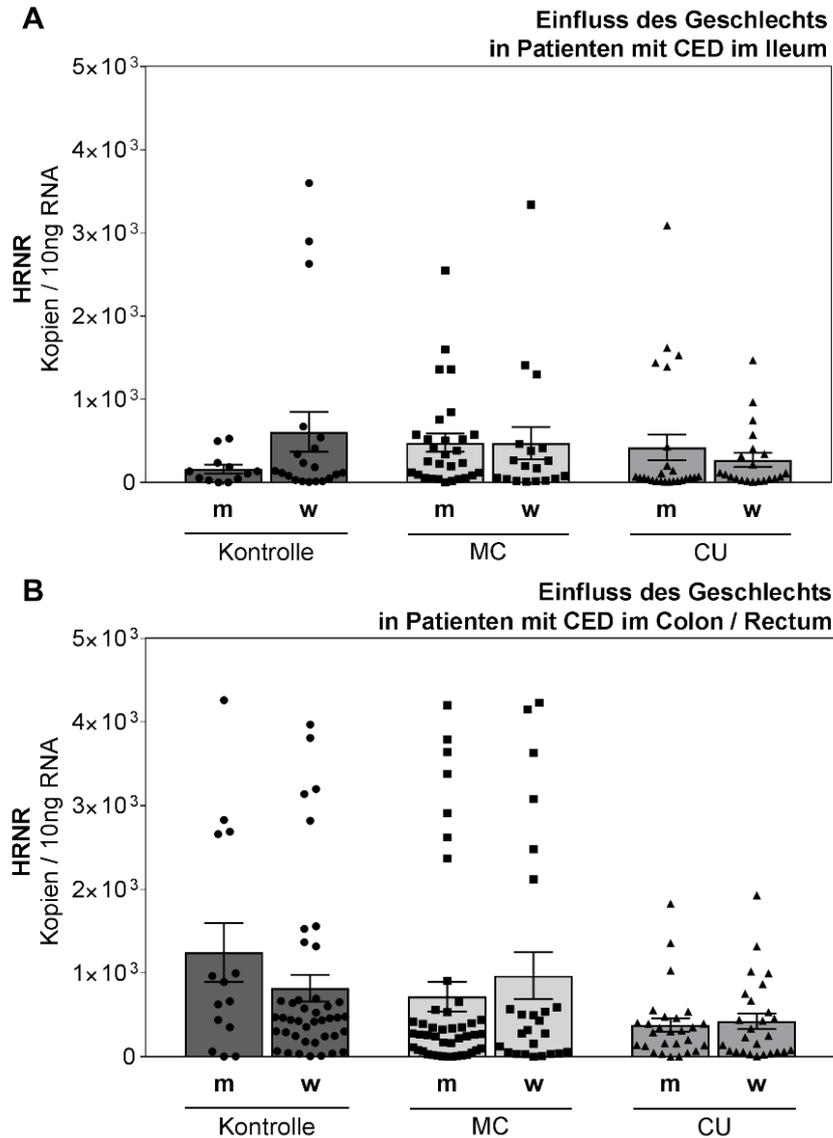


**Abbildung 9: Analyse des Zusammenhangs zwischen Alter und HRNR-Expression**

Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen wurden nach ihrem Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme aufgetrennt und die HRNR-Expression gemessen. (A) Ileum  $n = 125$  (davon Kontrollpatienten  $n = 32$ , MC  $n = 47$ , CU  $n = 46$ ). (B) Colon / Rectum  $n = 180$  (davon Kontrollen  $n = 56$ , MC  $n = 71$ , CU  $n = 53$ ) Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test und zeigte keine signifikanten Unterschiede.

### d) Geschlecht

Des Weiteren wurde untersucht, ob Unterschiede in der HRNR-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts auftraten. Auch hier zeigten sich in keiner der Patientengruppen signifikante Unterschiede, weder im Ileum noch im Colon / Rectum (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Analyse des Zusammenhangs zwischen Geschlecht und HRNR-Expression**

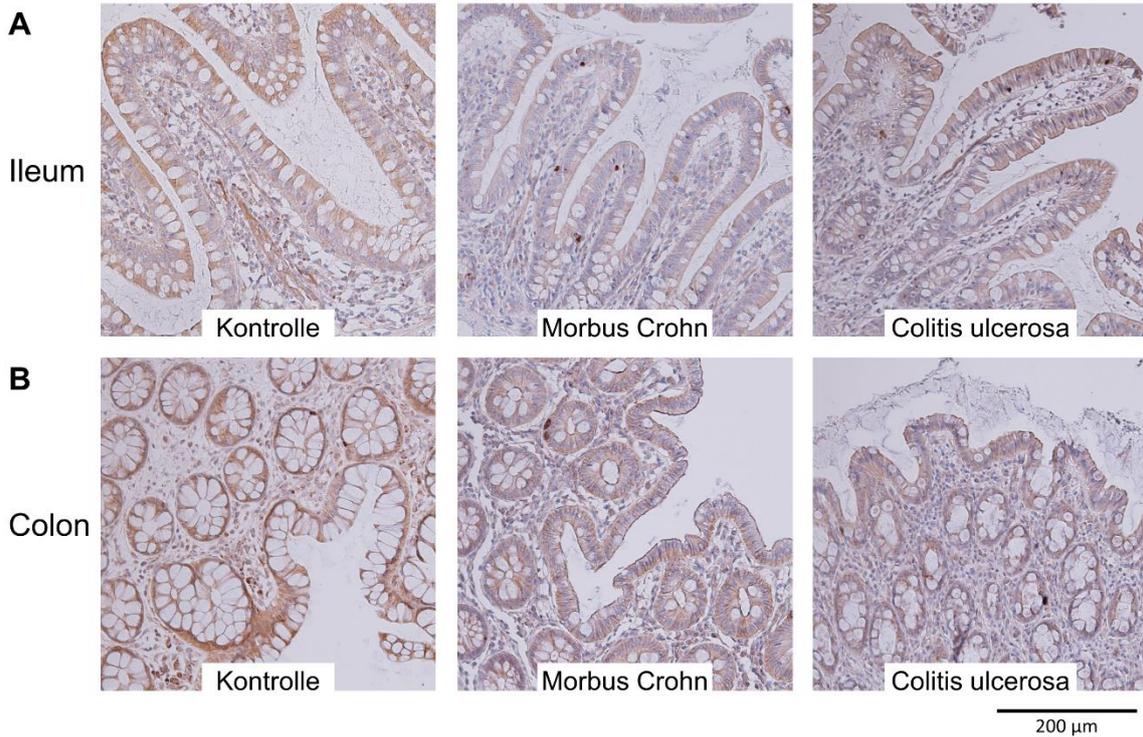
Bei männlichen (m) und weiblichen (w) Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen wurde die HRNR-Expression gemessen. (A) Ileum  $n = 125$  (davon Kontrollpatienten  $n = 32$ , MC  $n = 47$ , CU  $n = 46$ ). (B) Colon / Rectum  $n = 178$  (davon Kontrollen  $n = 56$ , MC  $n = 69$ , CU  $n = 53$ ) Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test und zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Patienteneigenschaften Alter, Geschlecht und Befallsmuster bei MC sowie der Entzündungsstatus keinen Einfluss auf die HRNR-Expression haben. Bisher wurde die HRNR-Expression auf Ebene der mRNA untersucht. Im Folgenden sollte nun auch die Proteinexpression analysiert werden.

### **3.1.4 Immunhistochemische Färbung von HRNR**

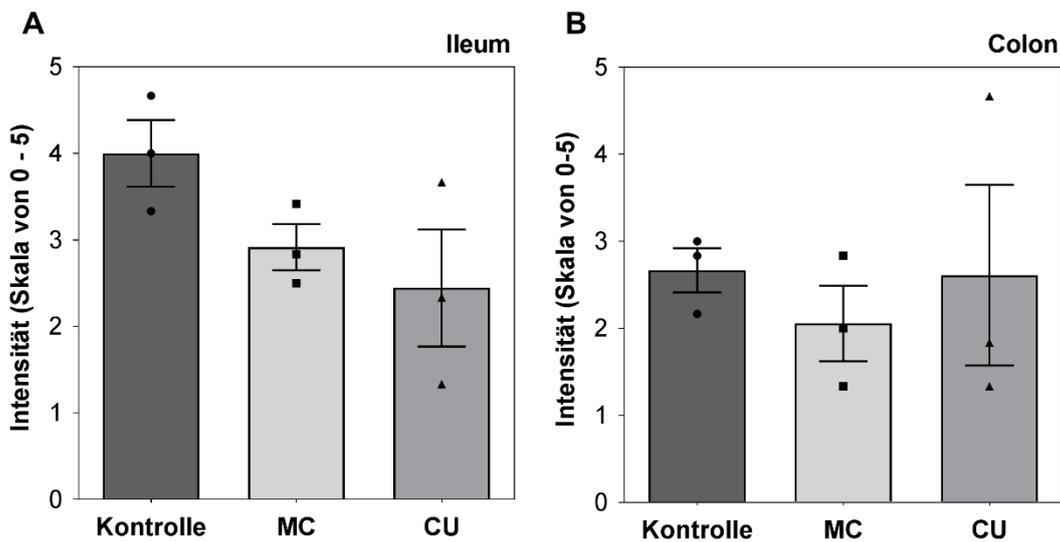
Für den Nachweis auf Proteinebene und eine Lokalisierung im Darmgewebe von HRNR wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen Antikörper durchgeführt. Dafür wurde paraffinfixiertes Gewebe aus dem Ileum und Colon von Patienten mit MC, CU und Kontrollen (je  $n = 3$ ) angefärbt. Sowohl im Ileum als auch im Colon war das Epithel angefärbt, wobei das Lumen der Becherzellen zum Großteil ausgespart war. Im Ileum war HRNR tendenziell auf der apikalen Seite der Zellen lokalisiert. Im Bindegewebe dagegen war keine Färbung sichtbar (Abbildung 11). Insgesamt war die Färbung zwischen den Schnitten sehr unterschiedlich ausgeprägt und auch innerhalb eines Schnittes variabel.

Neben der allgemeinen Untersuchung der intestinalen HRNR-Expression wurde auch die HRNR-Expression zwischen Patienten mit MC, CU und Kontrollen verglichen. Bis auf eine tendenziell etwas schwächere Färbung im Ileum bei Patienten mit MC und CU bestanden dabei sowohl in der Farbintensität als auch der Lokalisierung von HRNR keine auffälligen Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Zusätzlich wurde durch eine unabhängige Bewertung durch drei Experten die Farbintensität quantifiziert. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen CED und Kontrollen noch zwischen Ileum und Colon (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Gewebe aus Patienten mit CED mit einem HRNR-Antikörper**

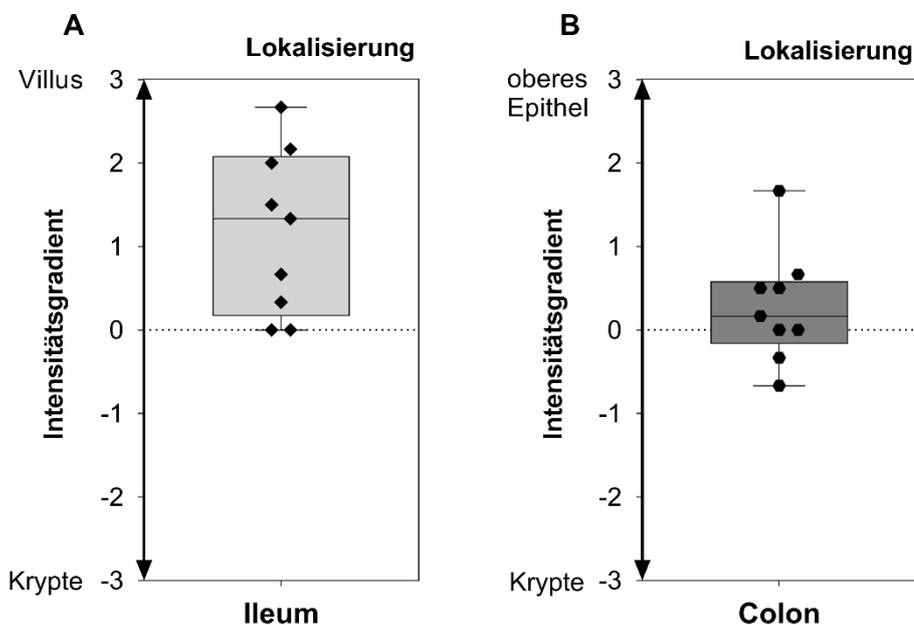
Immunhistochemische Färbung von paraffinfixierten Schnitten von humanem Ileum (A) und Colon (B) von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen (je n = 3) mit einem HRNR-Antikörper (braun) sowie Hämatoxylin (blau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt mit einem Maßstab von 200 µm.



**Abbildung 12: Intensität der HRNR-Färbung bei Patienten mit CED**

Färbung von paraffinfixiertem Ileum und Colon von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen (je n = 3) mit einem HRNR-Antikörper. Die Farbintensität der einzelnen Schnitte wurde von drei Experten auf einer Skala von 0 – 5 unabhängig beurteilt und der Mittelwert für jeden Schnitt aufgetragen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Schnitten pro Gruppe ± SEM. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

In manchen Schnitten, insbesondere im Ileum, fiel eine stärker ausgeprägte Färbung in den Villi auf, welche zu den Krypten hin abnahm. Dieser Eindruck wurde durch eine gesonderte Auswertung überprüft (Abbildung 13). Drei Experten beurteilten dazu unabhängig voneinander den Unterschied der Farbintensität zwischen den Krypten und den Villi (im Ileum) bzw. dem oberen Epithelsaum (im Colon). Da sich zuvor keine Unterschiede zwischen CED und Kontrollen gezeigt hatten, wurden die Schnitte hier gepoolt. In den Randbereichen der Schnitte fand sich teilweise eine verstärkte Färbung, welche zum Eindruck eines hohen Intensitätsgradienten führte. Dieser Randeffekt war jedoch artifiziell bedingt und korrelierte nicht mit der HRNR-Expression. Im Ileum fand sich in der Mehrzahl der Schnitte ein Gradient mit einer stärkeren HRNR-Expression in den Villi als in den Krypten (Abbildung 13A). Der Median lag dort deutlich im positiven Bereich, etwa bei 1,3. Dagegen gruppierten sich die Werte im Colon um die Null (Abbildung 13B). Hier schien es keinen Gradienten in der HRNR-Expression zu geben.



**Abbildung 13: Intensitätsgradient von HRNR im Darmepithel**

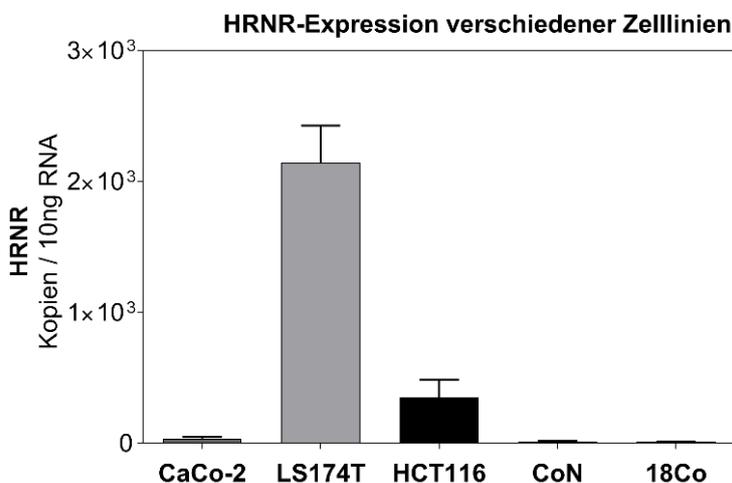
Immunhistochemische Färbung von paraffinfixiertem Ileum (A) und Colon (B) mit einem HRNR-Antikörper. Die Schnitte von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen (je  $n = 3$ ) wurden gepoolt. Drei Experten beurteilten unabhängig den Intensitätsunterschied zwischen Krypten und Villi bzw. oberem Epithel ( $-3 =$  stärkere Färbung in den Krypten,  $0 =$  kein Unterschied,  $3 =$  stärkere Färbung in den Villi bzw. im oberen Epithel). Dargestellt ist der Median, der Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile sowie das Minimum und das Maximum.

Insgesamt brachte die Immunhistochemie den Nachweis, dass HRNR auch als Protein sowohl im Colon als auch im Ileum vorliegt und dort in den Epithelzellen lokalisiert ist. Dabei war die Färbung in den Villi im Ileum stärker ausgeprägt als in den Krypten. Dieser Gradient lag im Colon nicht vor. Des Weiteren traten zwischen MC, CU und den Kontrollen keine deutlichen Unterschiede auf. Im nächsten Schritt wurde nun die Regulation der HRNR-Expression genauer analysiert.

