

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

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

**Die Rolle von peripheren mononukleären Zellen bei Morbus
Crohn**

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

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

vorgelegt von

Denzau-Graupner, Ulrike Renate Margarete

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wehkamp

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Andus

Tag der Disputation: 15.04.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Anatomie des Verdauungssystems	1
1.1.1. Dünndarm	2
1.1.2. Dickdarm.....	2
1.1.3. Darmmikrobiom.....	2
1.2. Intestinale Schutzbarriere	3
1.2.1. Epithel und Mukus	3
1.2.2. Das Intestinale Immunsystem	4
1.2.3. Antimikrobielle Peptide.....	4
1.2.3.1. Alpha-Defensine	5
1.2.3.2. Beta-Defensine	6
1.2.4. Bakterielle Mustererkennungsrezeptoren im Darm	7
1.2.5. Immunzellen des Blutes	8
1.2.5.1. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	8
1.2.5.2. Subpopulationen der Monozyten	9
1.2.5.3. Subpopulationen der Dendritischen Zellen	10
1.3. Regulation im Dünndarmepithel.....	11
1.3.1. Paneth-Zellen.....	11
1.3.2. Wnt-Signalweg im Dünndarm	12
1.3.3. Histon-Deacetylasen	16
1.4. Barrierestörung: Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	16

1.4.1. Morbus Crohn	17
1.4.2. Dünndarm	18
1.4.3. Dickdarm.....	20
1.5. Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Geräte	23
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3. Chemikalien, Antikörper und Kits	24
2.1.3.1. Chemikalien	24
2.1.3.2. Antikörper	25
2.1.3.3. Kits.....	26
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	26
2.1.5. Humane Primer und Plasmide	27
2.1.6. Probanden	28
2.1.7. Software.....	30
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Isolation der PBMCs	30
2.2.2. Durchflusszytometrie	31
2.2.2.1. Zell-Analyse	31
2.2.2.2. Zell-Sortierung	33
2.2.3. Stimulation der Monozyten.....	34
2.2.4. Nukleinsäuremethoden	35
2.2.4.1. RNA Isolation aus Monozyten	35
2.2.4.2. cDNA Umschreibung	35

2.2.4.3. Qualitative Real-Time PCR.....	35
2.2.5. Statistische Methoden.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1. Morbus Crohn-Patienten zeigen im Blut einen Anstieg an klassischen Monozyten jedoch eine Verringerung an dendritischen Zellen.....	38
3.2. Klassische Monozyten von Morbus Crohn-Patienten exprimieren weniger Wnt-Liganden als Kontrollprobanden	43
3.3. Klassische Monozyten von Morbus Crohn-Patienten weisen Unterschiede in der Expression von diversen Komponenten der kanonischen Wnt-Signalkaskade auf.....	45
3.4. Klassische Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn weisen gegenüber Kontrollprobanden nur geringe Unterschiede in der Expression von HDACs auf.....	48
4. Diskussion	50
4.1. Die Schlüsselrolle der Monozyten bei Morbus Crohn	50
4.2. Der Einfluss von Morbus Crohn auf die Subpopulationen dendritischer Zellen.....	52
4.3. Morbus Crohn-Patienten zeigen vielfältige und komplexe Defekte in der Wnt-Signalkaskade	53
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	75
8. Danksagung.....	76

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielle Peptide
APC	Adenomatous polyposis coli-Protein
Axin	<i>axis inhibition protein</i>
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CU	Colitis ulcerosa
DVL	<i>dishevelled</i>
DC	Dendritische Zellen
<i>DesCom</i>	<i>destruction complex</i>
DKK	Dickkopf
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EVI	<i>evenness interrupted protein = Wntless protein (WLS)</i>
FCS	Fetales Kälberserum

Fz	<i>frizzled</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulation factor</i>
hBD	humane β -Defensine
HD	Humanes α -Defensin
HDAC	Histon-Deacetylasen
HNP	Humane neutrophile Peptide
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
L1 bis L4+	Lokalisationstyp bei Patienten mit Morbus Crohn
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>lipoprotein receptor-related protein</i>
MC	Morbus Crohn
NOD	<i>nucleotide binding oligomerization domain</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PHA-L	<i>Phytohemagglutinin-leucocytes</i>
PORCN	<i>porcupine</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PZ	Paneth-Zelle
RSPO	R-Spondin
SFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
SZ	Stammzellen
TCF/LEF	<i>t-cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
TLE	<i>transducin-like enhancer protein</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
WIF-1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i>
WLS	<i>Wntless protein = evenness interrupted protein (EVI)</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
WRE	<i>Wnt-responsive elements</i>

1. Einleitung

1.1. Anatomie des Verdauungssystems

Makroskopisch betrachtet besteht das Verdauungssystem aus dem Kopfdarm (Mundhöhle bis Rachen), dem Rumpfdarm (Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm und Analkanal) und den großen Darmdrüsen (Pankreas und Leber). Jeder dieser Abschnitte hat unterschiedlichste Funktionen. Im Mund erfolgt die Zerkleinerung der Nahrung und die Beimengung von Speichel, um den Chymus transportabler zu machen. Teilweise werden hier über die Mundschleimhaut auch schon Nährstoffe resorbiert. Die Speiseröhre dient dem Transport der Nahrung in den Magen. Dort wird diese gelagert und nach begonnener Verdauung portioniert an das Duodenum abgegeben. Das Duodenum gehört mit Jejunum und Ileum zum Dünndarm. Dem Nahrungsbrei werden Verdauungssäfte beigemischt und die aufgeschlossenen Nährstoffe können dann vom Dünndarm resorbiert werden. Das Ileum geht schließlich, abgegrenzt durch die Ileozäkklappe, in den Dickdarm über. Die Klappe verhindert das retrograde Wandern des Speisebreis, aber auch der Bakterien des Dickdarms in den Dünndarm. Dem Verdauungsbrei wird im Dickdarm das Wasser entzogen und die *Faeces* werden im Sigmadarm gelagert, bevor sie über den Anus kontrolliert ausgeschieden werden.

Mikroskopisch betrachtet weist der Rumpfdarm in allen Abschnitten eine ähnliche Systematik auf. Die innerste Wandschicht, die *Tunica mucosa*, trägt zuoberst eine einzelne Epithelschicht (*Lamina epithelialis mucosae*), die durch die *Lamina propria*, bestehend aus Blutgefäßen sowie Nerven und Lymphbahnen, versorgt wird. Abschließend findet sich eine *Lamina muscularis mucosae*. Diese innerste Wandschicht, welche von *Tela submucosa* sowie *Tunica muscularis* und *Tunica serosa* oder *Tunica adventitia* angeschlossen wird, unterscheidet sich funktionell und im detaillierten Aufbau von Abschnitt zu Abschnitt (Welsch and Deller, 2011).