## 3.2 Regulation der HRNR-Expression

### 3.2.1 Untersuchung der HRNR-Expression in verschiedenen Zelllinien

Um geeignete Zellen für nachfolgende Experimente zu finden, wurden zunächst verschiedene Zelllinien auf ihre Expression von HRNR untersucht. Getestet wurden drei epitheliale Zelllinien aus dem Colon (CaCo-2, LS174T, HCT116) sowie zwei Vorläuferzelllinien (CoN, 18Co) (Abbildung 14). Die einzelnen Zelllinien sind in 2.1.7.2 genauer beschrieben. In den Linien CaCo-2, CoN und 18Co wurden nur sehr geringe Mengen HRNR exprimiert. Die Zellen des Typs LS174T zeigten eine starke HRNR-Expression mit etwa  $2 \times 10^3$  Transkripten / 10 ng RNA, weshalb vor allem dieser Zelltyp in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Auch die Linie HCT116 exprimiert HRNR und wurde ebenfalls für einige Experimente genutzt. Ein genauer quantitativer Vergleich der HRNR-Expression zwischen den Zelllinien war hier jedoch nicht möglich, da die Zellen unter verschiedenen Bedingungen angezogen und aufgearbeitet wurden.



**Abbildung 14: Analyse der HRNR-Expression in verschiedenen Zelllinien**

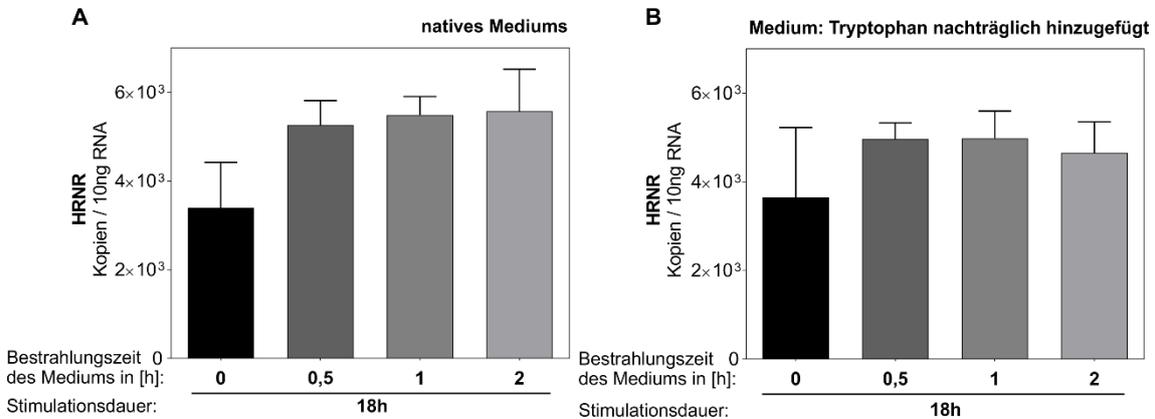
Aus verschiedenen Zelllinien wurde die RNA isoliert und die HRNR-Expression mittels qPCR gemessen. Es wurden Zelllinien aus dem Colon (CaCo-2, LS174T, HCT116) sowie zwei Vorläuferzelllinien (CoN, 18Co) analysiert. Dargestellt sind die RNA-Transkripte pro 10 ng RNA als Mittelwert  $\pm$  SEM aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

### 3.2.2 Einfluss von lichtexponiertem Zellkulturmedium auf die HRNR-Expression

Wie in der Einleitung beschrieben kann die HRNR-Expression über den Ah-Rezeptor (AhR) induziert werden. Ein potenter AhR-Ligand ist das 6-Formylindolo(3,2-b)carbazol (FICZ), ein Photoprodukt des Tryptophans, welches in Zellkultur-Medium (ZK) unter Lichtexposition entsteht (Öberg *et al*, 2005). Durch eine variable Exposition des ZK-Mediums gegenüber Licht, könnte dieses unterschiedliche FICZ-Konzentrationen enthalten und damit die HRNR-Expression verfälschen. Um diesen potenziellen Störfaktor auszuschließen, wurde zunächst untersucht, ob Lichtexposition in der Zellkultur das HRNR-Level beeinflusst. Dazu wurde übliches ZK-Medium mit UV-C-Licht der Wellenlänge 254 nm für 0,5 h, 1 h oder 2 h bestrahlt und die Zellen für 18 h mit diesem Medium kultiviert. Um potenziellen Lichteinfluss während der Herstellung und des Transports des ZK-Mediums auszuschließen, wurde zudem tryptophanfreies Medium nachträglich mit L-Tryptophan versetzt. Dabei wurden die ZK-Medien vor und während aller Versuche dunkel gelagert und unter möglichst großem Ausschluss von Licht gehandhabt. In Abbildung 15 ist der Einfluss von lichtexponiertem Medium auf die HRNR-Expression nach 18 h Stimulationsdauer dargestellt. Jedoch blieb die HRNR-Expression auch in mit verschiedener Dauer bestrahltem ZK-Medium konstant, lediglich zwischen 0 h und 0,5 h bestand eine geringe Differenz (Abbildung 15A). Diese war allerdings nicht signifikant. Zudem zeigten sich zwischen der Stimulation mit nativem Medium und Medium, welchem nachträglich Tryptophan hinzugefügt wurde, keine Unterschiede in der HRNR-Expression (Abbildung 15B).

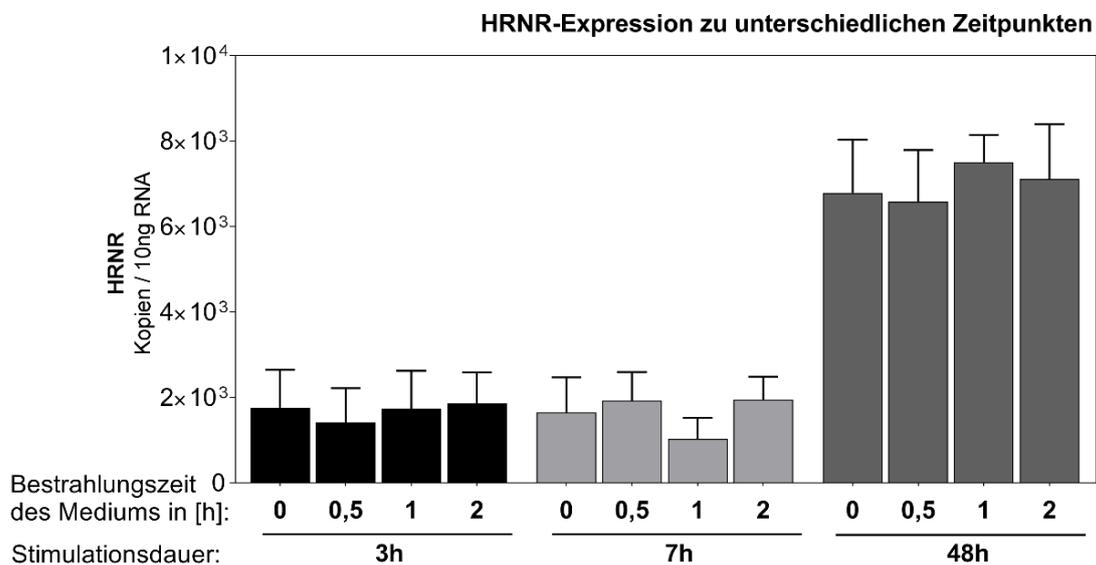
Um einen Eindruck über eine potenzielle Wirkung von FICZ auf die HRNR-Expression im zeitlichen Verlauf zu bekommen, wurde zusätzlich die HRNR-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 7 h und 48 h Stimulation) untersucht. Die Zellen wurden dafür wiederum in Medium kultiviert, welches zuvor für unterschiedliche Dauer mit UV-C-Licht bestrahlt wurde. Die Bestrahlungsdauer von 0 - 2 h des ZK-Mediums hatte auch hier keinen Einfluss auf die HRNR-Expression (Abbildung 16). Jedoch zeigte die unterschiedliche Länge an Stimulation Auswirkungen auf die Expression. Sie stieg nach 48 h im Vergleich zu 3 h oder 7 h etwa auf das Vierfache an (Abbildung 16). In den zuvor untersuchten 18 h Kultivierungsdauer war

die HRNR-Expression im Vergleich zu 3 h oder 7 h ebenfalls knapp auf das Dreifache erhöht (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Einfluss von lichtexponiertem ZK-Medium auf die HRNR-Expression**

ZK-Medium wurde 0,5 h, 1 h und 2 h mit UV-C-Licht (254 nm) bestrahlt und darin Zellen der Linie LS174T für 18 h kultiviert. In (A) wurde übliches ZK-Medium verwendet. In (B) wurde tryptophanfreies ZK-Medium nachträglich mit L-Tryptophan versetzt. Die RNA wurde isoliert und die HRNR-Expression bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der RNA-Transkripte pro 10 ng RNA aus drei Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test und ergab keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 16: HRNR-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Kultivierung in lichtexponiertem ZK-Medium**

ZK-Medium wurde 0,5 h, 1 h und 2 h mit UV-C-Licht (254 nm) bestrahlt und darin Zellen der Linie LS174T für 3 h, 7 h, und 48 h kultiviert. Die RNA wurde isoliert und die HRNR-Expression bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der RNA-Transkripte pro 10 ng RNA aus drei Experimenten.

Zusammengefasst zeigte die Lichtexposition von ZK-Medium keinen sichtbaren Einfluss auf die HRNR-Expression. Als wichtiger Faktor stellte sich jedoch die Dauer

der Kultivierung und damit vermutlich auch die Zelldichte heraus. Dieser Effekt wurde bereits während der Vorversuche bei der Aussaat höherer Zellzahlen vermutet.

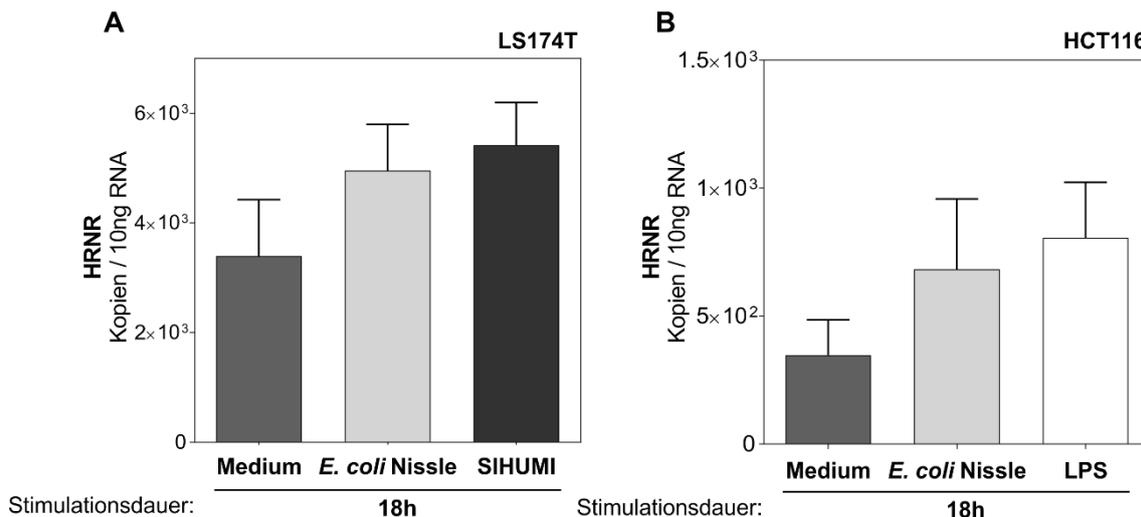
### 3.2.3 Einfluss von Bakterien auf die HRNR-Expression

Die Wechselwirkung zwischen der Mikrobiota und der Körperoberfläche spielt im Darm eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von kommensalen Bakterien auf die HRNR-Expression untersucht. Dafür wurden verschiedene Modelle verwendet.

#### a) Zellkultur

Der Einfluss von Bakterien bzw. bakteriellen Bestandteilen auf die HRNR-Expression wurde zunächst in der Zellkultur untersucht. Die Zelllinie LS174T wurde mit abgetöteten gramnegativen Bakterien des probiotischen Stamms *E. coli* Nissle 1917 sowie mit dem Bakterienmix SIHUMI (*simplified human intestinal microbiota*, Zusammensetzung in Tabelle 3) stimuliert. SIHUMI beinhaltet sieben verschiedene Bakterien und stellt ein vereinfachtes Modell der humanen Darmflora in Ratten dar (Becker *et al.*, 2011).

Zusätzlich wurde der Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf Zellen der Linie HCT116 getestet. Neben dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 wurden hier auch Lipopolysaccharide (LPS), welche Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien sind und Entzündungsreaktionen hervorrufen können, untersucht. Bei keinem der bakteriellen Bestandteile bestanden signifikante Differenzen in der HRNR-Expression im Vergleich zur Kultivierung in reinem ZK-Medium. Jedoch zeigte sich in beiden Zelllinien und bei allen getesteten Stimulanzen ein Trend zu höheren HRNR-Werten (Abbildung 17).



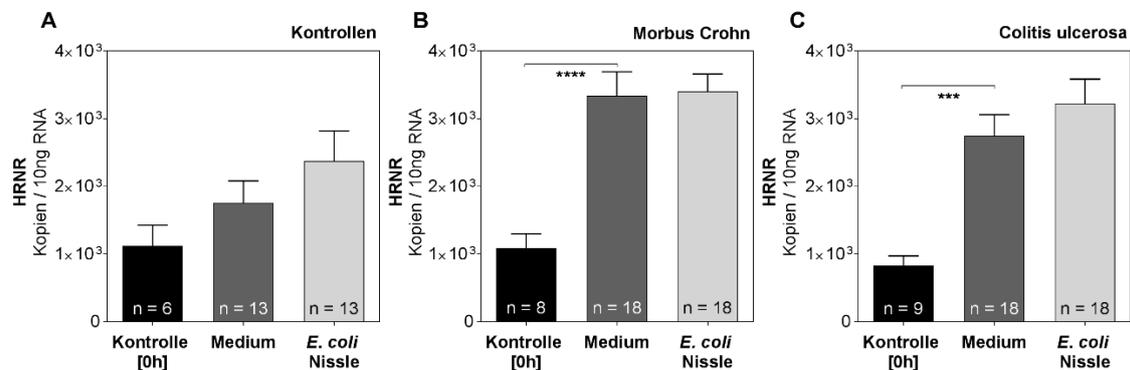
**Abbildung 17: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die HRNR-Expression in der Zellkultur**

Zellen der Linie LS174T (A) und der Linie HCT116 (B) wurden für 18 h mit abgetöteten Bakterien des Stamms *E. coli* Nissle 1917, dem Bakterienmix SIHUMI (*simplified human intestinal microbiota*) oder Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Die RNA wurde isoliert und mittels qPCR die HRNR-Expression gemessen. (A)  $n = 3$ , (B)  $n \geq 5$ . Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der RNA-Transkripte pro 10 ng RNA. Die Auswertung mit dem Mann-Whitney Test zeigte keine signifikanten Unterschiede.

## b) Humane Biopsien

Ein möglicher Einfluss von Bakterien auf die HRNR-Expression wurde zudem an humanen Biopsien aus dem Sigma getestet. Dazu wurden Biopsien von Patienten mit CED mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität sowie Kontrollen in ZK-Medium für 18 h kultiviert. Ein Teil der Biopsien wurde währenddessen mit dem probiotischen Bakterium *E. coli* Nissle 1917 stimuliert. Zusätzlich wurden in jeder Gruppe Kontrollbiopsien nativ aufgearbeitet. Zwischen den mit *E. coli* Nissle 1917 stimulierten Biopsien und den in ZK-Medium kultivierten Biopsien bestanden keine signifikanten Unterschiede in der HRNR-Expression. Sowohl in Kontrollen als auch in CU zeigte sich bei Stimulation mit *E. coli* Nissle 1917 jedoch ein Trend zu höheren HRNR-Werten (Abbildung 18A+C). Bei in ZK-Medium kultivierten Biopsien von Patienten mit MC und CU ließ sich in Relation zu nativ aufgearbeiteten Biopsien ein starker Anstieg der HRNR-Expression auf etwa das Dreifache messen ( $p \leq 0,0001$ ) (Abbildung 18B+C). Auch in Kontrollbiopsien war eine Steigerung sichtbar, jedoch nicht signifikant (Abbildung 18A). Dabei wurden in MC und CU durch die Kultivierung mit ZK-Medium und *E. coli* Nissle 1917 absolut höhere HRNR-Level erreicht als im

gesundem Darm (etwa  $3,3 \times 10^3$  Transkripte / 10 ng RNA vs.  $2,4 \times 10^3$  Transkripte / 10 ng RNA).



#### Abbildung 18: Kultivierung und Stimulation humaner Biopsien mit *E. coli* Nissle 1917

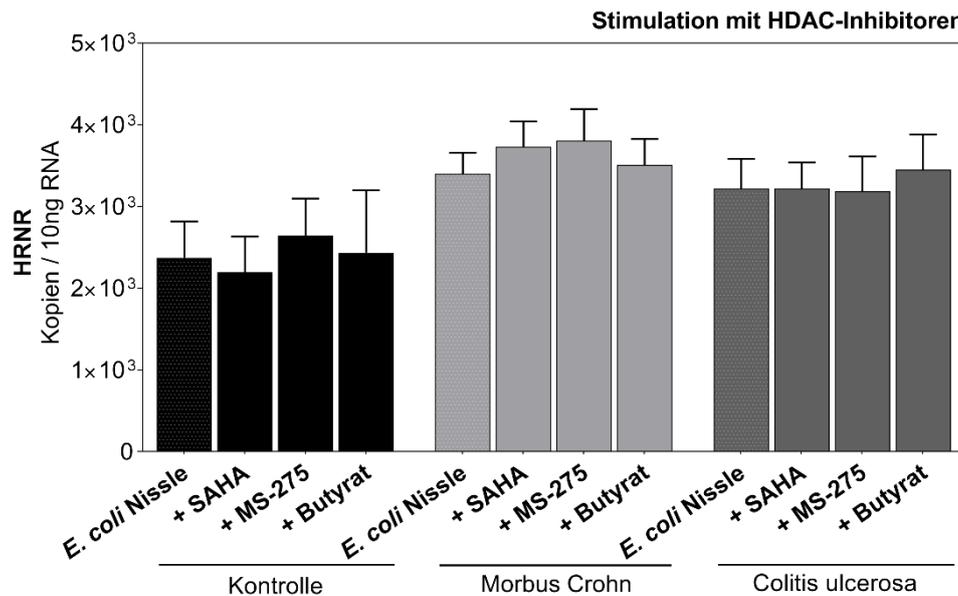
Humane Biopsien aus dem Sigma von Kontrollpatienten (A), Patienten mit Morbus Crohn (B) und Colitis ulcerosa (C) wurden für 18 h in Zellkultur-Medium kultiviert und mit abgetöteten *E. coli* Nissle 1917 stimuliert. Ein Teil der Biopsien wurde nativ aufgearbeitet (Kontrolle [0h]). Die RNA wurde isoliert und die HRNR-Expression mittels qPCR gemessen. Abgebildet sind die Transkripte / 10 ng RNA als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Beide  $p \leq 0,0001$ , weitere Unterschiede waren nicht signifikant.

Insgesamt konnte durch eine Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen weder in der Zellkultur noch in humanen Biopsien eine signifikante Steigerung der HRNR-Expression erreicht werden. Teilweise zeigte sich dabei jedoch ein Trend zu höheren HRNR-Werten. Eine starke HRNR-Induktion wurde dagegen durch die Kultivierung humaner Biopsien in ZK-Medium beobachtet. Diese war bei Patienten mit MC und CU besonders ausgeprägt.

#### 3.2.4 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die HRNR-Expression

Die epigenetische Regulation ist ein wichtiger Faktor in der Steuerung des menschlichen Stoffwechsels. Eine Möglichkeit ist die Deacetylierung von Histonen. Es wurde untersucht, ob die HRNR-Expression epigenetisch über Histondeacetylasen (HDACs) reguliert wird. Dazu wurden mithilfe von Inhibitoren verschiedene HDACs blockiert und die Auswirkungen auf die HRNR-Expression beobachtet. Im vorhergehenden Kapitel war die HRNR-Expression unter der Stimulation mit *E. coli* Nissle 1917 maximal. Deshalb wurden nun wie dort bereits beschrieben humane Biopsien aus dem Sigma von Patienten mit CED und Kontrollen mit *E. coli* Nissle 1917

stimuliert und zusätzlich mit den HDAC-Inhibitoren SAHA, MS-275 und Butyrat behandelt. Die stimulierten Biopsien von Patienten mit MC und CU enthielten durchgehend mehr HRNR als die Kontrollen. In Relation zur jeweiligen Probe ohne HDAC-Inhibitor änderte sich die HRNR-Expression jedoch in keiner Gruppe (Abbildung 19). HDAC-Inhibitoren zeigten in diesem Versuch also keinen Einfluss auf die HRNR-Expression.



**Abbildung 19: Einfluss von HDAC-Inhibitoren**

Humane Biopsien aus dem Sigma von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen wurden 18h in ZK-Medium mit *E. coli* Nissle 1917 und den HDAC-Inhibitoren SAHA (5  $\mu$ M), MS-275 (2  $\mu$ M) und Natriumbutytrat (3 mM) stimuliert. Kontrollen: n = 9-13, MC: n = 14-17, CU: n = 18. Die RNA wurde isoliert und die HRNR-Expression mittels qPCR bestimmt. Abgebildet sind die Transkripte / 10 ng RNA als Mittelwert  $\pm$  SEM. Statistisch ausgewertet wurde mit dem Mann-Whitney-Test, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zeigten.

### 3.3 Charakterisierung von HRNR

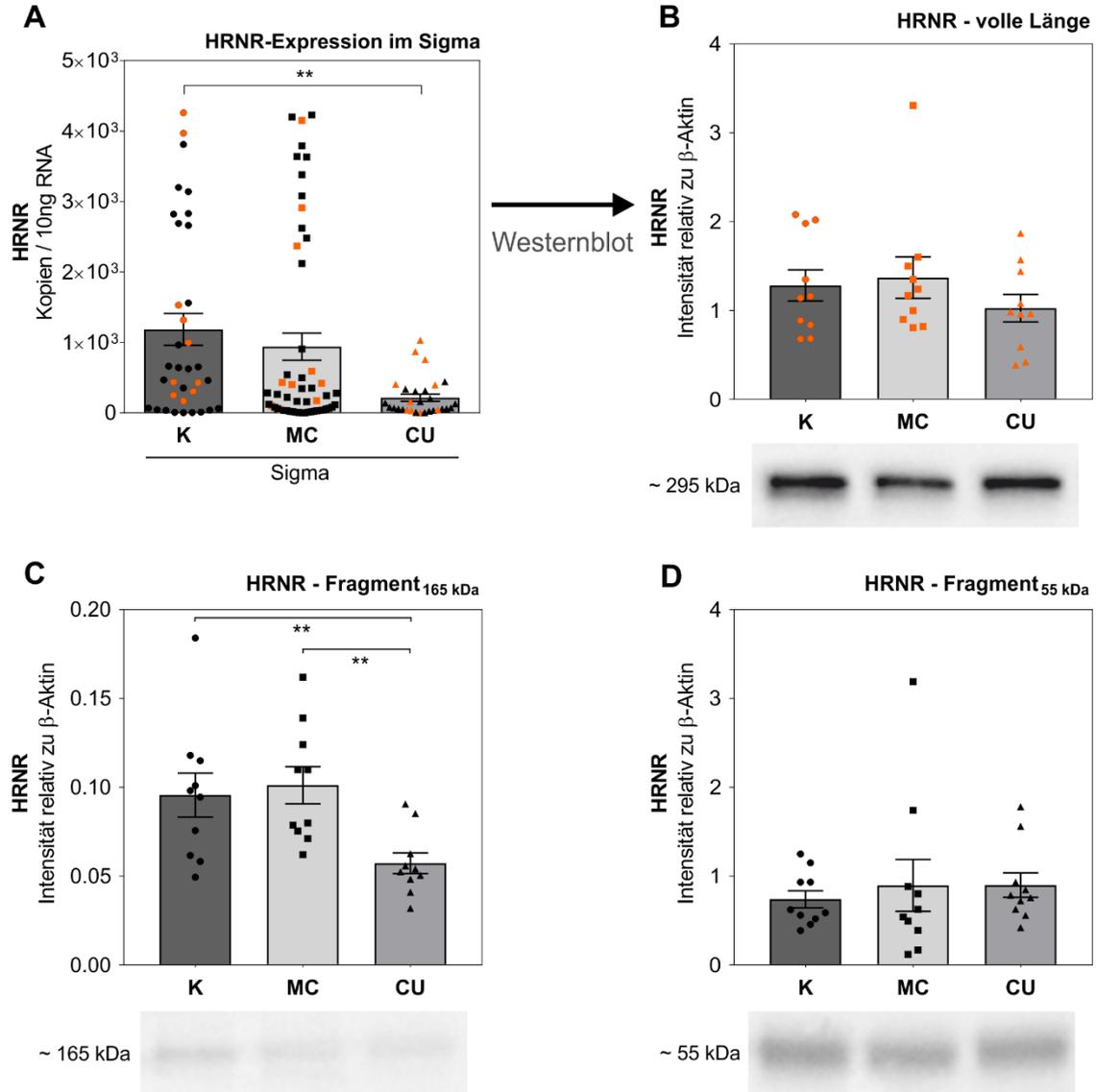
Bisher wurde die intestinale HRNR-Expression sowie mögliche Mechanismen der Regulation untersucht. Dabei wurde HRNR jeweils als eine Einheit betrachtet und nicht weiter unterteilt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist HRNR ein sehr großes Protein (2850 Aminosäuren), welches schnell degradiert und häufig in Form von Fragmenten vorliegt. Im Folgenden wurde auf diesen Aspekt genauer eingegangen und die Entstehung potenzieller Fragmente sowie eine mögliche Funktion analysiert.

#### 3.3.1 Identifizierung großer HRNR-Fragmente mittels Westernblot

In der Analyse der RNA-Expression hatten sich im Sigma Unterschiede zwischen Patienten mit CED und Kontrollen gezeigt (siehe Kapitel 3.1.2). Diese Unterschiede sollten auch auf Proteinebene im Westernblot an zehn Patienten pro Gruppe untersucht werden. Die Patienten wurden dazu anhand ihrer RNA-Expression möglichst repräsentativ ausgewählt, wobei jeweils Patienten mit hoher, mittlerer und niedriger HRNR-Expression vertreten sein sollten. Diese wurden in der Abbildung orange eingefärbt (Abbildung 20A). Bei etwa 295 kDa zeigte sich in der Färbung mit dem HRNR-Antikörper in allen Proben eine kräftige Bande. Die Banden wurden densitometrisch vermessen und im Vergleich zur Färbung gegen  $\beta$ -Aktin aufgetragen (Abbildung 20B). Dabei waren die einzelnen Biopsien in ihrer HRNR-Intensität sehr variabel, auch innerhalb der Patientengruppen. Im Durchschnitt bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten mit CED und der direkte Vergleich jeweils innerhalb eines Patienten zeigte keine Korrelation zwischen der RNA-Expression und der Proteinexpression.

Neben HRNR als Protein mit seiner vollen Länge konnten auch zwei große HRNR-Fragmente – mit ca. 165 kDa (Fragment<sub>165 kDa</sub>) und 55 kDa (Fragment<sub>55 kDa</sub>) – detektiert werden (Abbildung 20C+D). Beide Fragmente wurden in allen untersuchten Proben, auch in der als Positivkontrolle mitgeführten Hautprobe, identifiziert. Fragment<sub>165 kDa</sub> war allerdings in deutlich geringerer Menge vorhanden als das Volllängenprotein und Fragment<sub>55 kDa</sub>. Fragment<sub>55 kDa</sub> zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Jedoch fand sich Fragment<sub>165 kDa</sub> im

Sigma von Patienten mit CU in signifikant niedriger Menge, sowohl in Relation zu den Kontrollen ( $p = 0,0068$ ) als auch zu MC ( $p = 0,0020$ ).



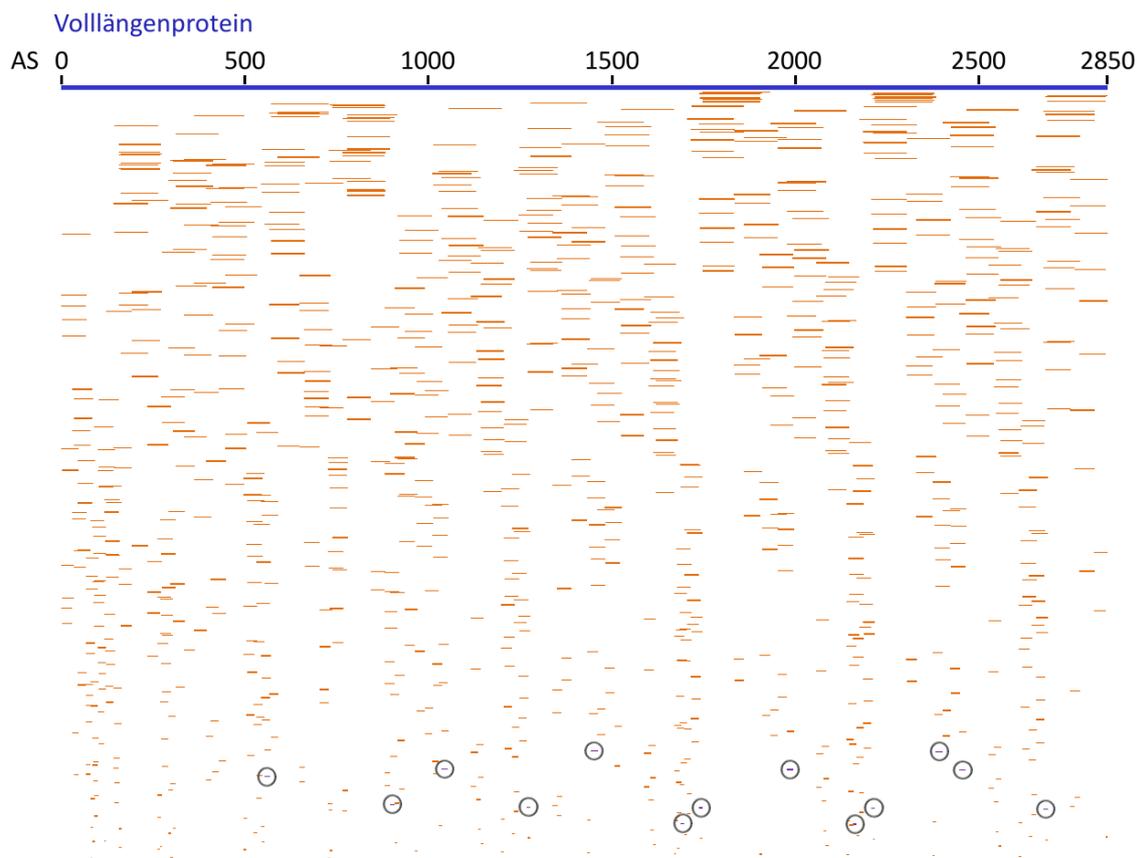
#### Abbildung 20: HRNR-Fragmente im Westernblot

Bei einer Auswahl von je zehn Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen (K) wurde die HRNR-Expression im Westernblot untersucht. (A) Auswahl der Patienten in orange anhand ihrer RNA-Expression. Dargestellt sind die RNA-Transkripte / 10 ng RNA der einzelnen Biopsien sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. \*\*  $p = 0,0011$ . (B) – (D) Analyse der HRNR-Expression im Westernblot. Dargestellt ist die Farbdichte der einzelnen Banden in der HRNR-Färbung relativ zur Färbung gegen  $\beta$ -Aktin, der Mittelwert  $\pm$  SEM sowie ein repräsentativer Ausschnitt der gegen HRNR gefärbten Blotting-Membran. Zusätzlich ist das Molekulargewicht des Volllängenproteins (B) sowie der beiden Fragmente (C+D) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. \*\*  $p < 0,01$ , ansonsten keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend zeigten sich im Westernblot keine signifikanten Unterschiede der HRNR-Expression zwischen Kontrollen und Patienten mit CED. Dabei bestand keine Korrelation zwischen der RNA- und der Proteinexpression. Jedoch konnten in allen Proben zwei große HRNR-Fragmente identifiziert werden. Im nächsten Schritt wurde die Entstehung möglicher HRNR-Fragmente im Darm genauer analysiert.

### 3.3.2 In silico Verdau von HRNR

Um die Anzahl und das Vorkommen möglicher HRNR-Fragmente im Darm zu untersuchen, wurde ein *in silico* Verdau des Proteins durchgeführt. Dafür wurden die humanen Proteasen Trypsin und Chymotrypsin verwendet, welche in großer Menge von der Bauchspeicheldrüse sezerniert werden und im Darm vorkommen (Whitcomb & Lowe, 2007). Die möglichen Schnittstellen der Proteasen sind in Tabelle 12 (Seite 41) aufgeführt, wobei maximal fünf Schnittstellen übersprungen wurden und nur Peptide mit einer minimalen Masse von 500 Da berücksichtigt wurden. Bei einem spezifischen Verdau mit Trypsin entstanden auf diese Weise 1028 Peptide (Abbildung 21), wovon 824 Peptide unterschiedliche Aminosäuresequenzen besaßen. Diese Differenz lässt sich durch den Aufbau des HRNRs aus repetitiven Sequenzen erklären. Zusätzlich wurde mit Trypsin und Chymotrypsin parallel verdaut. Dabei erhöhte sich die Zahl der verschiedenen Peptide nochmals auf 1307 (Abbildung 25 im Anhang). Dieser *in silico* Verdau zeigte, dass allein durch den Verdau mit zwei im Darm vorliegenden Proteasen eine große Anzahl unterschiedlicher HRNR-Fragmente entstehen könnten.