1.1.1. Dünndarm

Die Oberfläche des Dünndarms ist durch die Ausbildung von Falten, Zotten und Krypten stark vergrößert und kann so die Hauptaufgabe der Resorption erfüllen (Helander and Fändriks, 2014). Das Epithel des Dünndarms setzt sich aus Epithel- und Becherzellen zusammen. Die Stammzellen (SZ), die für die Neubildung der Zellen verantwortlich sind, befinden sich in der Basis der Lieberkühn-Krypten, wo auch die Paneth-Zellen (PZ) angesiedelt sind. Im Ileum, besonders im terminalen Abschnitt, der in das Kolon übergeht, finden sich Peyer-Plaques, die die Aufgaben des Immunsystems erfüllen (Welsch and Deller, 2011). Vom Duodenum zum Dickdarm hin nimmt die Dichte der Bakterien immer weiter zu. Gleichermaßen erhöht sich auch die Anzahl der PZ (Sekirov et al., 2010). Einen mechanischen Schutz zum noch stärker besiedelten Dickdarm bildet die Ileozäkalklappe.

1.1.2. Dickdarm

Im Vergleich zum Dünndarm kann der Dickdarm seine Oberfläche geringfügig durch Krypten und Mikrovilli vergrößern (Helander and Fändriks, 2014). Die Krypten sind ähnlich aufgebaut wie im Dünndarm mit dem Unterschied, dass sich hier normalerweise keine PZ befinden. Der 0,8 bis 1 m lange Dickdarm wird unterteilt in Appendix, Kolon, Sigma, Rektum und Analkanal (Welsch and Deller, 2011). Der Appendix gilt als Reservoir für Bakterien und hat einen Anteil an der Immunabwehr (Laurin et al., 2011). Besonders häufig finden sich im Dickdarm Becherzellen, die eine zweischichtige Schutzbarriere gegen die massive bakterielle Besiedlung bilden. In dieser Barriere aus Mukus befinden sich viele antimikrobielle Peptide (AMPs) (Dupont et al., 2015).

1.1.3. Darmmikrobiom

Zusätzlich zu den einzelnen Organanteilen besteht der Darm aus Mikroben, mit Bakterien als Hauptanteil. Sie bedecken alle menschlichen Darmschleimhäute und erfüllen wichtige Funktionen. So werden bestimmte Nahrungsbestandteile durch sie derartig verändert, dass wir sie überhaupt erst resorbieren können.

Darüber hinaus stimulieren sie unser Immunsystem (Hooper et al., 2012; Sommer and Bäckhed, 2013; Stilling et al., 2014). Die Besiedelung des Darms mit Mikroben kann aber auch zum Risiko werden, wenn diese nicht vernünftig geregelt beziehungsweise (bzw.) überwacht wird (Belkaid et al., 2013; Mow et al., 2004).

Neueren Berechnungen zufolge beträgt das Verhältnis von Bakterien zu menschlichen Zellen bei Erwachsenen ungefähr 1:1. Dabei enthält das Kolon mit *Eukaryoten* und *Archaeen* die Mehrheit dieser Bakterien (Sender et al., 2016). Wie diese Bakterien zusammengesetzt sind ist abhängig von verschiedenen Umwelteinflüssen, wie dem Wohnort, der Ernährung, der Medikamenteneinnahme bzw. der genetischen Ausstattung jedes Einzelnen (David et al., 2014; Goodrich et al., 2014; Voreades et al., 2014). Auch innerhalb eines Menschenlebens verändert sich das Verhältnis der verschiedenen Spezies zueinander so, wie sich auch der Verdauungstrakt verändert (Soenen et al., 2016; Yatsunenko et al., 2012). Aufgrund dieser unterschiedlichen Einflüsse ist es schwer, ein ideales Mikrobiom zu definieren. Die Zusammensetzung kann sich überdies bei bestimmten Erkrankungen, wie Krebs, Übergewicht, Allergien, Diabetes und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) verändern. Fraglich ist, ob diese Veränderung die Ursache oder Wirkung der Krankheit ist und ob es möglich sein wird, mittels Mikrobiom-Screening CEDs zu diagnostizieren (Matsuoka and Kanai, 2015).

1.2. Intestinale Schutzbarriere

1.2.1. Epithel und Mukus

Der menschliche Darm ist mit einer semipermeablen Epithelschicht ausgekleidet. Die einzelnen Epithelzellen sind fest durch Tight Junctions verbunden und stellen eine physikalische Barriere dar, die dennoch die Resorption der lebenswichtigen Nährstoffe ermöglicht (Ivanov, 2012; Mandel et al., 1993). Zusätzlich schützt die permanente Erneuerung der Zellen und Abtragung der obersten Epithelzellen durch die Peristaltik vor dem Eindringen der Bakterien in die Darmwand. Binnen 4 - 5 Tagen sind die Epithelzellen des Darms einmal komplett ausgetauscht. Eine Störung in diesem Gleichgewicht

aus Zellerneuerung und Zelluntergang kann zu Schwächen in der Schutzbarriere führen und das Eindringen von Bakterien zur Folge haben (Martini et al., 2017; van der Flier and Clevers, 2009).

Zwischen den Epithelzellen befinden sich vereinzelt schleimproduzierende Drüsen, die sogenannten Becherzellen. Diese produzieren den Mukus, welcher bei Kontakt Bakterien einfängt (Johansson and Hansson, 2016). Die Mukusschicht ist aufgrund der hohen Bakteriendichte im Dickdarm wesentlich dicker ausgeprägt als im Dünndarm und beträgt etwa 830 µm gegenüber 20 µm im Dünndarm (Atuma et al., 2001; Martini et al., 2017).

1.2.2. Das Intestinale Immunsystem

In der Lamina propria sind die Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und lymphoide Zellen, aber auch die des erworbenen Immunsystems, wie zum Beispiel (z.B.) T- und B-Lymphozyten zu finden. Sie stellen zusammen mit der Schleimbarriere einen sehr wichtigen Verteidigungsmechanismus dar. Das Verdauungssystem beherbergt dabei 60 bis 70 % der peripheren Lymphozyten (Ohno, 2016).

Im Dünndarm, Blinddarm und Kolon gibt es Ansammlungen von lymphoiden Zellen in der *Tela submucosa* und der *Lamina propria*, welche als Peyer-Plaques bezeichnet werden und Teil des darmassoziierten lymphatischen Gewebes sind. Diese liegen meist dem Ansatz des *Mesenteriums* gegenüber (Brandtzaeg et al., 2008). Den B-Zell-Follikeln obenauf liegen die M-Zellen. Dabei handelt es sich um spezialisierte Epithelzellen, die dem Follikel-assoziierten Epithel zugerechnet werden. Antigene werden aktiv transzellulär von apikal nach basal zu den Antigen-präsentierenden Zellen, wie z.B. den DCs, Makrophagen, B-Zellen und follikulären DCs (FDCs) transportiert (Martini et al., 2017; Ohno, 2016).

1.2.3. Antimikrobielle Peptide

AMPs umfassen eine Gruppe kleiner Peptide, von denen bereits über 2600 verschiedene charakterisiert wurden. Der Großteil davon weist antibakterielle Eigenschaften auf (G. Wang et al., 2016, p. 3). Neben vielen Spezies der Flora

und Fauna ist auch der Mensch im Stande, solche Peptide zu bilden, um sich vor pathogenen Mikroorganismen zu schützen (Raj and Dentino, 2002). Ihre Wirkung geht jedoch über das Abtöten von Pathogenen hinaus. So sind sie beispielsweise in der Lage, Endotoxine zu neutralisieren, eine chemokinähnliche Wirkung auszuüben, Angiogenese oder Wundheilung zu induzieren und besitzen zudem einen großen immunmodulatorischen Einfluss (Guaní-Guerra et al., 2010).

Der Großteil der AMPs zeichnet sich durch kurzkettenige Aminosäuresequenzen aus, welche meist positiv geladen sind und eine amphipathische Struktur aufweisen. Dadurch können sie mit der Bakterienmembran in Kontakt treten. Menschliche Defensine haben ein Molekulargewicht von 3,5 – 4,5 kDa und weisen 6 konservierte Cystein-Reste auf, welche 3 Disulfidbrücken ausbilden (Lehrer et al., 1991). Je nach Position der Disulfidbrücken werden sie wiederum in 3 Untergruppen eingeteilt, die α -, β - und *teta*-Defensine, wobei letztere nicht im Menschen vorkommen (Bals, 2000).

1.2.3.1. Alpha-Defensine

Das α -Defensin-Gen wurde erstmals 1989 in PZ der Maus identifiziert (Ouellette et al., 1989; Wang, 2014). Die Peptide sind zwischen 29 und 35 Aminosäuren lang. Charakteristisch ist die Lage der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1 - 6, 2 - 4 und 3 - 5 (White et al., 1995). Im Menschen werden die α -Defensine 1 - 4 von Neutrophilen Granulozyten gebildet (HNP1-4) (Tunzi et al., 2000). Humanes α -Defensin (HD) -5 und HD-6 sind zwei weitere Vertreter. Diese werden von PZ in den Krypten des Dünndarms gebildet (Quayle et al., 1998). Die PZ speichert HD-5 als Propeptid in Vesikeln und kann diese Propeptide infolge eines bakteriellen Stimulus in das Darmlumen abgeben. Ebenfalls wird von der PZ die Protease zur Aktivierung des Propeptides gebildet, gespeichert und abgegeben. HD-5 weist bereits in seiner nicht-prozessierten Form eine antimikrobielle Aktivität auf, welche nach Aktivierung noch einmal deutlich ansteigt (Ghosh et al., 2002). Allgemein sind Defensine in der Lage im bakteriellen Zytoplasma an DNA zu binden. Dadurch kommt der Stoffwechsel zum Erliegen und es folgt der Zelltod (Mathew and Nagaraj, 2015). Zusätzlich

ist HD-5 imstande, sowohl Makrophagen als auch naive T-Zellen sowie T-Gedächtniszellen chemotaktisch anzulocken (Grigat et al., 2007). Es konnte bereits gezeigt werden, dass HD-5 Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* sowie *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* und *Vibrio cholerae* abtötet. Des Weiteren konnte eine antimikrobielle Aktivität gegen einige Pilze und Viren nachgewiesen werden (Porter et al., 1997; Salzman et al., 2003; Zins et al., 2014).

HD-6 wird ebenfalls in den Granula der PZ als Propeptid gespeichert. Es ist im Gegensatz zu HD-5 in der Vorstufe nicht antimikrobiell aktiv, sondern wird erst durch eine Trypsin-katalysierte Hydrolyse aktiviert. HD-6 ist in der Lage, sich mit anderen HD-6-Monomeren zu verbinden und ein Nanonetz zu bilden, welches Bakterien einschließt und deren Einwanderung in die Dünndarmschleimhaut begrenzt. Nachgewiesen wurden diese Nanonetze in transgenen Mäusen, welche mit *Salmonella typhimurium* infiziert wurden (Chairatana et al., 2016; Chairatana and Nolan, 2014; Chu et al., 2012)

HD-5 und HD-6 stellen die Hauptvertreter der im Dünndarm vorkommenden AMPs dar. Die humanen β -Defensine spielen hier eine untergeordnete Rolle (Kübler et al., 2009).

1.2.3.2. Beta-Defensine

Beta-Defensine werden von allen epithelialen Oberflächen gebildet (Bals et al., 1998; Singh et al., 1998). Am besten erforscht sind die humanen β -Defensine (hBD)- 1 - 4. Während hBD-1 konstitutiv exprimiert wird, werden hBD-2 und hBD-3 besonders durch Gram-negative und -positive Bakterien aber auch durch den Tumornekrosefaktor (TNF) - α induziert (Harder et al., 2001; O'Neil et al., 1999; Yang et al., 2002). Im Dickdarm ist hBD-2 am stärksten vertreten (Kübler et al., 2009).

Das Wirkspektrum der humanen β -Defensine reicht von antimikrobieller, antiviraler und fungizider Aktivität bis zu chemotaktischen Effekten (Aerts et al., 2008; García et al., 2001; Harder et al., 2001; Pazgier et al., 2006; Weinberg et al., 2006). Insbesondere ist hBD-3 in der Lage, Monozyten und Neutrophile anzulocken und die Migration der Monozyten zu fördern (García et al., 2001).

Obwohl hBD-1 konstitutiv exprimiert wird, war dessen antimikrobielle Aktivität lange verborgen geblieben (Tollin et al., 2003). Erst unter reduzierenden Bedingungen konnte das Potential von hBD-1 gezeigt werden. Diese strukturellen Veränderungen machen es wirksam gegen *Candida albicans*, *Bifidobakterium* und *Lactobacillus*-Arten (Schroeder et al., 2011).

1.2.4. Bakterielle Mustererkennungsrezeptoren im Darm

Die wichtigsten Rezeptoren zur Erkennung von Bakterien sind in diesem Zusammenhang die *pattern recognition receptors* (PRRs), die zu dt. auch als Mustererkennungsrezeptoren bezeichnet werden. Zu den PRRs an der Zelloberfläche gehören beispielsweise die *toll-like receptors* (TLRs), während die *nucleotide binding oligomerization domain* (NOD) -like Rezeptoren den intrazellulären PRRs angehören (Murphy and Weaver, 2016, p. 9). Ihre Aufgabe ist es, fremde Proteine oder Pathogene anhand charakteristischer Muster zu erkennen und eine Signalkaskade auszulösen, mit dem Ziel die Immunantwort zu modulieren. Derartige charakteristische Muster werden unter dem Begriff der PAMPs zusammengefasst, genauer Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Akira et al., 2001).

Obwohl der Darm massiv mit Bakterien besiedelt ist, erfolgt keine permanente Aktivierung des Immunsystems. Bedingt ist dies durch die geringere Anzahl an TLRs im Vergleich zu anderen Geweben. Erst während einer Entzündungsreaktion im Darm wird die Expression der TLRs induziert (Abreu et al., 2001; Bogunovic et al., 2007; Cario and Podolsky, 2000). Die Aktivierung dieser führt letztlich zur erhöhten Proliferation der Epithelzellen und zur Sekretion von Immunglobulin (Ig) A und AMPs, welche in das Darmlumen abgegeben werden. Welche Reaktion die PAMPs auslösen hängt auch davon ab, ob es sich um kommensale oder pathogene Bakterien handelt oder ob sie sich an der apikalen oder basolateralen Seite der Darmepithelzelle an die TLRs binden. Eine Aktivierung der basolateralen TLRs spricht für eine gestörte Barriere (Lee et al., 2006).