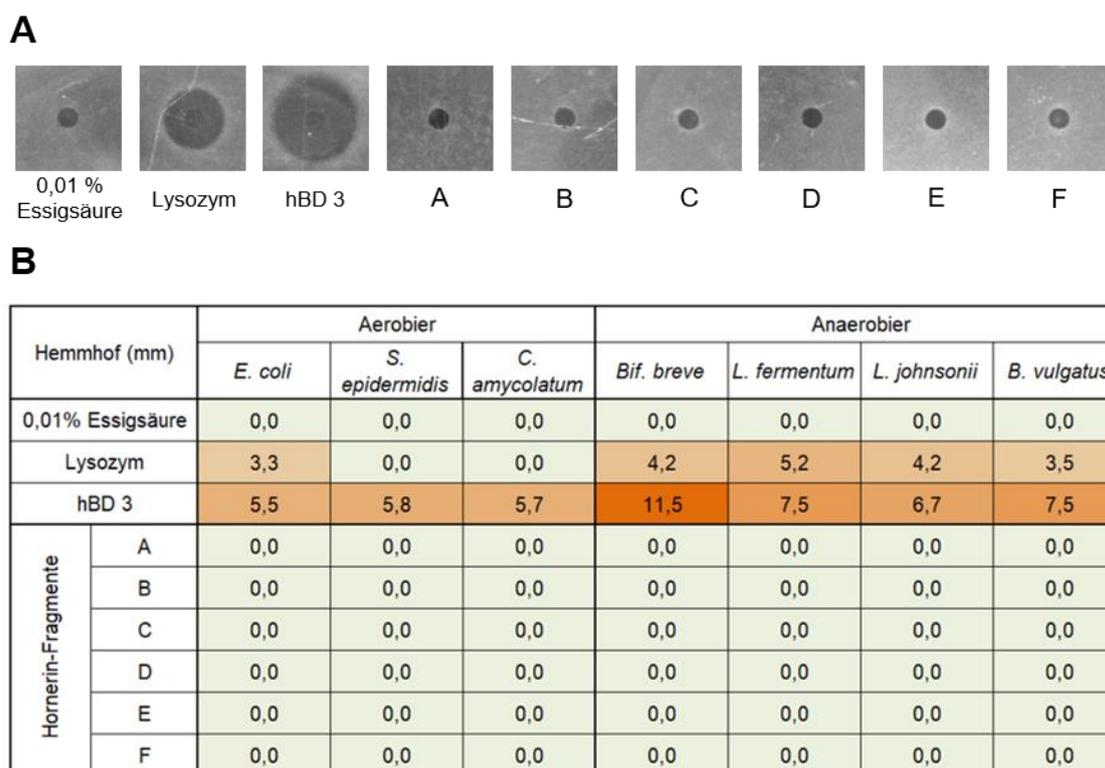
**Abbildung 21: *In silico* Verdau von HRNR mit Trypsin**

HRNR wurde *in silico* mit Trypsin verdaut. Dafür wurde eine hohe Spezifität des Enzyms gewählt und es wurden maximal fünf mögliche Schnittstellen übersprungen (Auflistung der Schnittstellen in Tabelle 12). Dargestellt sind ausschließlich Peptide mit einer Masse größer als 500 Da. In blau ist das Protein HRNR in voller Länge (2850 AS), in orange die einzelnen Fragmente dargestellt. Fragmente, welche später synthetisiert wurden, sind umkreist (Sequenzen der Peptide in Tabelle 1).

### 3.3.3 Analyse antimikrobieller Eigenschaften kleiner HRNR-Fragmente

Im nächsten Schritt wurden einige HRNR-Fragmente auf ihre Funktion hin überprüft. Dazu wurden aus einer Proteomics-Datenbank (Kim *et al.*, 2014) sechs HRNR-Fragmente aus dem Colon ausgewählt und synthetisiert (siehe 2.2.4.3). Gewählt wurden Fragmente, welche in möglichst großer Menge im Colon und im Rectum vorkommen sowie möglichst positiv geladen sind und viele Serine besitzen. Die ausgewählten Fragmente hatten eine Länge zwischen 9 und 19 Aminosäuren und die Sequenz der meisten Fragmente fanden sich an mehreren Stellen im Volllängenprotein. Die genauen Sequenzen und Längen der Fragmente sind in Tabelle 1 (Seite 23) aufgeführt.

Anschließend wurde die antimikrobielle Aktivität der HRNR-Fragmente im *Radial Diffusion Assay* (RDA) analysiert (Abbildung 22A). Dabei wurden sowohl Aerobier und Anaerobier als auch Kommensale des Darms und fakultativ pathogene Bakterien des Hautmikrobioms getestet. Die HRNR-Fragmente wurden jeweils in einer Konzentration von 4 µg / Stanze eingesetzt. In diesem Versuchsaufbau zeigte keines der HRNR-Fragmente antimikrobielle Eigenschaften (Abbildung 22B). Da im Colon und Rectum nahezu kein Sauerstoff vorhanden ist, wurden zusätzlich RDAs unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden pro Platte 20 µl Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP, 1 M) in das nährstoffarme Gel gegeben. Auch unter diesen Bedingungen zeigten die getesteten HRNR-Fragmente keine antimikrobielle Aktivität (Abbildung 26 im Anhang).



**Abbildung 22: Antimikrobielle Testung kleiner HRNR-Fragmente**

Sechs HRNR-Fragmente (A-F) wurden im *Radial Diffusion Assay* (RDA) in einer Konzentration von 4 µg / Stanze auf antimikrobielle Eigenschaften überprüft. Als Negativkontrolle wurde 0,01 %ige Essigsäure, als Positivkontrolle Lysozym (1 µg / Stanze) und humanes β-Defensin 3 (hBD3, 1 µg / Stanze) verwendet. (A) Repräsentative Abbildung eines RDA mit *L. fermentum*. (B) Dargestellt ist der Durchmesser der Hemmhöfe (in mm) abzüglich 2,5 mm des Stanzloches als Mittelwert aus drei Versuchen.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die intestinale Expression von HRNR beschrieben und charakterisiert. Zudem wurden mögliche Einflussfaktoren auf die HRNR-Expression untersucht und gezeigt, dass Patienten mit CED Unterschiede in der HRNR-Expression aufweisen. Da beobachtet wurde, dass HRNR häufig in Form von Fragmenten vorliegt, wurde darüber hinaus ein potenzieller Abbau durch intestinale Proteasen sowie eine antimikrobielle Funktion der HRNR-Fragmente analysiert. Im Folgenden wird die Bedeutung der HRNR-Expression im Darm und speziell bei CED sowie mögliche Funktionen des Proteins diskutiert. Außerdem werden einige Aspekte der Regulation der HRNR-Expression aufgezeigt.

### 4.1 Die intestinale HRNR-Expression

Bisher wurde HRNR insbesondere in der Haut analysiert, wo es auch erstmals entdeckt worden war (Makino *et al*, 2001; Takaishi *et al*, 2005). Das Protein hat vermutlich Funktionen in der Zelldifferenzierung und Bildung der Hornschicht und ist somit an der Ausbildung der Hautbarriere beteiligt (Takaishi *et al*, 2005; Henry *et al*, 2011; de Koning *et al*, 2012). Auch in einigen anderen Gewebetypen, wie der Brust, der Bauchspeicheldrüse und dem Auge, wurde die HRNR-Expression bereits untersucht (Fleming *et al*, 2012; Garreis *et al*, 2017; Gutknecht *et al*, 2017). Mehrere Proteom-Analysen zeigten, dass HRNR auch im Darm auftritt (Kim *et al*, 2014; Wang *et al*, 2015), jedoch gab es bisher keine genauere Beschreibung der HRNR-Expression im GI-Trakt.

#### 4.1.1 Humanes Darmepithel exprimiert HRNR

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass HRNR in großen Mengen auch im GI-Trakt exprimiert werden kann. Sowohl die Analyse der RNA-Expression (Abbildung 5) als auch der Proteinexpression in der Immunhistochemie (Abbildung 11) und im Westernblot (Abbildung 20A) verdeutlichten eine HRNR-Expression im Darm.

Die intestinale HRNR-Expression umfasste im Durchschnitt  $4,2 \times 10^2$  Kopien / 10 ng RNA im Ileum und  $7,2 \times 10^2$  Kopien / 10 ng RNA im Colon / Rectum (Abbildung 5A). Dabei war die durchschnittliche HRNR-Expression im

Colon / Rectum, und dort insbesondere im Sigma, signifikant höher als im Ileum (Abbildung 5). Dagegen wurde die HRNR-Expression in der Haut von Wu *et al.* mittels qPCR mit 0,1 - 3 Kopien / 10 ng RNA deutlich niedriger beschrieben (Wu *et al.*, 2009). Auch in der immunhistochemischen Färbung zeigte sich eine deutliche HRNR-Expression, ein klarer Unterschied zwischen Ileum und Colon bestand hier jedoch nicht. Da HRNR bereits mehrmals in der Haut mit verschiedenen Antikörpern nachgewiesen worden war (Takaishi *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2011; de Koning *et al.*, 2012), wurde im Westernblot und der immunhistochemischen Färbung Hautgewebe als Positivkontrolle mitgeführt (Abbildung 24C im Anhang). In diesen Hautproben bestand eine ähnlich ausgeprägte HRNR-Expression wie in den Darmproben. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass HRNR auch im Darm stark exprimiert wird, vermutlich in ähnlicher Größenordnung wie in der Haut. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene war die HRNR-Expression sehr variabel, was auch in der Haut beobachtet worden war und mit Arbeiten von Pellerin *et al.* übereinstimmt (Pellerin *et al.*, 2013). Die teilweise sehr hohen HRNR-Level können darauf hindeuten, dass HRNR im GI-Trakt eine wichtige Funktion besitzt. Welche dies sein könnte ist allerdings noch unklar. Auf eine mögliche Funktion wird in Kapitel 4.3.2 genauer eingegangen.

Lokalisiert wurde HRNR immunhistochemisch in den Epithelzellen, wobei die Becherzellen ausgespart waren (Abbildung 11). Die teilweise leichte Anfärbung des Bindegewebes sowie einzelne punktförmige Erscheinung traten auch in den Kontrollfärbungen mit geblocktem Antikörper auf und waren somit als unspezifisch zu werten (Abbildung 24 im Anhang). Des Weiteren zeigte sich im Ileum ein Gradient mit einer tendenziell stärkeren Färbung von HRNR in den Zotten als in den Krypten (Abbildung 13). Analog dazu war auch in bisherigen Analysen der Haut, sowie in Haarfollikeln, dem Augenlid und im Tränennasengang die HRNR-Expression zu den oberen Schichten hin zunehmend (Wu *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2011; Garreis *et al.*, 2017). Diese Daten stimmten mit dem in dieser Arbeit eingefärbten Hautgewebe überein (Abbildung 24C im Anhang). Im Tränennasengang und der Konjunktiva enthielten Becherzellen, wie bereits im Darmgewebe beobachtet, ebenfalls kein HRNR (Garreis *et al.*, 2017). Das verstärkte Auftreten in den oberen Schichten oder Bereichen des Epithels könnte durch eine Rolle des HRNRs in der Zelldifferenzierung bedingt sein. Henry *et al.* zeigte, dass HRNR innerhalb der Keratinozyten von perinukleär in

den unteren und mittleren Hautschichten in die Zellperipherie in den oberen Hautschichten wandert und dann zu einem Bestandteil der verhornenden Zellhülle (*cornified envelope*) wird (siehe Kapitel 1.3) (Henry *et al*, 2011). Das Darmepithel bildet zwar keine Hornschicht aus, aber auch dort wandern die Zellen im Laufe ihrer Differenzierung von den Krypten, wo die Stammzellen lokalisiert sind, zu den Villi und lösen sich schließlich vom Darmepithel ab (Gregorieff & Clevers, 2005). Dadurch könnte HRNR auch eine Funktion in diesem Differenzierungsprozess haben.

#### **4.1.2 Unterschiede in der HRNR-Expression in Patienten mit CED**

Einige Daten zeigen, dass bei Patienten mit Atopischer Dermatitis, Chronischem Handekzem und Psoriasis ein erniedrigtes HRNR-Level gegenüber gesunder Haut aufzufinden ist (Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Pellerin *et al*, 2013; Molin *et al*, 2015). All diese Erkrankungen gehen mit einer Störung der Hautbarriere einher. Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) liegt eine Barrierestörung zugrunde (siehe auch Kapitel 1.2) (Wehkamp *et al*, 2005, 2008; Ostaff *et al*, 2013), weshalb in dieser Arbeit die HRNR-Expression bei Patienten mit CED erstmalig untersucht wurde.

In der Expressionsanalyse von HRNR mittels qPCR fielen teilweise Unterschiede zwischen Patienten mit CED und Kontrollen auf. Im Ileum bestanden keine signifikanten Unterschiede in der HRNR-Expression zwischen Patienten mit CED und Kontrollen. Jedoch war im Colon / Rectum die HRNR-Expression sowohl in Patienten mit Morbus Crohn (MC) als auch mit Colitis ulcerosa (CU) im Schnitt signifikant niedriger als in Kontrollen (Abbildung 6A). Interessanterweise zeigte sich im Sigma von Kontrollen und Patienten mit MC jeweils eine Gruppe mit deutlich überdurchschnittlichen HRNR-Werten, welche in Patienten mit CU fehlte (orangener Kasten in Abbildung 6A). Diese hohe HRNR-Expression begrenzte sich hauptsächlich auf das Sigma (Abbildung 6B). Daraufhin wurde untersucht, welche Faktoren für diese Unterschiede sowie für die Variabilität der HRNR-Expression insgesamt verantwortlich sein könnten. Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Entzündungsaktivität (Abbildung 7), der Lokalisierung des MC (Abbildung 8), dem Alter (Abbildung 9) oder dem Geschlecht (Abbildung 10) und dem HRNR-Level ausgeschlossen werden.

Weitere potenzielle Einflussfaktoren wie Medikamenteneinnahme, genetischer Hintergrund und Ernährung wurden nicht näher betrachtet.

Die Unterschiede in Patienten mit CED in der HRNR-Expression wurden ebenfalls auf Proteinebene im Westernblot (Abbildung 20) und immunhistochemisch (Abbildung 11 + Abbildung 12) untersucht. Dort traten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten mit CED auf. Es bestand also keine Korrelation zwischen der RNA- und der Proteinexpression, wie auch ein direkter Vergleich der Analyse mittels qPCR und Westernblot von Biopsien desselben Patienten nochmals verdeutlichte. Prinzipiell könnten diese Unterschiede durch die Detektion verschiedener Abschnitte des HRNRs mit dem Antikörper und den Primern zustande kommen. Hier detektierten die Primer jedoch einen Abschnitt der mRNA, welcher für Aminosäuren kodiert, die im Bindungsbereich des Antikörpers lagen. Verschiedene Regulationsmechanismen auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene könnten jedoch einen Einfluss haben. Des Weiteren zeigte die HRNR-Expression eine große Variabilität, sowohl zwischen den Patienten als auch auf lokaler Ebene. In der Immunhistochemie variierte die Färbung teilweise auch innerhalb eines Schnittes deutlich und die RNA-Level verschiedener Darmabschnitte desselben Patienten korrelierten nicht miteinander. Die HRNR-Expression könnte damit zu einem wesentlichen Teil auch lokalen Regulationsmechanismen unterliegen. Möglicherweise unterschied sich also das HRNR-Level zwischen zwei Biopsien desselben Patienten deutlich. Dieses Phänomen könnte durch die parallele Isolation der RNA und des Proteins aus einer Biopsie weiter analysiert werden.

## 4.2 Aspekte der Regulation von HRNR

Bisher wurde HRNR vor allem Aufgaben in der Zelldifferenzierung zugeschrieben. Das HRNR-Gen liegt auf Chromosom 1q21 im sogenannten epidermalen Differenzierungskomplex, gemeinsam mit anderen Proteinen (u. a. Filaggrin), welche eine Funktion in der Ausbildung der Hautbarriere besitzen (Takaishi *et al*, 2005; Kyriotou *et al*, 2012). Dazu passend wurden in sich regenerierender Haut, z. B. während der Wundheilung, vorübergehend gesteigert HRNR-Werte gemessen (Takaishi *et al*, 2005; Henry *et al*, 2011; de Koning *et al*, 2012). Zudem wurde sowohl bei einer durch Calcium induzierten Zelldifferenzierung von Keratinozyten (Henry *et al*, 2011;

Makino *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2009) als auch in durch UV-B-Licht zur Hyperproliferation angeregter Haut (Makino *et al.*, 2014) eine erhöhte HRNR-Expression beobachtet.

In mehreren Arbeiten wurde außerdem beschrieben, dass HRNR über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor) induziert werden kann (Sutter *et al.*, 2011; van den Bogaard *et al.*, 2013; Kennedy *et al.*, 2013). Starke Induktoren des Ah-Rezeptors sind sowohl (häufig toxische) Stoffe aus der Umwelt wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine (u. a. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD)) und Flavonoide, als auch endogene Liganden wie Metabolite des Tryptophans (Rannug *et al.*, 1995; Öberg *et al.*, 2005; Nguyen & Bradfield, 2008; Hubbard *et al.*, 2015). Kohleteer induziert über die Aktivierung des Ah-Rezeptors verschiedene Differenzierungsproteine, u. a. HRNR und Filaggrin. Bei Patienten mit Atopischer Dermatitis, bei welchen zudem erniedrigte HRNR-Level detektiert wurden, konnte durch die äußerliche Anwendung von Kohleteer eine Reduktion der Entzündungsaktivität und des Juckreizes erzielt werden (van den Bogaard *et al.*, 2013).

Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Expression des Ah-Rezeptors und CED, wobei er schützende Effekte zu haben scheint. Bei Patienten mit MC, aber nicht bei CU, zeigte sich im entzündeten Gewebe eine verminderte Expression des Ah-Rezeptors gegenüber Kontrollen und Abschnitten ohne Entzündung (Monteleone *et al.*, 2011, 2013). Darüber hinaus konnte in verschiedenen Colitis-Modellen bei Mäusen durch die Aktivierung des Ah-Rezeptor ein Rückgang der Entzündungsaktivität beobachtet werden (Monteleone *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2018). Dagegen beschrieb Arsenescu *et al.*, in Patienten mit MC eine vermehrte Aktivität des AhR-Stoffwechselweges (Arsenescu *et al.*, 2011). Interessanterweise wiesen Stuhlproben von Patienten mit CED eine geringere Fähigkeit zur Aktivierung des Ah-Rezeptors auf als Stuhlproben von Kontrollprobanden (Lamas *et al.*, 2016).

Der starke AhR-Ligand 6-Formylindolo(3,2-b)carbazol (FICZ) ist ein Photoprodukt des Tryptophans, welches auch in Zellkultur-Medium (ZK) unter Einfluss von UV-Licht und von sichtbarem Licht entsteht (Rannug *et al.*, 1995; Öberg *et al.*, 2005). Somit stellte sich zunächst die Frage, ob auch in dem in dieser Arbeit angewandten Zellkultur-Modell HRNR durch die Einstrahlung von Licht über die

Entstehung von FICZ induziert wird. Licht könnte dadurch in Zellkultur-Experimenten einen Störfaktor darstellen. Um das zu testen, wurden Zellen mit ZK-Medium stimuliert, welches zuvor zwischen 0 und 2 h mit UV-C-Licht bestrahlt wurde. Um eine FICZ-Entstehung bereits vor Versuchsbeginn auszuschließen, wurde zudem Tryptophan erst nachträglich zum ZK-Medium hinzugefügt und das Medium dann kontrolliert bestrahlt. Außerdem wurden verschiedene Stimulationsdauern getestet (3 h, 7h, 18 h, 48 h). Bei keinem der Versuche zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Lichtexposition des ZK-Mediums auf die HRNR-Expression (Abbildung 15 + Abbildung 16). Damit ist sehr unwahrscheinlich, dass Lichtschwankungen bei normalem Arbeiten in der Zellkultur die HRNR-Expression beeinflussten und somit konnte der Einfluss von Licht für das Zellkultur-Modell in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Es wurde allerdings beschrieben, dass FICZ nur zu einer transienten Induktion AhR-abhängiger Produkte führt, da es enzymatisch schnell wieder abgebaut wird (Bergander *et al.*, 2003, 2004; Öberg *et al.*, 2005). Somit könnte eine HRNR-Induktion zu den untersuchten Zeitpunkten nicht mehr erfasst worden sein. Darüber hinaus könnten die in dieser Arbeit verwendeten Zellen nur geringe Mengen des Ah-Rezeptors exprimiert haben, obwohl die Zelllinie LS174T bereits in anderem Zusammenhang zur Untersuchung AhR-vermittelter Stoffwechselwege verwendet wurde (Tompkins *et al.*, 2010; Kamenickova *et al.*, 2013). Viele AhR-Liganden sind ein Bestandteil der Nahrung oder werden durch den Metabolismus von Bakterien im GI-Trakt produziert (Perdew & Babbs, 1991; Zelante *et al.*, 2013; Hubbard *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 2016). Denkbar wäre, dass ein Teil der HRNR-Expression im Darm über den AhR-Stoffwechselweg lokal reguliert wird.

Interessanterweise konnte in den hier durchgeführten Zellkulturexperimenten jedoch ein Anstieg der HRNR-Expression mit der Zeit beobachtet werden. Die HRNR-Level waren nach 18 h und nochmals nach 48 h Stimulation deutlich höher als nach 3 h und 7 h (Abbildung 16). Mit längerer Kultivierungsdauer stieg auch die Dichte der Zellen. Möglicherweise wurde HRNR durch einen stärkeren Zellverbund oder eine damit verbundene Stressreaktion induziert. Fleming *et al.* beschrieben bereits eine erhöhte HRNR-Expression als Antwort auf die Induktion von Apoptose und Zellnekrose durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 5-Fluoruracil (Fleming *et al.*, 2012) und auch hypoxische Umgebungsbedingungen induzierten HRNR (Garreis *et al.*, 2017). Zudem scheint

HRNR bei der Tumorprogression und der Ausbildung von Blutgefäßen eine Rolle zu spielen. HRNR wurde in den Endothelzellen verschiedener Tumore exprimiert. Außerdem induzierte sogenanntes *tumor-conditioned medium* – ZK-Medium, welches zuvor unter dem Einfluss von Tumorzellen stand – die HRNR-Expression (Gutknecht *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2018). Somit könnte HRNR im Rahmen vermehrten Zellwachstums exprimiert werden und in diesem Zusammenhang wichtige Funktionen, wie z. B. die Ausbildung von Blutgefäßen, vermitteln.

Da der vermehrte Kontakt und die Invasion von Bakterien ins Darmepithel ein wichtiger Teil der Pathogenese von CED sind, wurde insbesondere der Einfluss bakterieller Bestandteile auf die HRNR-Expression untersucht. Getestet wurden das probiotische Bakterium *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor®), Lipopolysaccharide (LPS), welche als Bestandteil der Zellhülle gram-negativer Bakterien häufig Entzündungsreaktionen auslösen (Sweet & Hume, 1996; Qureshi *et al.*, 1999), und der Bakterienmix SIHUMI (*simplified human intestinal microbiota*, Zusammensetzung in Tabelle 3, S. 24), ein vereinfachtes Modell der humanen Darmflora in Ratten (Becker *et al.*, 2011). Zusätzlich zu den epithelialen Darm-Zelllinien LS174T und HCT116 wurden Biopsien von Patienten mit CED und Kontrollen *ex vivo* kultiviert und mit *E. coli* Nissle 1917 stimuliert. Durch die Stimulation mit den bakteriellen Bestandteilen zeigte sich fast durchgängig ein Trend zu höheren HRNR-Werten, jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 17 + Abbildung 18). Garreis *et al.* testeten ebenfalls den Einfluss bakterieller Bestandteile, wobei die Stimulation mit dem Überstand von *S. aureus* auf Zellen des Cornealepithels eine signifikante HRNR-Induktion zeigte, jedoch nicht auf Zellen der Konjunktiva. *P. aeruginosa* und *E. coli* hatten keinen signifikanten Effekt (Garreis *et al.*, 2017). Dagegen sank die HRNR-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Cytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, IL-25, TNF $\alpha$ ) in Keratinozyten und Zellen des Cornealepithels (Pellerin *et al.*, 2013; Garreis *et al.*, 2017).

Aus den hier generierten Daten wurde ersichtlich, dass die HRNR-Expression bereits durch die alleinige Kultivierung der Biopsien in ZK-Medium stark anstieg, wobei die HRNR-Induktion in Patienten mit MC und CU stärker ausgeprägt war als in Kontrollen (Abbildung 18). Auch wenn die Zelllinie LS174T keine Effekte durch lichtexponiertes ZK-Medium gezeigt hatte, könnte in den Biopsien wie oben beschrieben HRNR durch die Aktivierung des Ah-Rezeptors, z. B. über Metabolite des

Tryptophans, induziert worden sein. Ebenfalls denkbar wäre eine Stressantwort analog zur oben beschriebenen HRNR-Steigerung in der Zellkultur mit zunehmender Kultivierungsdauer und Zelldichte. Ein Bestandteil des ZK-Mediums ist außerdem 10 % fetales Kälberserum (FCS), welches unter anderem viele Proteine, Wachstumsfaktoren und Hormone enthält und dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist (Aswad *et al.*, 2016). Um eine FCS-vermittelte HRNR-Induktion zu testen, wurde versucht Zellen (LS174T) in ZK-Medium ohne Hinzugabe von FCS zu kultivieren. Die Zellen starben dabei jedoch nach kurzer Zeit. Garreis *et al.* konnten allerdings bei der Kultivierung der Zelllinie HMGEC in Medium mit Serum eine deutlich höhere HRNR-Expression gegenüber der Kultivierung in serumfreiem Medium beobachten (Garreis *et al.*, 2017). Somit könnten Inhaltsstoffe des FCS für die gesteigerte HRNR-Expression verantwortlich sein. Welche Bestandteile des ZK-Mediums genau eine HRNR-Induktion hervorrufen bleibt jedoch weiterhin unklar.

Zudem wurde ein möglicher Einfluss von Histondeacetylasen (HDACs) auf die HRNR-Expression untersucht. HDACs stellen einen Teil der epigenetischen Regulation dar, indem sie über die Modifikation von Histonen die Ablesbarkeit der DNA verändern. Bei DSS-induzierter Colitis in Mäusen konnte die Entzündungsaktivität durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren gesenkt werden und somit kommen HDACs möglicherweise eine wichtige Bedeutung bei CED zu (Glauben *et al.*, 2006, 2008; Felice *et al.*, 2015). Die Behandlung der Zellen mit HDAC-Inhibitoren zeigte allerdings keine Auswirkungen auf die HRNR-Expression (Abbildung 19).

Darüber hinaus wies Takaishi *et al.* in der Haut unprozessierte HRNR-RNA nach, welche noch eine Intronsequenz enthielt. Diese RNA war auch in gesunder Haut vorhanden, während reife mRNA von Takaishi *et al.* nur in regenerierender Haut detektiert werden konnte. Ein weiterer Teil der Regulation der HRNR-Expression könnte damit auch erst auf RNA-Ebene stattfinden (Takaishi *et al.*, 2005).

### 4.3 HRNR-Fragmente und ihre Funktionen

#### 4.3.1 Fragmentierung als Möglichkeit der Aktivitätsregulierung und Vervielfältigung

Eine weitere Möglichkeit die HRNR-Aktivität zu regulieren und auch zu vervielfältigen könnte die Fragmentierung des Proteins darstellen.

Bei der Analyse der intestinalen HRNR-Expression mittels Westernblot wurden HRNR-spezifische Banden detektiert, welche niedrigere molekulare Massen (ca. 165 kDa und 55 kDa) als das Volllängen-Protein (ca. 295 kDa) besaßen (Abbildung 20). Diese traten konstant in allen Darmproben sowie der als Kontrolle mitgeführten Hautprobe auf. HRNR scheint also im Gastrointestinal-Trakt (GI-Trakt) zu einem großen Teil in Form von Fragmenten vorzuliegen. Da der verwendete Antikörper nur einen kleinen Ausschnitt im aminoterminalen Bereich des Proteins detektierte, stellen die beobachteten Fragmente vermutlich nur einen kleinen Ausschnitt der im Darm vorkommenden HRNR-Fragmente dar. Hinzukommen könnten noch deutlich kleinere Fragmente, welche im verwendeten Versuchsaufbau nicht detektiert wurden. Diese These wurde in anderen Gewebetypen durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt (Takaishi *et al*, 2005; Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Fleming *et al*, 2012; Hsu *et al*, 2017; Garreis *et al*, 2017). Mithilfe von verschiedenen Antikörpern wurde zudem gezeigt, dass sich die Zusammensetzung der HRNR-Fragmente je nach Lokalisation in der Haut (Wu *et al*, 2009) oder zwischen verschiedenen Brust-Zelllinien (Fleming *et al*, 2012) unterscheidet.

Im nächsten Schritt wurde die Fragmentierung von HRNR im GI-Trakt theoretisch weiter untersucht. Dazu wurde beispielhaft ein *in silico* Verdau mit den im Darm vorkommenden Proteasen Trypsin und Chymotrypsin durchgeführt. Beide Proteasen, insbesondere Trypsin, machen einen großen Anteil der Proteine des Bauchspeicheldrüsensekrets aus und erfüllen wichtige Aufgaben in der Regulation von Verdauungsenzymen (Whitcomb & Lowe, 2007). HRNR besitzt 181 potenzielle Schnittstellen für Trypsin und nochmals 179 Weitere für Chymotrypsin. Damit entstanden im *in silico* Verdau mit Trypsin 824 unterschiedliche Peptide (mit > 500 Da, maximal fünf übersprungene Schnittstellen) (Abbildung 21). Ein zusätzlicher Verdau mit Chymotrypsin erhöhte diese Zahl etwa auf das 1,5fache (Abbildung 25 im Anhang).

Darüber hinaus treten im GI-Trakt viele weitere Proteasen auf, wobei neben den humanen Proteasen zusätzlich auch bakterielle Proteasen vorliegen können (Steck *et al.*, 2012). Die Vielfalt potenzieller HRNR-Fragmente durch den Einfluss von Proteasen ist also sehr groß. In diesem Zusammenhang zeigte die Arbeit von Herrn Latendorf außerdem, dass einzelne HRNR-Fragmente bereits durch sehr kleine Mengen verschiedener Proteasen gespalten werden und damit meist deutlich anfälliger gegenüber Proteolyse sind als beispielsweise Proteine wie BSA oder Cytochrom C (Latendorf, 2015). Zudem wurde durch eine Citrullinierung von HRNR beim Verdau mit einigen Proteasen eine veränderte Proteolyseempfindlichkeit beobachtet (Latendorf, 2015; Hsu *et al.*, 2017). Posttranslationale Prozessierung könnte somit ein wichtiger Mechanismus der Regulation der HRNR-Aktivität darstellen. Zudem könnten verschiedene Fragmente auch unterschiedliche Funktionen erfüllen (Wu *et al.*, 2009; Fleming *et al.*, 2012; Latendorf, 2015; Hsu *et al.*, 2017). Aus diesen Gründen sollte zukünftig in der Erforschung der Expression und Funktion von HRNR ein verstärktes Augenmerk auf der posttranslationalen Prozessierung und insbesondere auf der Charakterisierung und Funktion einzelner Fragmente liegen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Erstellung und der Vergleich von Fragmentprofilen an unterschiedlichen Stellen des GI-Traktes sowie bei Patienten mit CED, z. B. mittels Massenspektrometrie.

#### **4.3.2 Antimikrobielle Eigenschaften von HRNR-Fragmenten**

Einen wichtigen Bestandteil der intestinalen Barriere stellen antimikrobielle Substanzen dar. Sie tragen zur Kontrolle des Bakterienwachstums bei und verhindern den übermäßigen Kontakt von Bakterien mit der Darmschleimhaut, welcher essentiell zur Entstehung von CED beiträgt. Passend dazu wurde bei MC eine verminderte Expression verschiedener antimikrobieller Peptide (AMPs) – u. a. HD5, HD6, hBD1 und hBD2 – beobachtet (Wehkamp *et al.*, 2005, 2008; Ostaff *et al.*, 2013).

Wu und Latendorf konnten zeigen, dass verschiedene Fragmente des HRNRs ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Sie isolierten und charakterisierten HRNR-Fragmente aus dem *Stratum corneum* der Haut und exprimierten diese rekombinant für eine genauere Analyse. Dabei besaßen Fragmente aus den repetitiven Bereichen sowie ein Fragment aus dem carboxyterminalen Ende eine antimikrobielle

Wirkung gegen die gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie teilweise gegen den Pilz *Candida albicans* (Wu, 2005; Latendorf, 2015). Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Wu und Latendorf, dass die antimikrobiellen Eigenschaften der HRNR-Fragmente eine weitere Funktion des HRNR darstellen könnten, welche zum Barrierschutz der Haut beiträgt. Eine nachträgliche Aktivierung der antimikrobiellen Wirkung durch Proteolyse sowie die potenzielle Möglichkeit der Inaktivierung durch posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Citrullinierung, könnten zudem die Entwicklung von Resistenzen erschweren (Wu, 2005; Latendorf, 2015). Zudem beschrieben kürzlich Gerstel *et al.*, dass mit verschiedenen HRNR-Fragmenten stimulierte *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* intracytoplasmatische Protein-Agglomerate bildeten und die Bakterienzellen schließlich lysierten. Sie beobachteten außerdem eine Interaktion der HRNR-Fragmente mit verschiedenen ribosomalen Proteinen von *Escherichia coli*, was diese als wahrscheinlichen Angriffspunkt der antimikrobiellen Wirkung identifizierte (Gerstel *et al.*, 2018).