Der intrazelluläre Rezeptor NOD2 wird sowohl in gesundem als auch chronisch-entzündetem Darmgewebe hauptsächlich von den PZ im terminalen Ileum

exprimiert (Lala et al., 2003). Er kommt darüber hinaus auch in den Monozyten und DCs vor und aktiviert den *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (Gutierrez et al., 2002, p. 2; Ogura et al., 2001, p. 2).

1.2.5. Immunzellen des Blutes

1.2.5.1. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Neben den gewebsständigen Immunzellen gibt es auch solche, die im Blut zirkulieren und erst bei Bedarf ins Gewebe migrieren und sich dort differenzieren. Mittels Dichtezentrifugation ist es möglich, bestimmte Fraktionen dieser Immunzellen aus dem Blut zu isolieren. Die so gewonnen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) beinhalten mit absteigenden Anteilen: Lymphozyten, Monozyten und Dendritische Zellen (Riedhammer et al., 2016). Monozyten machen etwa 5 - 10 % der peripheren Bluteukozyten aus (Gordon and Taylor, 2005).

Bakterien und virale Komponenten können das angeborene Immunsystem stimulieren. Die PBMCs werden dabei über verschiedene TLRs aktiviert und produzieren u.a. Zytokine. Diese wiederum beeinflussen das erworbene Immunsystem (Merlini et al., 2016; Riordan et al., 2003).

Phytohemagglutinin-leucocytes (PHA-L) wird standardmäßig zur Stimulation von PBMCs genutzt. Es aktiviert neben TLR5 und TLR2/6 spezifisch den TLR4 (Unitt and Hornigold, 2011). Die Stimulation von PBMCs mit PHA-L führt allgemein zur erhöhten Expression von verschiedenen Zytokinen, wie Interferon (IFN) γ , TNF- β , Interleukin (IL) -4, IL-5, IL-10 und TNF- α (Katial et al., 1998). PHA-L, als Stimulanz für PBMCs, steigert überdies in anderen Versuchen die Expression von IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α und *granulocyte macrophage colony-stimulation factor* (GM-CSF) (De Groote et al., 1992). GM-CSF und IL-4 beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Monozyten zu *monocyte-derived* dendritischen Zellen. Somit beeinflussen Monozyten durch die Expression verschiedener Zytokine ihre eigene Differenzierung (Geissmann et al., 2003).

Monozyten, die mit PHA-L stimuliert werden, exprimieren vermehrt IL-8 und Monozyten Chemotaktin Protein 1 (Liebler et al., 1994). Es ist zudem bekannt,

dass die Induktion der Monozytenexpression unspezifisch durch Adhärenz ausgelöst werden kann (Haskill et al., 1988).

1.2.5.2. Subpopulationen der Monozyten

Monozyten werden anhand spezifischer Oberflächenmarker in drei Subpopulationen unterteilt. Zur Unterscheidung werden Marker verwendet (*cluster of differentiation*, kurz CD), wie der Fc- γ -Rezeptor III (auch bekannt als CD16), der Co-Rezeptor von TLR-4, CD14, sowie Chemokinrezeptoren (CCR) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Die klassischen Monozyten sind CD14⁺⁺/CD16⁻ und stellen die größte Population unter den Monozyten dar. Sie tragen außerdem CCR2, welcher in Verbindung mit dem Chemokinliganden 2 (CCL2, Synonym für *monocyte chemoattractant protein 1*) die Migration ins Gewebe ermöglicht (Ancuta et al., 2009). Zusätzlich reagieren sie auch auf das macrophage inflammatory protein-1 α (Synonym für CCL3) mit Migration (Weber et al., 2000). Sie sind spezialisiert auf Phagozytose und die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies. Darüber hinaus bilden sie auch Entzündungsmediatoren als Reaktion auf bakterielle Bestandteile und nehmen Einfluss auf die Wundheilung, Gerinnung sowie Angiogenese. Ganz besonders hohe Expressionslevel wurden unter Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) für CCL2 und IL-10 gemessen. Darüber hinaus scheinen sich klassische Monozyten durch die Expression von GM-CSF gegenseitig zu Proliferation und Differenzierung anzuregen (Cros et al., 2010; Wong et al., 2011; Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Die intermediären Monozyten gehörten lange zusammen mit den nicht-klassischen zu den CD16⁺ Monozyten. Später war es möglich, auch diese Fraktion näher zu charakterisieren (Ancuta et al., 2009). Die intermediären Monozyten werden nun als CD14⁺⁺/CD16⁺ bezeichnet und stellen im Vergleich zu den klassischen Monozyten eine wesentlich kleinere Fraktion dar, die aber bei bestimmten akuten und chronischen Infektionen ansteigen kann. Sie sind zudem dadurch gekennzeichnet, dass sie über ihre MHC-Proteine der Klasse II CD4⁺-T-Lymphozyten Antigene präsentieren können (Fingerle et al., 1993; Passlick et al., 1989).

Die nicht-klassischen Monozyten werden als CD14⁺/CD16⁺⁺ beschrieben. Ihre Fähigkeit zur Phagozytose ist vernachlässigbar und sie können auch keine reaktiven Sauerstoffspezies bilden. Als Ersatz dafür reagieren sie auf virale Reize und Immunkomplex-Stimulation mit der Produktion von CCL3. Der Signalweg läuft hier über TLR-7 und TLR-8 (Cros et al., 2010).

In einer Studie von Wong *et al.* wurde unter anderem die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen anhand von Kontrollen beschrieben und umfasste 84,8 % ± 5,6 % klassische, 5,4 % ± 1,9 % intermediäre und 9,2 % ± 4,4 % nicht-klassische Monozyten (Wong et al., 2011).

1.2.5.3. Subpopulationen der Dendritischen Zellen

Die DCs wurden 1973 von Ralph Steinman und Zanvil Cohn entdeckt (Steinman and Cohn, 1973). Es handelt sich dabei um Zellen, die von Monozyten oder Lymphozyten – also dem angeborenen Immunsystem abstammen (Liu et al., 2001).

Sie machen maximal 1 % aller PBMCs aus und lassen sich in drei Subpopulationen unterteilen: plasmacytoide CD303⁺ (CD1c⁻) DCs, myeloide CD1c⁺ DCs und myeloide CD141⁺ DCs (O’Keeffe et al., 2015; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Die Subpopulation der myeloiden CD141⁺ DCs stellt mit maximal 0,03 % Anteil an den PBMCs die absolut kleinste Fraktion der drei Vertreter dar (O’Keeffe et al., 2015).

Trotz ihrer geringen Anzahl nehmen sie sehr großen Einfluss auf das erworbene Immunsystem. Als klassische Antigen-präsentierende Zellen sind sie im Stande Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und über MHC Klasse II-Moleküle naiven T-Zellen zu präsentieren. So reicht bereits eine dendritische Zelle aus, um 100 bis 3000 T-Zellen zu aktivieren (Banchereau and Steinman, 1998; Kambayashi and Laufer, 2014).

1.3. Regulation im Dünndarmepithel

Das Dünndarmepithel ist ein Zusammenschluss von verschiedensten Zellen, wie den Enterozyten, Enteroendokrinen Zellen, Becherzellen und den PZ. Sie alle haben einen gemeinsamen Ursprung: die SZ. Zwischen den vielen Villi des Dünndarms finden sich auch Einstülpungen, die als Lieberkühn-Krypten bezeichnet werden. An ihrer Basis liegen SZ und PZ. Wie die Epithelzellen des Dünndarms zusammengesetzt sind und wie die Zellen proliferieren, hängt von vier wichtigen Signalmolekülen ab: hedgehog, *bone morphogenic proteins*, Notch sowie *Wingless-related integration site* (Wnt) (Vanuytsel et al., 2013). Sie zusammen schaffen in den Lieberkühn-Krypten ein definiertes Milieu von Faktoren. Eine Störung in einem dieser Signalwege kann letztlich zum Zusammenbruch der intestinalen Barriere führen (Martini et al., 2017).

1.3.1. Paneth-Zellen

1872 entdeckte der deutsche Anatom Gustav Schwalbe Zellen mit apikalen azidophilen Granula, die sich in den Krypten des Dünndarms befanden. Dennoch wurden sie später nach dem australischen Histologen und Physiologen Josef Paneth benannt, der deren Morphologie noch näher beschrieb. Erst in den 1960er und 70er Jahren erlangte man weitere Erkenntnisse über die Funktion der PZ mit dem Nachweis ihrer AMPs. Diese dienen dem Schutz der SZ an der Kryptenbasis (Bykov, 2014).

Die Freisetzung der Granula der PZ erfolgte durch Exozytose infolge bestimmter Stimuli. Diese können PAMPs, Acetylcholin- oder TLR-Agonisten sein (Clevers and Bevins, 2013). Die Erkennung bakterieller Antigene, wie LPS, erfolgt unter anderem über den NOD2-Genprodukte, welche von PZ wie auch Monozyten und Enterozyten gebildet werden (Lala et al., 2003). Die Granula enthalten antimikrobielle Substanzen, die teilweise konstitutiv gebildet und teilweise induziert werden. Neben Lysozym, Phospholipase A2 und dem Pankreas-assoziierten Protein stellen die α -Defensine die wichtigste Gruppe dar (Bevins and Salzman, 2011). Abgesehen von den Abwehrstoffen sekretieren PZ auch Signalmoleküle, die Einfluss auf die SZ nehmen. Der *epidermal growth factor*, *transforming growth factor- α* , Wnt-3 und der Notch-Ligand delta like

ligand 4 erhalten die Funktionen der *leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-5*-Stammzellen (Sato et al., 2011). Jede Lieberkühn-Krypte weist neben den etwa 15 SZ auch rund 10 PZ auf. Ihre Anzahl muss streng reguliert sein, damit das Gleichgewicht aufrecht gehalten werden kann. Während der Großteil der Zellen innerhalb von drei bis fünf Tagen nach oben wandert, wandern die sich neu bildenden PZ nach unten an die Basis. Dort leben sie für etwa 30 Tage, ehe sie durch Phagozytose abgebaut werden (Clatworthy and Subramanian, 2001; Clevers and Bevins, 2013; Falk et al., 1994; Sancho et al., 2003). Dieses komplexe Spiel zwischen Proliferation und Differenzierung unterliegt hochkontrollierten Signalwegen (Clevers, 2013).

Neben den Mesenchym- und Epithelzellen sind es vor allem die PZ, die Wnt-Liganden sekretieren und welche wiederum in ihren Zielzellen zur Aktivierung des kanonischen oder nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs führen (Krausova and Korinek, 2014).

1.3.2. Wnt-Signalweg im Dünndarm

1991 prägten Nusse *et al.* den Hybridbegriff „WNT“ für *Wingless-related integration site*. Damit beschrieben sie ein Segment-Polaritätsgen (*wingless*), welches für die Ausbildung der Drosophila-Flügel hauptverantwortlich ist, und dessen Homolog im Menschen 1982 entdeckt wurde und als *int1* bezeichnet wird. Die INT1/Wingless Familie umfasst im Säugetier 19 Gene, die hoch konserviert sind (Miller, 2002; Nusse and Varmus, 2012; Pai et al., 2017).

Die Sekretion von Wnt-Liganden in den Extrazellularraum ist komplex und Bedarf zweier wichtiger Proteine. *Wntless protein* (WLS), auch *Evenness interrupted protein* (EVI) genannt, transportiert die Wnt-Liganden vom Golgi zur Zelloberfläche und unterstützt die Exozytose. Unterdessen ist *porcupine* (PORCN) - als Protein des Endoplasmatischen Retikulums (ER) – notwendig, um die Wnt-Liganden für die Interaktion und Sekretion mit EVI zu modifizieren (Biechele et al., 2011; Herr and Basler, 2012; Wang et al., 2007). Wenn Wnt-Liganden ihre Zielzelle erreichen, binden sie an Wnt-Rezeptoren und können unterschiedliche Kaskaden auslösen. Man unterscheidet zur Vereinfachung drei große Signalwege: den β -Catenin-abhängigen (kanonischen) und zwei β -

Catenin-unabhängige (nicht-kanonische) Signalwege, der *planar cell polarity*- sowie der Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Ausgelöst werden die Signalkaskaden durch mehr als 15 verschiedene Rezeptoren und Co-Rezeptoren. Aus der Kombination dieser mit verschiedenen Wnt-Liganden und der Ausstattung der Zielzelle ergeben sich unterschiedlichste Wirkungsweisen (Niehrs, 2012). Jedoch binden fast alle Wnt-Liganden an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor *frizzled* (Fz) (Dijksterhuis et al., 2014).

Es gibt Hinweise darauf, dass Wnt-1 und Wnt-3a besonders wichtig für die Aktivierung der kanonischen Kaskade sind (Niehrs, 2012). Zusätzlich zu den Wnt-Liganden agiert R-Spondin (RSPO) als ein weiterer Wnt-Agonist, in dem er schwache Wnt-Signale verstärkt (Cruciat and Niehrs, 2013; de Lau et al., 2012).

Die kanonische Kaskade kann aber auch negativ durch Antagonisten, wie Vertretern der Dickkopf- (DKK) und *secreted frizzled-related protein*- (SFRP) Familie sowie *Wnt inhibitory factor 1* (WIF-1), beeinflusst werden. Wie genau DKK die Funktion von *lipoprotein rezeptor-related protein* (LRP) -5/-6 behindert, ist nicht bekannt (Semënov et al., 2008, p. 1). SFRPs können sowohl an Wnt-Liganden als auch an den Fz-Rezeptor binden (Cruciat and Niehrs, 2013). WIF-1 hingegen bindet direkt die extrazellulären Wnt-Liganden und verhindert damit nachfolgend die Aktivierung des Signalweges (siehe Abbildung 1) (Surmann-Schmitt et al., 2009).