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob auch Fragmente aus dem Darm antimikrobiell aktiv sind. In diesem Rahmen konnten jedoch keine HRNR-Fragmente aus dem Darm isoliert werden. Aufgrund der Größe (2850 AS) und der repetitiven Struktur von HRNR ist eine rekombinante Herstellung des gesamten Proteins bisher nicht möglich gewesen. Lediglich Fragmente mit einer Länge von bis zu 132 AS und 13,1 kDa konnten exprimiert werden (Fleming *et al.*, 2012; Latendorf, 2015). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit eine Proteom-Datenbank (Kim *et al.*, 2014) zu Hilfe genommen. Daraus wurden sechs HRNR-Fragmente mit 9 – 19 AS, welche in möglichst großer Menge im Colon und Rectum vorlagen und eine möglichst positive Ladung besaßen, ausgewählt und synthetisiert (siehe Tabelle 1, S. 23). Die antimikrobielle Aktivität dieser Fragmente wurde dann im *Radial Diffusion Assay* (RDA) gegen verschiedene kommensale und pathogene Bakterien getestet, wobei sich jedoch keine antimikrobielle Wirkung zeigte (Abbildung 22). Manche AMPs, wie hBD1 (Schroeder *et al.*, 2011; Raschig *et al.*, 2017; Wendler *et al.*, 2018) und HD6 (Schroeder *et al.*, 2015), besitzen unter reduzierenden Bedingungen ein anderes Wirkspektrum als in ihrer oxidierten Form. Deshalb wurden die HRNR-Fragmente auch

unter reduzierenden Bedingungen getestet. Doch auch hier ließ sich keine antimikrobielle Wirkung beobachten (Abbildung 26 im Anhang).

Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass im Darm antimikrobiell aktive HRNR-Fragmente vorliegen. Im Rahmen der Proteom-Analyse wurden die Gewebeprobe(n) zunächst mit Trypsin verdaut bevor sie bekannten Proteinen zugeordnet wurden (Abbildung 4). Die detektierten Fragmente entsprachen somit nicht zwangsläufig den *in vivo* vorliegenden Fragmenten, obwohl der Einfluss der Protease Trypsin im Darm wahrscheinlich ist, da sie den größten Teil der von der Bauchspeicheldrüse sezernierten Proteine ausmacht (Whitcomb & Lowe, 2007). Allerdings nimmt die Tryptase-Aktivität entlang der Darmpassage zunehmend ab (Layer *et al.*, 1986). Deshalb war HRNR vermutlich auch in Form von größeren Fragmenten, welche aus den detektierten Teilen zusammengesetzt sind, vorhanden. Zudem wurden die zu analysierenden Proben in der Proteom-Analyse von Spendern *post mortem* entnommen, wenn auch ohne großen Zeitverzug, wodurch sich die Umgebungsbedingungen verändert haben könnten.

Die in dieser Arbeit untersuchten HRNR-Fragmente waren mit einer Länge von 9 – 19 AS deutlich kleiner als die antimikrobiell wirksamen Fragmente von Wu und Latendorf, welche mit einer Länge von 27 – 132 AS eher im mittleren Bereich der bisher bekannten humanen AMPs (10 – 149 AS) lagen (Wu, 2005; Wang, 2014; Latendorf, 2015). HRNR als Protein in seiner vollen Länge ist mit 2850 AS jedoch deutlich größer. Zudem wurde gezeigt, dass die positiv geladene Aminosäure Arginin für die antimikrobielle Aktivität dieser Fragmente essentiell war. Wurden die positiv geladenen Arginine in den HRNR-Fragmenten citrulliniert, war der antimikrobielle Effekt fast vollständig aufgehoben (Latendorf, 2015). Dies steht im Einklang mit der typischen Struktur anderer AMPs, welche sich meistens durch eine positive Gesamtladung auszeichnen (durchschnittlich +5,6 bei humanen AMPs) (Wang, 2014). Die in dieser Arbeit untersuchten HRNR-Fragmente besaßen dagegen eine Nettoladung von 0 oder +1 und bis zu zwei Histidine, welche je nach pH-Wert zusätzlich positiv geladen sein können. Die von Latendorf analysierten Fragmente wiesen (ohne Berücksichtigung der Histidine) Nettoladungen zwischen -1 und +8 auf. Somit wäre möglich, dass die hier untersuchten HRNR-Fragmente durch vorherige Proteolyse, insbesondere auch durch Trypsin im Rahmen der Proteom-Analyse, zu stark degradiert

worden sind und damit auch zu wenig positive Ladung aufweisen, um eine antimikrobielle Aktivität zu besitzen.

Interessanterweise zeigten die von Latendorf untersuchten HRNR-Fragmente entgegen der meisten AMPs keine klaren Sekundärstrukturen (Cederlund *et al*, 2011; Latendorf, 2015). Allerdings gibt es auch bekannte AMPs, welche in ihrer aktiven, reduzierten Form keine geordnete Sekundärstruktur besitzen, wie humanes Beta-Defensin 1 (hBD1) (Schroeder *et al*, 2011) und humanes Alpha-Defensin 6 (HD6) (Schroeder *et al*, 2015). Es wurde vermutet, dass HRNR Oligomer-Komplexe bildet, welche für die antimikrobielle Aktivität von Bedeutung sein könnten (Wu *et al*, 2009; Garreis *et al*, 2017).

Des Weiteren hatte sich in Latendorfs Dissertation gezeigt, dass die Umgebungsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität haben. Bei einem für die Haut physiologischen pH-Wert von 5,5 bzw. 5,0 zeigte sich meistens eine höhere antimikrobielle Wirkung als bei einem pH von 7,3. Zusätzlich führten höhere Salz- und Nährstoffkonzentrationen tendenziell zu einer abgeschwächten oder sogar aufgehobenen Aktivität (Latendorf, 2015). Weiterführende Testungen unter anderen Umgebungsbedingungen und mit anderen Bakterien sind nachfolgenden Arbeiten vorbehalten.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die HRNR-Expression im Darm beschrieben. Die intestinale HRNR-Expression war teilweise sehr hoch aber auch sehr variabel ausgeprägt und vermutlich in ähnlicher Größenordnung wie in der Haut. Dabei war HRNR in den Epithelzellen lokalisiert und im Colon / Rectum, insbesondere im Sigma, befand sich im Schnitt mehr HRNR als im Ileum. Zusätzlich wurde HRNR erstmalig im Zusammenhang mit CED untersucht. Sowohl bei Patienten mit MC als auch bei Patienten mit CU zeigte sich im Colon / Rectum durchschnittlich eine verminderte HRNR-Expression. Dabei fiel in Kontrollen und MC eine Gruppe mit deutlich überdurchschnittlichen HRNR-Werten auf, welche in CU fehlte. Unklar ist bislang durch welche Faktoren diese Unterschiede zustande kamen und ob sie eine Relevanz für die Erkrankungen haben. Verschiedene patientenbezogene Faktoren, wie Entzündungsstatus, Alter und Geschlecht hatten keinen Einfluss auf die HRNR-Expression. Vermutlich spielen in der Regulation der HRNR-Expression auch lokale Faktoren eine wichtige Rolle.

Ebenfalls ist bislang nicht bekannt, welche Funktionen HRNR im Darm hat. Analog zur Haut und im Einklang mit eigenen Beobachtungen könnte HRNR Aufgaben im Zellwachstum und der Zelldifferenzierung haben (Takaishi *et al*, 2005; Wu *et al*, 2009; Henry *et al*, 2011; Makino *et al*, 2014; Gutknecht *et al*, 2017). Zudem wurde für HRNR-Fragmente aus der Haut eine antimikrobielle Aktivität beobachtet (Latendorf, 2015). Somit könnte HRNR auch im Darm über Funktionen in der Differenzierung der Epithelzellen und der Abwehr von Mikroorganismen zur Aufrechterhaltung der Barriere beitragen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HRNR auch im Darm zu einem großen Teil in Form von Fragmenten vorliegen kann und dass hier potenziell eine sehr große Vielfalt an HRNR-Fragmenten entstehen kann. Die posttranslationale Modifikation des Proteins könnte somit sowohl eine Form der Aktivitätsregulierung sein als auch verschiedene Aufgaben durch ein einziges Protein ermöglichen. Deshalb sollte in zukünftigen Experimenten ein verstärktes Augenmerk auf dem Vorliegen und der Funktion einzelner HRNR-Fragmente liegen. In diesem Zusammenhang wurden kleine HRNR-Fragmente aus dem Darm auf antimikrobielle Eigenschaften untersucht. Sie

zeigten jedoch unter den getesteten Bedingungen keine antimikrobielle Aktivität. Weiterführend sollte die Fragmentbildung im menschlichen Darm genauer untersucht werden, indem ein Fragmentprofil für HRNR in Kontrollen und Patienten mit MC und CU erstellt wird. Zusätzlich könnten diese Fragmente dann rekombinant exprimiert werden und ihre Funktion, insbesondere ihre antimikrobiellen Eigenschaften, analysiert werden. Dabei sollte die antimikrobielle Aktivität auch unter verschiedenen Umgebungsbedingungen, u. a. verschiedene Salz- und Nährstoffgehalte und in reduzierendem Milieu, getestet werden.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie bei CED. Die hohe intestinale Expression von HRNR weist auf eine wichtige Funktion des Proteins im Darm hin und die Unterschiede zwischen den Patientengruppen deuten zusätzlich auf eine mögliche pathophysiologische Bedeutung des HRNRs in CED. Darüber hinaus scheint der Fragmentierung des Proteins eine wichtige Bedeutung in der Funktion und Regulation des Proteins zuzukommen. Um die Funktionen von HRNR im Darm und insbesondere im Zusammenhang mit CED noch besser zu verstehen und potenzielle Therapieansätze zu identifizieren, ist noch weitere Forschung notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Das Protein Hornerin (HRNR) wurde zunächst in der Haut entdeckt und scheint eine wichtige Rolle bei der Bildung der Hautbarriere zu spielen. Bei Erkrankungen wie Psoriasis und atopischer Dermatitis, bei welchen die epidermale Barriere gestört ist, zeigten sich verminderte HRNR-Level. Ein wichtiger Bestandteil des Pathomechanismus chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) ist ebenfalls die Störung der intestinalen Barriere.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die HRNR-Expression im Gastrointestinal-Trakt (GI-Trakt) beschrieben. Dazu wurden Biopsien aus verschiedenen Darmabschnitten analysiert. Die HRNR-Expression im Darm war teilweise sehr hoch, jedoch insgesamt sehr variabel. Im Colon, und dort insbesondere im Sigma, zeigten sich durchschnittlich signifikant höhere HRNR-Level als im Ileum. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal das Vorkommen von HRNR in CED untersucht. Im Colon war die HRNR-Expression sowohl in Patienten mit Morbus Crohn (MC) als auch mit Colitis ulcerosa (CU) im Vergleich zu Kontrollen im Schnitt signifikant erniedrigt. Dabei zeigte sich im Sigma von Kontrollen und MC eine Gruppe mit überdurchschnittlich hohen HRNR-Werten, welche in CU fehlte. Auf Proteinebene in immunhistochemischen Färbungen und im Westernblot konnten diese Unterschiede allerdings nicht beobachtet werden. Eine Korrelation zwischen der HRNR-Expression und den patientenbezogenen Faktoren Entzündungsstatus, Befallsmuster bei MC, Alter und Geschlecht bestand nicht.

Zusätzlich wurden einige mögliche Regulationswege von HRNR untersucht. Insbesondere wurde der Einfluss von bakteriellen Bestandteilen (LPS, *E. coli* Nissle 1917, SIHUMI) in verschiedenen Zelllinien und in humanen Biopsien analysiert. Dabei zeigte sich lediglich ein Trend zu höheren HRNR-Werten bei Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnte HRNR allein durch die Kultivierung mit Zellkulturmedium stark induziert werden, insbesondere auch in den Biopsien von Patienten mit MC und CU.

Des Weiteren wurde eine mögliche Funktion des HRNRs untersucht. In anderen Organen, u. a. der Haut und im Brustgewebe, wurde bereits beobachtet, dass HRNR häufig in Form von Fragmenten vorliegt. Für HRNR-Fragmente aus der Haut wurde

darüber hinaus eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HRNR auch im Darm fragmentiert vorliegen kann und potenziell eine große Vielfalt von Fragmenten möglich ist. Daraufhin wurden kleine HRNR-Fragmente aus dem Darm auf antimikrobielle Eigenschaften untersucht. Sie zeigten unter den getesteten Bedingungen jedoch keine antimikrobielle Aktivität.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass HRNR aufgrund der teilweise sehr hohen Expression auch im Darm eine wichtige Rolle spielt, mutmaßlich im Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, antimikrobiellen Abwehr und Bildung der intestinalen Barriere. Möglicherweise kommt dem Protein durch die beobachteten Unterschiede zwischen den Patientengruppen eine pathophysiologische Bedeutung bei CED zu. Eine besondere Rolle könnte dabei die Fragmentierung spielen, welche eine Methode der Aktivitätsregulierung und Vervielfältigung der Funktionen des Proteins darstellen könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abraham C & Medzhitov R (2011) Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**: 1729–1737
- Antoni L, Nuding S, Weller D, Gersemann M, Ott G, Wehkamp J & Stange EF (2013) Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J. Crohns Colitis* **7**: e652-664
- Arsenescu R, Arsenescu V, Zhong J, Nasser M, Melinte R, Dingle RWC, Swanson H & de Villiers WJ (2011) Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**: 1149–1162
- Aswad H, Jalabert A & Rome S (2016) Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol.* **16**: 32
- Atuma C, Strugala V, Allen A & Holm L (2001) The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**: G922-929
- Autenrieth A (2003) Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *J. Für Gastroenterol. Hepatol. Erkrank.* **1**: 14–17
- Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME & Ouellette AJ (2000) Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* **1**: 113–118
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF & Gordon JI (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 15718–15723
- Baroni A, Donnarumma G, Paoletti I, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Tufano MA & Carriero MV (2009) Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* **30**: 267–272
- Becker N, Kunath J, Loh G & Blaut M (2011) Human intestinal microbiota: characterization of a simplified and stable gnotobiotic rat model. *Gut Microbes* **2**: 25–33
- Bergander L, Wahlström N, Alsberg T, Bergman J, Rannug A & Rannug U (2003) Characterization of in vitro metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole by liquid chromatography-mass spectrometry and NMR. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **31**: 233–241
- Bergander L, Wincent E, Rannug A, Foroozesh M, Alworth W & Rannug U (2004) Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem. Biol. Interact.* **149**: 151–164

- van den Bogaard EH, Bergboer JGM, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IMJJ, Hato SV, van der Valk PGM, Schröder JM, Joosten I, Zeeuwen PLJM & Schalkwijk J (2013) Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* **123**: 917–927
- Bresci G, Parisi G, Gambardella L, Banti S, Bertoni M, Rindi G & Capria A (1997) Evaluation of clinical patterns in ulcerative colitis: a long-term follow-up. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **17**: 17–22
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 238–250
- Brüning A & Homann N (2018) Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. In *Basislehrbuch Innere Medizin*, Braun J & Müller-Wieland D (eds) pp 551–560. München: Elsevier
- Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS & Virgin HW (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**: 259–263
- Cario E (2003) Toll-like receptors and intestinal defence: molecular basis and therapeutic implications. *Expert Rev. Mol. Med.* **5**: 1–15
- Cederlund A, Gudmundsson GH & Agerberth B (2011) Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* **278**: 3942–3951
- de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PLJM, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, Giardina E, Stuart PE, Nair R, Helms C, Escaramís G, Ballana E, Martín-Ezquerria G, den Heijer M, Kamsteeg M, Joosten I, Eichler EE, Lázaro C, Pujol RM, Armengol L, et al (2009) Deletion of the late cornified envelope (LCE) 3B and 3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat. Genet.* **41**: 211–215
- Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F & Gendre JP (2001) Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* **120**: 1093–1099
- Courth LF, Ostaff MJ, Mailänder-Sánchez D, Malek NP, Stange EF & Wehkamp J (2015) Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 14000–14005
- Daiss W, Scheurlen M & Malchow H (1989) Epidemiology of inflammatory bowel disease in the county of Tübingen (West Germany). *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **170**: 39–43; discussion 50–55
- Di Meglio P, Villanova F & Nestle FO (2014) Psoriasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**:

- Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS & Nibbering PH (2002) Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **106**: 517–525
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE & Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635–1638
- Ermund A, Schütte A, Johansson MEV, Gustafsson JK & Hansson GC (2013) Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**: G341–347
- Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, Rohde K, Marenholz I, Schulz F, Kerscher T, Hubner N, Wahn U, Schreiber S, Franke A, Vogler R, Heath S, Baurecht H, Novak N, Rodriguez E, Illig T, et al (2009) A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat. Genet.* **41**: 596–601
- Farmer RG, Easley KA & Rankin GB (1993) Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig. Dis. Sci.* **38**: 1137–1146
- Farmer RG, Hawk WA & Turnbull RB (1975) Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* **68**: 627–635
- Felice C, Lewis A, Armuzzi A, Lindsay JO & Silver A (2015) Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **41**: 26–38
- Fleming JM, Ginsburg E, Oliver SD, Goldsmith P & Vonderhaar BK (2012) Hornerin, an S100 family protein, is functional in breast cells and aberrantly expressed in breast cancer. *BMC Cancer* **12**: 266
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N & Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 13780–13785
- Fu S-J, Shen S-L, Li S-Q, Hua Y-P, Hu W-J, Guo B & Peng B-G (2018) Hornerin promotes tumor progression and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **18**: 815
- Furue M, Takahara M, Nakahara T & Uchi H (2014) Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch. Dermatol. Res.* **306**: 769–779
- Garreis F, Jahn J, Wild K, Abrar DB, Schicht M, Schröder J-M & Paulsen F (2017) Expression and Regulation of S100 Fused-Type Protein Hornerin at the Ocular Surface and Lacrimal Apparatus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**: 5968–5977

- Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ & Sutherland LR (2000) A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm. Bowel Dis.* **6**: 8–15
- Gebbers JO & Laissue JA (1989) Immunologic structures and functions of the gut. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **131**: 221–238
- Gekle M (2014) Funktion des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung. In *Physiologie*, Pape H-C Kurtz A Silbernagl S & Klinke R (eds) pp 473–565. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Gerstel U, Latendorf T, Bartels J, Becker A, Tholey A & Schröder J-M (2018) Hornerin contains a Linked Series of Ribosome-Targeting Peptide Antibiotics. *Sci. Rep.* **8**: 16158
- Geuking MB, McCoy KD & Macpherson AJ (2012) The function of secretory IgA in the context of the intestinal continuum of adaptive immune responses in host-microbial mutualism. *Semin. Immunol.* **24**: 36–42
- Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, González A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, et al (2014) The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* **15**: 382–392
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ & Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**: 1882–1885
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM & Nelson KE (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**: 1355–1359
- Glauben R, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Lehr HA, Leoni F, Mascagni P, Fantuzzi G, Dinarello CA & Siegmund B (2006) Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**: 5015–5022
- Glauben R, Batra A, Stroh T, Erben U, Fedke I, Lehr HA, Leoni F, Mascagni P, Dinarello CA, Zeitz M & Siegmund B (2008) Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut* **57**: 613–622
- Gregorieff A & Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* **19**: 877–890
- Gutknecht MF, Seaman ME, Ning B, Cornejo DA, Mugler E, Antkowiak PF, Moskaluk CA, Hu S, Epstein FH & Kelly KA (2017) Identification of the S100 fused-type protein hornerin as a regulator of tumor vascularity. *Nat. Commun.* **8**: 552

- Guttman-Yassky E, Nograles KE & Krueger JG (2011) Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**: 1110–1118
- Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E & Järnerot G (2003) Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**: 1767–1773
- Harbord M, Annesse V, Vavricka SR, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Boberg KM, Burisch J, De Vos M, De Vries A-M, Dick AD, Juillerat P, Karlsen TH, Koutroubakis I, Lakatos PL, Orchard T, Papay P, Raine T, Reinshagen M, Thaci D, Tilg H, et al (2016) The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* **10**: 239–254
- Hartmann F & Tannapfel A (2016) Pathologie. In *Entzündliche Darmerkrankungen*, Stange EF (ed) pp 72–80. Stuttgart: Schattauer
- Henry J, Hsu C-Y, Haftek M, Nachat R, Koning HD de, Gardinal-Galera I, Hitomi K, Balica S, Jean-Decoster C, Schmitt A-M, Paul C, Serre G & Simon M (2011) Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *FASEB J.* **25**: 1567–1576
- Herold G ed. (2018) Innere Medizin 2018 Köln: Gerd Herold
- Hooper LV & Gordon JI (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**: 1115–1118
- Horn F (2015) Das Duodenum und seine Drüsen. In *Biochemie des Menschen*, Horn F (ed) pp 521–524. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Hou JK, Abraham B & El-Serag H (2011) Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* **106**: 563–573
- Hsu C-Y, Gasc G, Raymond A-A, Burlet-Schiltz O, Takahara H, Serre G, Méchin M-C & Simon M (2017) Deimination of Human Hornerin Enhances its Processing by Calpain-1 and its Cross-Linking by Transglutaminases. *J. Invest. Dermatol.* **137**: 422–429
- Hubbard TD, Murray IA & Perdew GH (2015) Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metab. Dispos.* **43**: 1522–1535
- Ji T, Xu C, Sun L, Yu M, Peng K, Qiu Y, Xiao W & Yang H (2015) Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Down-Regulates IL-7 and Reduces Inflammation in a Mouse Model of DSS-Induced Colitis. *Dig. Dis. Sci.* **60**: 1958–1966

- Johannink J, Kirschniak A, Falch C, Müller S, Wilhelm P, Klag T & Wehkamp J (2016) Colitis ulcerosa und Morbus Crohn – Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Lege Artis - Mag. Zur Ärztl. Weiterbildung* **6**: 312–319
- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L & Hansson GC (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15064–15069
- Johansson MEV, Sjövall H & Hansson GC (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**: 352–361
- Jones DE & Bevins CL (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 23216–23225
- Kalinin A, Marekov LN & Steinert PM (2001) Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. Cell Sci.* **114**: 3069–3070
- Kamenickova A, Anzenbacherova E, Pavek P, Soshilov AA, Denison MS, Anzenbacher P & Dvorak Z (2013) Pelargonidin activates the AhR and induces CYP1A1 in primary human hepatocytes and human cancer cell lines HepG2 and LS174T. *Toxicol. Lett.* **218**: 253–259
- Kang SS, Bloom SM, Norian LA, Geske MJ, Flavell RA, Stappenbeck TS & Allen PM (2008) An antibiotic-responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis. *PLoS Med.* **5**: e41
- Kennedy LH, Sutter CH, Leon Carrion S, Tran QT, Bodreddigari S, Kensicki E, Mohny RP & Sutter TR (2013) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **132**: 235–249
- Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Abadir A, Marshall JK, Talley NJ & Moayyedi P (2011) Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **106**: 661–673
- Kim M-S, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabudhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LDN, et al (2014) A draft map of the human proteome. *Nature* **509**: 575–581
- Kirsch J, Schmitz F & Schulte E (2014) Rumpfdarm - Ösophagus und Gastrointestinaltrakt. In *Duale Reihe Anatomie*, Aumüller G Aust G Engele J Kirsch J Maio G Mayerhofer A Mense S Reißig D Salvetter J Schmidt W Schmitz F Schulte E Spanel-Borowski K Wennemuth G Wolff W Wurzinger LJ & Zilch H-G (eds) pp 675–733. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A & Reif S (2004) Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**: 1342–1352

- van Klinken BJ, Oussoren E, Weenink JJ, Strous GJ, Büller HA, Dekker J & Einerhand AW (1996) The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconj. J.* **13**: 757–768
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT & Ley RE (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl 1**: 4578–4585
- Koloski NA, Bret L & Radford-Smith G (2008) Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World J. Gastroenterol. WJG* **14**: 165–173
- de Koning HD, van den Bogaard EH, Bergboer JGM, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IMJJ, Hitomi K, Henry J, Simon M, Takashita N, Ishida-Yamamoto A, Schalkwijk J & Zeeuwen PLJM (2012) Expression profile of cornified envelope structural proteins and keratinocyte differentiation-regulating proteins during skin barrier repair. *Br. J. Dermatol.* **166**: 1245–1254
- Kostic AD, Xavier RJ & Gevers D (2014) The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* **146**: 1489–1499
- Krieg P, Schuppler M, Koesters R, Mincheva A, Lichter P & Marks F (1997) Repetin (Rptn), a new member of the ‘fused gene’ subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* **43**: 339–348
- Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R & Coffin SE (2012) Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics* **130**: 794–803
- Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C & Schulze J (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53**: 1617–1623
- Kypriotou M, Huber M & Hohl D (2012) The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the ‘fused genes’ family. *Exp. Dermatol.* **21**: 643–649
- Lai Y & Gallo RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30**: 131–141
- Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham H-P, Michel M-L, Da Costa G, Bridonneau C, Jegou S, Hoffmann TW, Natividad JM, Brot L, Taleb S, Couturier-Maillard A, Nion-Larmurier I, Merabtene F, Seksik P, Bourrier A, Cosnes J, Ryffel B, Beaugerie L, et al (2016) CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* **22**: 598–605

- Latendorf T (2015) Proteinexpressionsanalyse und biochemische Funktionsanalyse von Hornerin und Trichohyalin-like1 in der Haut des Menschen. Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Kiel
- Layer P, Go VL & DiMagno EP (1986) Fate of pancreatic enzymes during small intestinal aboral transit in humans. *Am. J. Physiol.* **251**: G475-480
- Lee SC, Kim IG, Marekov LN, O'Keefe EJ, Parry DA & Steinert PM (1993) The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 12164–12176
- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R & Eisenhauer P (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**: 167–173
- Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskis L, Doré J, Raedler A & Schreiber S (2011) Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **141**: 227–236
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S & Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022–1023
- Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA & Belaiche J (2001) Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* **49**: 777–782
- Lüllmann-Rauch R ed. (2015) Taschenlehrbuch Histologie 5th ed. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag
- Ma Y, Wang Q, Yu K, Fan X, Xiao W, Cai Y, Xu P, Yu M & Yang H (2018) 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole induced aryl hydrocarbon receptor activation prevents intestinal barrier dysfunction through regulation of claudin-2 expression. *Chem. Biol. Interact.* **288**: 83–90
- Madara JL (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 143–159
- Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA & Galandiuk S (2006) Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* **81**: 1462–1471
- Makino T, Takaishi M, Morohashi M & Huh NH (2001) Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J. Biol. Chem.* **276**: 47445–47452

- Makino T, Yamakoshi T, Mizawa M & Shimizu T (2014) Ultraviolet B irradiation induces the expression of hornerin in xenotransplanted human skin. *Acta Histochem.* **116**: 20–24
- Mändar R & Mikelsaar M (1996) Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol. Neonate* **69**: 30–35
- Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW & Steinert PM (1993) Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 613–625
- Meyer-Hoffert U, Hornef MW, Henriques-Normark B, Axelsson L-G, Midtvedt T, Pütsep K & Andersson M (2008) Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* **57**: 764–771
- Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A & Ziegler A (1996) Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ('epidermal differentiation complex') on human chromosome 1q21. *J. Invest. Dermatol.* **106**: 989–992
- Molin S, Merl J, Dietrich KA, Regauer M, Flaig M, Letulé V, Saucke T, Herzinger T, Ruzicka T & Hauck SM (2015) The hand eczema proteome: imbalance of epidermal barrier proteins. *Br. J. Dermatol.* **172**: 994–1001
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW & Kaplan GG (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**: 46–54
- Monteleone I, Pallone F & Monteleone G (2013) Aryl hydrocarbon receptor and colitis. *Semin. Immunopathol.* **35**: 671–675
- Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, MacDonald TT, Pallone F & Monteleone G (2011) Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **141**: 237–248
- Munford RS & Varley AW (2006) Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.* **2**: e67
- Nebert DW, Puga A & Vasiliou V (1993) Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**: 624–640
- Nguyen LP & Bradfield CA (2008) The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 102–116
- Nimmo ER, Prendergast JG, Aldhous MC, Kennedy NA, Henderson P, Drummond HE, Ramsahoye BH, Wilson DC, Semple CA & Satsangi J (2012) Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation

- of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**: 889–899
- Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J & Stange EF (2007) Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* **56**: 1240–1247
- Öberg M, Bergander L, Håkansson H, Rannug U & Rannug A (2005) Identification of the Tryptophan Photoproduct 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, in Cell Culture Medium, as a Factor That Controls the Background Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. *Toxicol. Sci.* **85**: 935–943
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G & Cho JH (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 603–606
- O'Hara AM & Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**: 688–693
- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T & Kagnoff MF (1999) Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**: 6718–6724
- O'Regan GM, Campbell LE, Cordell HJ, Irvine AD, McLean WHI & Brown SJ (2010) Chromosome 11q13.5 variant associated with childhood eczema: an effect supplementary to filaggrin mutations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: 170–174
- Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP & Kyvik KO (2000) Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**: 1075–1081
- Ostaf MJ, Stange EF & Wehkamp J (2013) Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med.* **5**: 1465–1483
- Ott C (2016) Epidemiologie. In *Entzündliche Darmerkrankungen*, Stange EF (ed) pp 3–9. Stuttgart: Schattauer
- Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G & Timmer A (2008) The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**: 917–923
- Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, et al (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* **38**: 441–446

- Pellerin L, Henry J, Hsu C-Y, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin M-C, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt A-M, Serre G, Paul C & Simon M (2013) Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**: 1094–1102
- Perdew GH & Babbs CF (1991) Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. *Nutr. Cancer* **16**: 209–218
- Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A & Rhodes J (1994) Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* **35**: 353–359
- Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P & Malo D (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* **189**: 615–625
- Rannug U, Rannug A, Sjöberg U, Li H, Westerholm R & Bergman J (1995) Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem. Biol.* **2**: 841–845
- Raschig J, Mailänder-Sánchez D, Berscheid A, Berger J, Strömstedt AA, Courth LF, Malek NP, Brötz-Oesterhelt H & Wehkamp J (2017) Ubiquitously expressed Human Beta Defensin 1 (hBD1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action. *PLoS Pathog.* **13**: e1006261
- Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD & Weidinger S (2009) Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**: 1361–1370
- Rogler G, Luc B & Scharl M (2018) New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease: microbiota, epigenetics and common signalling pathways. *Swiss Med. Wkly.* **148**: w14599
- Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 107–133
- Schaubeck M, Clavel T, Calasan J, Lagkouvardos I, Haange SB, Jehmlich N, Basic M, Dupont A, Hornef M, von Bergen M, Bleich A & Haller D (2016) Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* **65**: 225–237
- Schauber J, Rieger D, Weiler F, Wehkamp J, Eck M, Fellermann K, Scheppach W, Gallo RL & Stange EF (2006) Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**: 615–621

- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF & Fellermann K (2007) Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* **75**: 2399–2407
- Schroeder BO, Ehmann D, Precht JC, Castillo PA, Kuchler R, Berger J, Schaller M, Stange EF & Wehkamp J (2015) Paneth cell  $\alpha$ -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.* **8**: 661–671
- Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J, Buchner J, Schaller M, Stange EF & Wehkamp J (2011) Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1. *Nature* **469**: 419–423
- Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN & Dankert J (1999) The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* **117**: 1089–1097
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM & Finlay BB (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**: 859–904
- Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW & Lehrer RI (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* **76**: 1436–1439
- Sender R, Fuchs S & Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**: e1002533
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 55–70
- Shen J, Zuo Z-X & Mao A-P (2014) Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**: 21–35
- Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV & Radford-Smith GL (2008) Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* **57**: 903–910
- Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P & McLean WHI (2006) Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* **38**: 337–342
- Spang J, Köhler S & Weiß H (2016) Psychosomatik. In *Entzündliche Darmerkrankungen*, Stange EF (ed) pp 286–292. Stuttgart: Schattauer
- Steck N, Mueller K, Schemann M & Haller D (2012) Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* **61**: 1610–1618

- Stremmel W, Ehehalt R, Autschbach F & Karner M (2007) Phosphatidylcholine for steroid-refractory chronic ulcerative colitis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **147**: 603–610
- Strugala V, Dettmar PW & Pearson JP (2008) Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* **62**: 762–769
- Sutter CH, Bodreddigari S, Champion C, Wible RS & Sutter TR (2011) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Increases the Expression of Genes in the Human Epidermal Differentiation Complex and Accelerates Epidermal Barrier Formation. *Toxicol. Sci.* **124**: 128–137
- Sweet MJ & Hume DA (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **60**: 8–26
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M & Lochs H (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**: 44–54
- Taïeb A (1999) Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. *Contact Dermatitis* **41**: 177–180
- Takaishi M, Makino T, Morohashi M & Huh N (2005) Identification of Human Hornerin and Its Expression in Regenerating and Psoriatic Skin. *J. Biol. Chem.* **280**: 4696–4703
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME & Lehrer R (1989) Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**: 2017–2020
- Timmer A, Breuer-Katschinski B & Goebell H (1999) Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm. Bowel Dis.* **5**: 79–84
- Timmer A & Goebell H (1999) Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z. Gastroenterol.* **37**: 1079–1084
- Tompkins LM, Li H, Li L, Lynch C, Xie Y, Nakanishi T, Ross DD & Wang H (2010) A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem. Pharmacol.* **80**: 1754–1761
- Uronis JM, Mühlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS & Jobin C (2009) Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PloS One* **4**: e6026
- Ventham NT, Kennedy NA, Adams AT, Kalla R, Heath S, O'Leary KR, Drummond H, IBD BIOM consortium, IBD CHARACTER consortium, Wilson DC, Gut IG, Nimmo ER & Satsangi J (2016) Integrative epigenome-wide analysis

- demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat. Commun.* **7**: 13507
- Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM & Mischke D (1993) Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* **18**: 92–99
- Wang G (2014) Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharm. Basel Switz.* **7**: 545–594
- Wang G, Li X & Wang Z (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* **44**: D1087–1093
- Wang L, Wang Y-Y, Cao Q, Chen Z & Chen S-J (2006) Hornerin gene was involved in a case of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome with t(1;2)(q21;q37). *Leukemia* **20**: 2184–2187
- Wang M, Herrmann CJ, Simonovic M, Szklarczyk D & von Mering C (2015) Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. *Proteomics* **15**: 3163–3168
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Schwind B, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC & Stange EF (2002) Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**: 745–752
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL & Stange EF (2005) Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**: 406–415
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM & Stange EF (2004a) NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* **72**: 5750–5758
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM & Stange EF (2003) Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **9**: 215–223
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K & Stange EF (2004b) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**: 1658–1664
- Wehkamp J, Koslowski M, Wang G & Stange EF (2008) Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* **1 Suppl 1**: S67-74