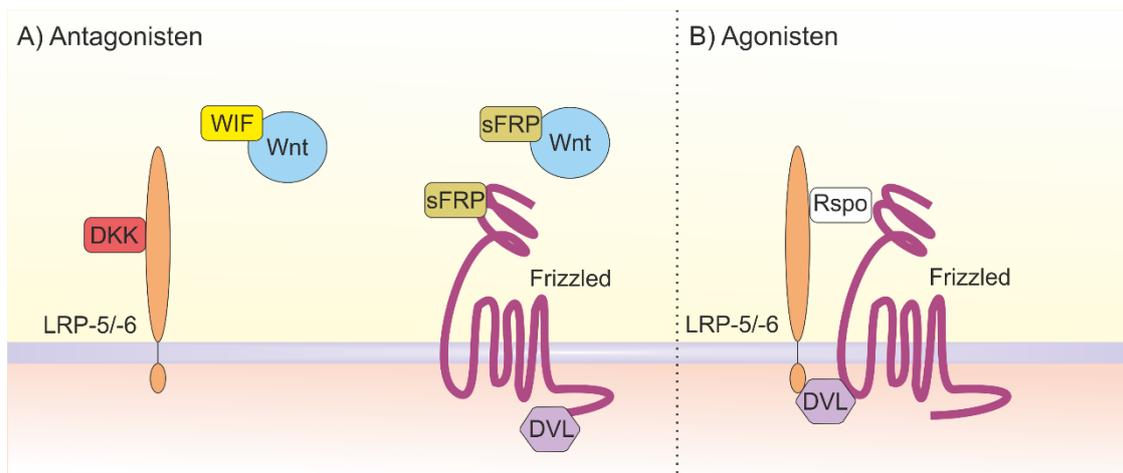


Abbildung 1: Antagonisten und Agonisten des kanonischen Wnt-Signalweges

Der kanonische Wnt-Signalwegs (A) kann durch die Bindung von DKK an LRP-5/-6 gehemmt werden. Des Weiteren kann eine Inaktivierung durch sFRP erfolgen, welches nicht nur an die Wnt-Liganden selbst, sondern auch an den Fz-Rezeptor bindet. Die Wnt-Signalkaskade kann durch das Protein Rspo zusätzlich aktiviert werden (B), in dem es schwache Wnt-Signale verstärkt.

In der Kryptenbasis ist vor allem der kanonische Signalweg für die Proliferation der Zellen entscheidend. Dort, innerhalb der Lieberkühn-Krypten, befindet sich auch die höchste Konzentration an Wnt-Liganden (Dijksterhuis et al., 2014). Sind diese anwesend, bindet SFRP an den Fz-Rezeptor sowie die Co-Rezeptoren LRP-5 und LRP-6. Dadurch wird das Protein Dishevelled (DVL) aktiviert, welches wiederum den nachfolgenden Komplex in der Signalkaskade inhibiert. Es handelt sich dabei um den *destruction complex (DesCom)*, der sich aus *glycogen synthase kinase 3*, Adenomatous polyposis coli-Protein (APC), Casein Kinase α und *axis inhibition protein (Axin)* zusammensetzt. Aktiviert baut er β -Catenin ab und verhindert so dessen Anreicherung in der Zelle. Wird der *DesCom* aber inhibiert, kommt es zum Anstieg der β -Catenin-Konzentration in der Zelle und der Verlagerung in den Zellkern (Henderson and Fagotto, 2002; Städeli et al., 2006). Es bildet sich im Zellkern ein Komplex aus TCF/LEF (*t-cell factor/lymphoid enhancer factor*) und β -Catenin, welches das *transducin-like enhancer protein 1 (TLE1)* verdrängen kann, sich an *Wnt-responsive elements (WRE)* der DNA binden und zudem weitere Ko-Aktivatoren zur Genaktivierung rekrutieren kann (siehe Abbildung 2) (Brantjes et al., 2002; Daniels and Weis, 2005; Hatzis et al., 2008). Zur TCF/LEF-Familie gehören im Säugetier 4 Gene,

die für TCF-1, LEF-1, TCF-3 und TCF-4 codieren (Hoppler and Kavanagh, 2007). TLE1 ist ein Repressor, der normalerweise die Histon-Deacetylierung fördert, die eine Verdichtung des Chromatins zur Folge hat. Dadurch wird die Genexpression gehemmt. Aber auch TCF/LEF wirken nicht nur förderlich auf die Genexpression. Insbesondere TCF-3 agiert häufiger als Repressor anstatt als Aktivator (Arce et al., 2006; MacDonald et al., 2009).

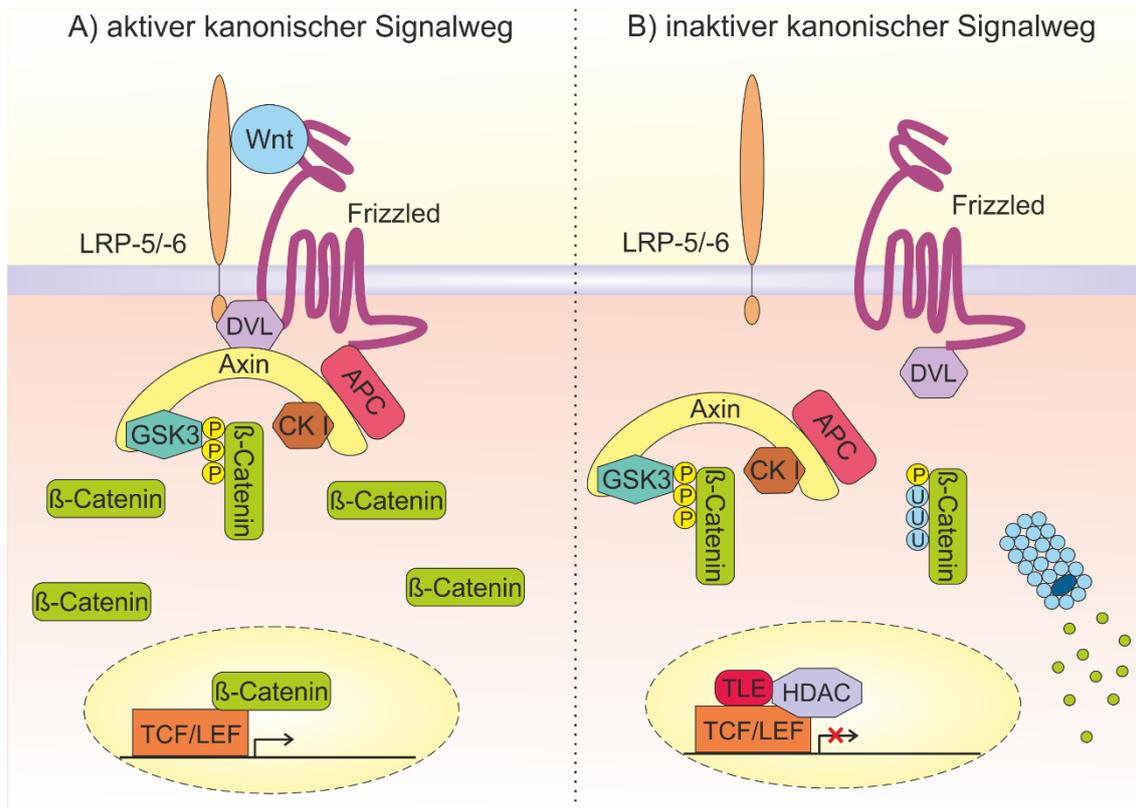


Abbildung 2: Der kanonische Wnt-Signalweg

Hier dargestellt ist der kanonische Wnt-Signalweg. In aktiver Form (A) binden Wnt-Liganden an den Rezeptorkomplex aus LRP-5/-6 und Fz. Der *destruction complex* ist dadurch inaktiv und β-Catenin reichert sich im Zytosol an und im Zellkern an. Der Komplex aus TCF/LEF mit β-Catenin bindet an *Wnt-responsive elements* und fördert die Genexpression. In (B) dargestellt ist der inaktivierte kanonische Wnt-Signalweg, welcher durch Abwesenheit von Wnt-Liganden gekennzeichnet ist. Dadurch ist der *destruction complex* aktiv und β-Catenin wird in Folge der Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut. Der Komplex von TCF/LEF kann TLE nicht verdrängen. Die HDACs hemmen die Genexpression der *Wnt-responsive elements*.

Die Wnt-Signalkaskade hat einen großen Einfluss auf die Regulation der intestinalen SZ und auf die Differenzierung der PZ. So hat man bei Patienten mit Morbus Crohn (MC) des Dünndarms eine Reduktion der α-Defensine (HD-5 und HD-6) festgestellt, die auf eine gestörte Funktion von TCF-1, TCF-4 und LRP-6 zurück zu führen ist (Beisner et al., 2014; Koslowski et al., 2012;

Wehkamp et al., 2005). Dies macht deutlich, wie wichtig diese Signalkaskade für die intestinale Abwehr und Proliferation der Dünndarmschleimhaut ist.

1.3.3. Histon-Deacetylasen

Histon-Deacetylasen (HDACs) sind an der epigenetischen Regulation der Transkription beteiligt. Sie verändern Acetylgruppen von Histon- und Nicht-Histon-Proteinen. Durch die Deacetylierung der Chromatinstruktur wird die Transkription dieser Bereiche stillgelegt. Das richtige Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylasen und HDACs ist entscheidend für das Zellwachstum (Lehrmann et al., 2002). Die HDACs werden in verschiedene Klassen eingeteilt und diese wiederum zwei Familien zugeordnet. Zur Familie der klassischen HDACs gehören die Klasse 1 (HDAC1 - 3 und 8), Klasse 2a (HDAC4, 5, 7 und 9), Klasse 2b (HDAC6 und 10) sowie die Klasse 4 (HDAC11). Die Klasse 3 gehört zu der *sirtuins nicotinamid dependent family* (Seto and Yoshida, 2014).

1.4. Barrierestörung: Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

CEDs sind gekennzeichnet durch wiederkehrende Entzündungen des Verdauungssystems. Im Rahmen der Entzündung kommt es zur Einwanderung von verschiedenen Immunzellen. Die Immunantwort, als Reaktion auf eigentlich kommensale Bakterien, geht über das normale Maß hinaus (Podolsky, 2002). Die Inzidenz der Erkrankung nimmt immer weiter zu und meist sind Menschen zwischen dem 20. und 49. Lebensjahr betroffen. Einige wenige Studien weisen auf einen zweiten Peak im 50. bis 79. Lebensjahr hin. Über dieses Alter hinaus sind kaum Fälle beschrieben (Koutsounas et al., 2012; Molodecky et al., 2012). Die Pathogenese von CED wird als multifaktoriell beschrieben, sodass sowohl die Umwelt als auch Genetik und Epigenetik Anteil an der Entstehung der Erkrankung haben (Gearry, 2016; Sartor, 2008; Van Limbergen et al., 2014; Ventham et al., 2013). Dieser Umstand macht es schwer, eine grundlegende Therapie zu finden. Lange Zeit hat man versucht, die erhöhten Levels von Entzündungsmediatoren, wie IL-17, IL-23 und TNF- α zu blockieren (Neurath, 2014). So erzielte der Einsatz von TNF-Antikörpern (TNF-AK) unterschiedlich gute Ergebnisse zwischen MC und CU und den unterschiedlichen klinischen Bildern, wie z.B. der Einfluss auf die Fistelbildung bei MC. Unter der Therapie

reduziert sich die Entzündung und die Permeabilität des Darms normalisiert sich wieder. Dem gegenüber stehen aber die Langzeitriskien einer anti-TNF-Therapie, wie Melanome, Lymphome und ganz allgemeine Infektionen (Michielan and D'Inca, 2015; Peyrin-Biroulet, 2010).

Bei Untersuchungen der Mukosa fiel auf, dass die sonst keimarme Schicht bei CED stark besiedelt ist (Swidsinski et al., 2002). CED geht zudem mit einer erhöhten Permeabilität der Membran und verringerten Expression von AMPs einher (Ostaff et al., 2013; Salim and Söderholm, 2011). Die kommensalen Bakterien überschreiten die Barriere und damit die Toleranzfähigkeit des Immunsystems. Es folgt eine überschießende T-Zell-Antwort (Belkaid et al., 2013; Mow et al., 2004). Die Durchlässigkeit der Membran nimmt in der Entzündungssituation zu und führt zum Verlust von Mineralstoffen und Wasser. Außerdem führt der Defekt in der Membran zu einer verminderten Resorption von Nährstoffen (Salim and Söderholm, 2011; Söderholm et al., 1999). CED steht auch in Verbindung mit einer veränderten Zusammensetzung des Mikrobioms (Frank et al., 2007; Verma et al., 2010).

CEDs werden üblicherweise anhand der Klinik in MC und CU unterschieden. Auch die molekularen Mechanismen der beiden Gruppen unterscheiden sich voneinander (Fuss et al., 1996; Podolsky, 2002).

1.4.1. Morbus Crohn

MC tritt in Europa mit einer Häufigkeit von bis zu 322 / 100.000 Menschen auf und jährlich werden bis zu 13 / 100.000 Neuerkrankungen verzeichnet (Molodecky et al., 2012). Da die Mukosa-überschreitenden Entzündungsherde von Mund bis Anus unterschiedlichste Lokalisationen aufweisen können, ist es notwendig, diese Anhand einer Klassifikation einzuteilen. Nach der Vienna Klassifikation wird unterschieden in einen selektiven Befall des Dünndarms (L1), des Dickdarms (L2), eine Kombination aus Dünndarm- sowie Dickdarmbefall (L3) und das zusätzliche Auftreten von Herden im oberen Verdauungstrakt (+L4). Meist behält ein Patient den für ihn typischen Befall relativ konstant im Laufe seiner Erkrankung. Bei nur 15,9 % der MC-Patienten veränderte sich der Lokalisationstyp innerhalb von 10 Jahren. Die Art der

Komplikation bzw. des Befalls hingegen veränderte sich in derselben Zeit bei 45,9 % der MC-Patienten. So traten beispielweise erstmals Strikturen auf oder Entzündungen penetrierten tiefere Schleimhautschichten (Louis et al., 2001). Die Unterteilung nach Lokalisationstyp findet Anwendung bei genetischen Analysen oder Untersuchungen auf molekularer Ebene. Vor allem die Zusammensetzung und Menge der Defensine und Bakterien unterscheiden sich im Dünndarm und Dickdarm stark voneinander (Koslowski et al., 2012; Nuding et al., 2009). Aber auch die bisherigen Erkenntnisse über Defekte in der Induktion der AMPs bzw. deren Expression bedürfen einer Unterscheidung in L1 und L2 (Ostaff et al., 2013).