- Wehkamp J & Stange EF (2010) Paneth's disease. *J. Crohns Colitis* **4**: 523–531
- Wehkamp J & Stange EF (2016) Angeborene Immunität und Schleimhautbarriere. In *Entzündliche Darmerkrankungen*, Stange EF (ed) pp 24–39. Stuttgart: Schattauer
- Wendler J, Ehmann D, Courth L, Schroeder BO, Malek NP & Wehkamp J (2018) Bacterial Periplasmic Oxidoreductases Control the Activity of Oxidized Human Antimicrobial  $\beta$ -Defensin 1. *Infect. Immun.* **86**:
- Wenzel UA, Magnusson MK, Rydström A, Jonstrand C, Hengst J, Johansson MEV, Velcich A, Öhman L, Strid H, Sjövall H, Hansson GC & Wick MJ (2014) Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. *PLoS One* **9**: e100217
- Whitcomb DC & Lowe ME (2007) Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig. Dis. Sci.* **52**: 1–17
- White SH, Wimley WC & Selsted ME (1995) Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**: 521–527
- Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL & Scott RW (1989) Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J. Biol. Chem.* **264**: 11200–11203
- Wilson CL & Safe S (1998) Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol. Pathol.* **26**: 657–671
- Woting A & Blaut M (2016) The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients* **8**: 202
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD & Lewis JD (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**: 105–108
- Wu Z (2005) Analysis of Two Human Gene Clusters Involved in Innate Immunity. Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Kiel
- Wu Z, Meyer-Hoffert U, Reithmayer K, Paus R, Hansmann B, He Y, Bartels J, Gläser R, Harder J & Schröder J-M (2009) Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **129**: 1446–1458
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM & Oppenheim JJ (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**: 525–528

- Yount NY & Yeaman MR (2013) Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**: 127–138
- Yu M, Wang Q, Ma Y, Li L, Yu K, Zhang Z, Chen G, Li X, Xiao W, Xu P & Yang H (2018) Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity. *Int. J. Biol. Sci.* **14**: 69–77
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395
- Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P & Romani L (2013) Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**: 372–385
- Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, et al (2018) Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**: D754–D761
- Zilbauer M, Dorrell N, Boughan PK, Harris A, Wren BW, Klein NJ & Bajaj-Elliott M (2005) Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. *Infect. Immun.* **73**: 7281–7289

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik, Innere Medizin I - Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten, unter Betreuung von Prof. Dr. med. Jan Wehkamp durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Jan Wehkamp (Doktorvater) sowie mit Unterstützung von Dr. rer. nat. Judith Wendler und Dr. rer. nat. Lioba Courth.

Bis auf die nachfolgend aufgeführten Versuche wurden sämtliche Versuche nach Einarbeitung durch Jutta Bader und Marion Strauß von mir eigenständig durchgeführt. Unterstützung erhielt ich auch durch Dr. rer. nat. Judith Wendler und Dr. rer. nat. Dirk Ehmann.

Die *Radial Diffusion Assays* (RDA) sowie die Westernblots wurden unter Anleitung von Marion Strauß durchgeführt. Die Kultivierung der humanen Biopsien *ex vivo* sowie der Zelllinie HCT116 wurde von Sabrina Stebe-Frick durchgeführt. Ein Teil der Biopsien des Patientenkollektivs wurden von Dr. med. Anahita Fathi und Jutta Bader in ersten Schritten analysiert.

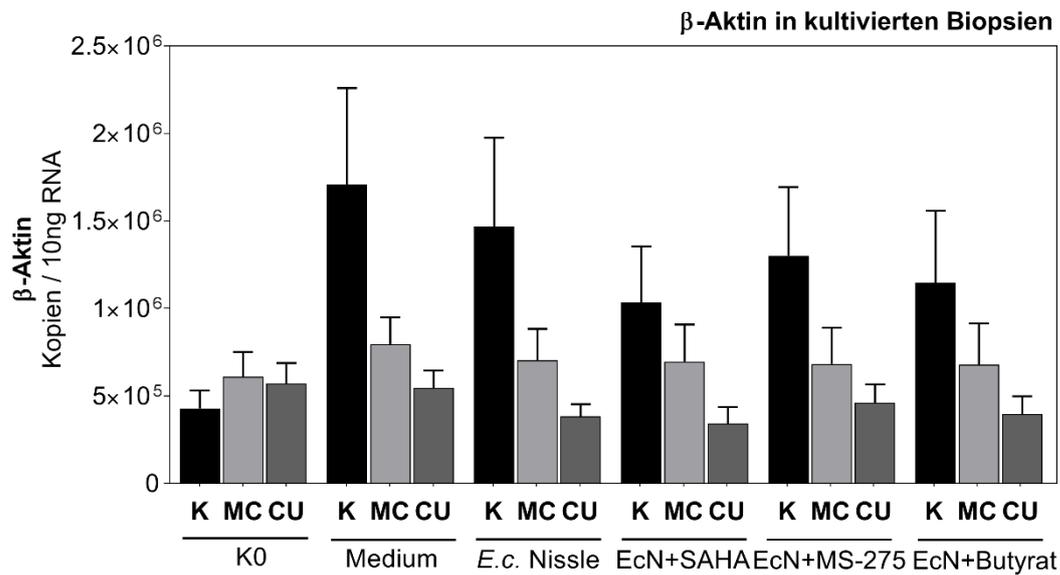
Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig mit Unterstützung von Dr. rer. nat. Judith Wendler, Dr. rer. nat. Lioba Courth und Dr. rer. nat. Dirk Ehmann.

Ich versichere das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

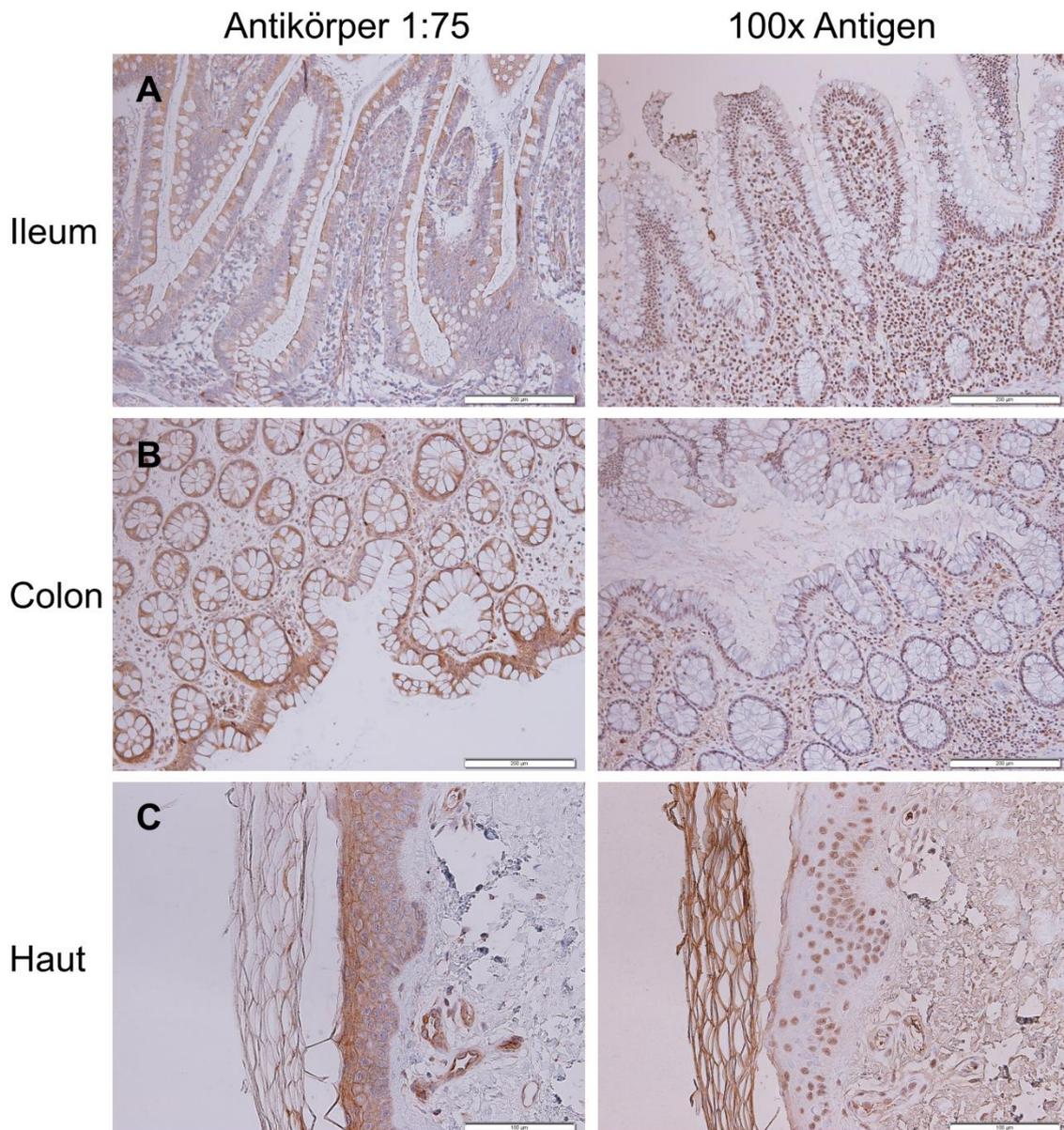
[Ann-Cathrine Neukamm]

## 8. Anhang



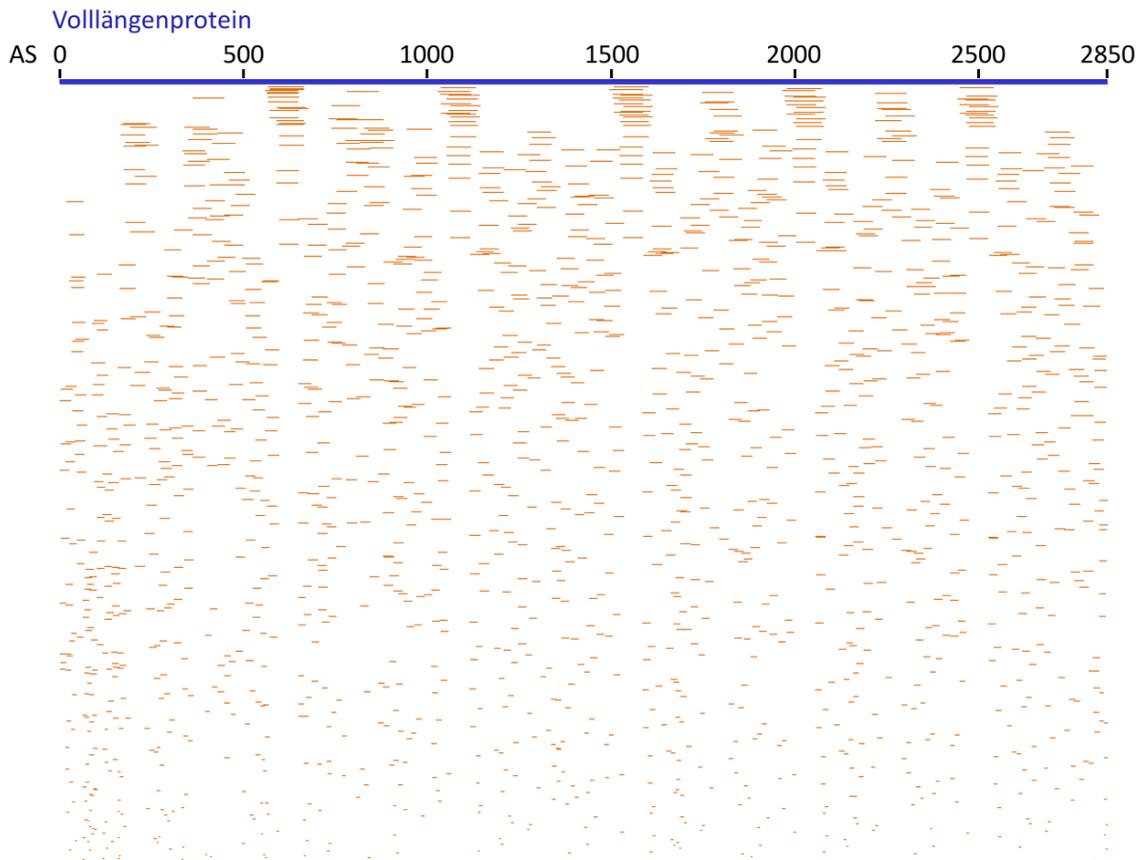
**Abbildung 23: Expression von β-Aktin in kultivierten Biopsien**

Humane Biopsien aus dem Sigma von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen wurden für 18 h in ZK-Medium kultiviert und mit abgetöteten *E. coli* Nissle 1917 sowie verschiedenen HDAC-Inhibitoren (SAHA, MS-275, Butyrat) stimuliert. Zusätzlich wurden Biopsien nativ aufgearbeitet (K0). Die RNA wurde isoliert und die HRNR-Expression von β-Aktin mittels qPCR gemessen. Abgebildet sind die Transkripte / 10 ng RNA im Mittelwert ± SEM.



**Abbildung 24: Immunhistochemie mit geblocktem Antikörper**

Immunhistochemische Färbung von paraffinfixierten Schnitten aus humanem Ileum (A), Colon (B) und der Haut (C) mit einem HRNR-Antikörper (braun) sowie Hämatoxylin (blau). Zusätzlich wurde der Antikörper mit dem zugehörigen Antigen (100x) geblockt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt mit einem Maßstab von 200 µm (A+B) bzw. 100 µm (C).



**Abbildung 25: In silico Verdau von HRNR mit Trypsin und Chymotrypsin**

HRNR wurde *in silico* mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut. Die genauen Schnittstellen sind in Tabelle 12 aufgeführt, wobei maximal fünf mögliche Schnittstellen übersprungen wurden. Dargestellt sind ausschließlich Peptide mit einer Masse größer als 500 Da. In blau ist das Protein HRNR in voller Länge (2850 AS), in orange die einzelnen Fragmente dargestellt.

unter Zugabe von TCEP							
Hemmhof (mm)	Aerobier			Anaerobier			
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>B. vulgatus</i>
0,01% Essigsäure	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lysozym	2,3	0,0	0,0	2,3	3,0	3,5	4,8
hBD 3	4,5	1,5	0,8	10,0	4,8	4,5	7,5
Hornerin-Fragmente	A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	D	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Abbildung 26: Radial Diffusion Assay unter reduzierenden Bedingungen**

Sechs HRNR-Fragmente wurden im *Radial Diffusion Assay* (RDA) mithilfe von 20 µl Tris(2-carboxyethyl)phosphin pro Platte (TCEP, 1 M) unter reduzierenden Bedingungen auf antimikrobielle Eigenschaften überprüft. Die HRNR-Fragmente wurden jeweils in einer Konzentration von 4 µg / Stanze getestet. Als Negativkontrolle wurde 0,01 %ige Essigsäure, als Positivkontrolle Lysozym (1 µg / Stanze) und humanes β-Defensin 3 (hBD3, 1 µg / Stanze) verwendet. Dargestellt ist der Durchmesser der Hemmhöfe (in mm) abzüglich 2,5 mm des Stanzloches als Mittelwert aus zwei Versuchen.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Jan Wehkamp für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Er hat es mir ermöglicht selbstständig zu arbeiten, eigene Ideen zu verfolgen und mich dabei mit viel Motivation und Enthusiasmus unterstützt.

Dr. rer. nat. Judith Wendler danke ich für die tolle Betreuung. Sie war jederzeit bereit mich bei Fragen zu unterstützen, Knoten im Kopf zu lösen und den roten Faden wieder zu finden. Besonders möchte ich mich auch für die engagierten und hilfreichen Korrekturen bedanken.

Dr. rer. nat. Lioba Courth und Dr. rer. nat. Dirk Ehmman danke ich besonders für die fachliche Unterstützung sowohl in der Methodik als auch bei konstruktiven Diskussionen. Sie haben mir geholfen neue Ideen zu entwickeln und Möglichkeiten der Umsetzung zu finden.

Jutta Bader und Marion Strauß danke ich ganz herzlich für die Einarbeitung in die Labormethoden und die vielfältige Unterstützung; und natürlich auch für die zuverlässige Versorgung mit Zuckernachschub.

Louis Königer und der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die herzliche Aufnahme, die erst ein Arbeiten mit viel Freude in angenehmer und konstruktiver Atmosphäre ermöglicht hat. Sie waren eine große fachliche und persönliche Unterstützung. Es hat mir viel Spaß gemacht mit euch.

Vielen Dank auch an Prof. Julia Frick für die unkomplizierte Vertretung bei der Disputation und an PD Dr. med. Kathrin Grundmann-Hauser für ihre Arbeit als Zweitgutachterin.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung und das Vertrauen. Danke für euren Rückhalt und dass ihr ständig ein offenes Ohr für mich habt. Und vielen Dank Lukas, dass du immer für mich da bist.