1.4.2. Dünndarm

In 70 % der Fälle haben die MC-Patienten einen Dünndarmbefall. Viele Studien fokussieren sich auf die Rolle der PZ bei MC. Bereits bekannt ist, dass bei MC weniger der α -Defensine HD-5 und HD-6 exprimiert wird. Dies hat zur Folge, dass die Bakterien weniger gut abgetötet werden können (siehe Abbildung 3) (Wehkamp et al., 2005). Der Effekt ist unabhängig der Einnahme von Kortikosteroiden, Azathioprin und Aminosalizylaten. Was aber auch bedeutet, dass diese Medikamente nicht förderlich auf die Barrierestörung wirken (Kübler et al., 2009). Die Expression von HD-5 und HD-6 durch PZ wird streng über den Wnt-Signalweg reguliert. Dieser weist bei MC-Patienten einige Störungen auf. So ist nachweislich die Expression von TCF-1 und TCF-4 (auch bekannt als TCF7L2) in MC-Patienten verringert (Beisner et al., 2014; Perminow et al., 2010). Es wurde überdies eine LRP-6-Rezeptorvariante und Mutation des *tcf-4*-Gens gefunden, die ebenfalls mit einer verringerten Bildung von HD-5 bzw. HD-6 einhergeht (Koslowski et al., 2012, 2009). Hinsichtlich der Expression von NOD2-Rezeptoren in der PZ fiel auf, dass es auch hier Genvarianten gibt, die weniger Defensine bilden (Wehkamp et al., 2004). Das Gen *nod2* war das erste Gen, das mit MC in Verbindung gebracht werden konnte (2001) und gilt heute als Hochrisikofaktor (Economou et al., 2004; Wang and Picco, 2017). MC-Patienten mit Risikovarianten des *nod2*-Gens exprimierten signifikant geringere mRNA-Levels vom *calcium mediated potassium channel subfamily N member*

4. Dieses Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Sekretion von Stoffen aus der PZ (Simms et al., 2010). Ein Polymorphismus im *autophagy related 16 like 1*-Gen erhöht die Anfälligkeit für MC. Patienten in Remission oder Kontrollen, die das Risikoallel tragen, weisen auch erhöhten ER-Stress in der PZ auf (Deuring et al., 2014). Veränderungen im Gen für den Transkriptionsfaktor *x-box binding protein 1* stehen sowohl mit MC als auch CU in Verbindung. In PZ können diese Veränderungen Apoptose induzieren und so Entzündungen verursachen (Adolph et al., 2013; Kaser et al., 2008; Sano and Reed, 2013). Die bisherigen Erkenntnisse machen nur deutlich, welche wichtige Rolle die PZ bei MC des Dünndarms spielt, aber sie zeigen noch keinen vollständigen Mechanismus auf.

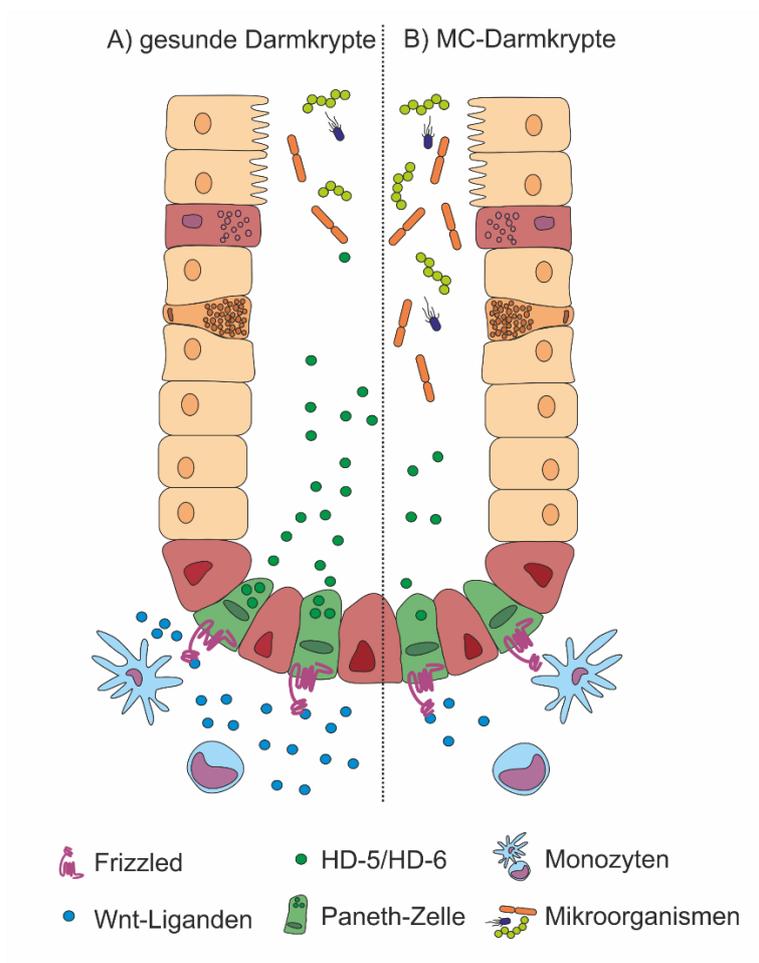


Abbildung 3: Hypothese zu den Bedingungen in der Lieberkühn-Krypte während einer Entzündung

Unter A dargestellt ist die Lieberkühn-Krypte während einer Entzündung. Die Expression von HD-5 und HD-6, durch die PZ, ist hochreguliert. In B dargestellt ist die Reaktion wie sie in einer Lieberkühn-Krypte bei MC-Patienten vermutet wird. Hier liegt eine verminderte Expression von Wnt-Liganden durch die Monozyten vor. Dadurch werden weniger Defensine zum Schutz vor Bakterien gebildet. Eine Infektion ist sehr wahrscheinlich.

1.4.3. Dickdarm

Wesentlich weniger Studien befassen sich im Speziellen mit der Ursache von MC des Dickdarms. Bekannt ist, dass die konstitutive Expression von hBD-1 bei MC verringert ist. Auch hBD-2, welches zuerst induziert werden muss, wird in einer Entzündungssituation im Vergleich zu CU weniger exprimiert (Wehkamp et al., 2003). Für die Defensine hBD-3 und hBD-4 konnten bisher noch keine eindeutigen Unterschiede in der Expression zwischen Patienten mit MC und Kontrollprobanden festgestellt (Fahlgren et al., 2004; Wehkamp et al., 2003). Darüber hinaus ist aber bekannt, dass die Induzierbarkeit von *secretory*

leukocyte protease inhibitor und Elafin (auch bekannt als *skin derived antileukoprotease*) als defensinähnliches Molekül mit breiter antimikrobieller Aktivität bei MC verringert ist (Schmid et al., 2007). Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss von Probiotika, wie *Lactobacilli* und der Bakterienmix VSL#3. Diese sind in der Lage, in CaCo-2-Zellen hBD-2 zu induzieren und so die intestinale Barriere zu stärken. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung neuer Therapieansätze (Schlee et al., 2008).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

MC vom Dünndarmtyp ist dadurch gekennzeichnet, dass die Barrierefunktion der Schleimhaut gestört ist. Vornehmlich bedingt durch die geringere Produktion der humanen α -Defensine HD-5 und HD-6 durch die PZ können Bakterien leichter die Epithelschicht überwinden und massive Entzündungen mit einer Infiltration von Immunzellen auslösen. Die PZ wiederum werden stark durch den Wnt-Signalweg reguliert. Lioba Courth hat sich besonders mit den externen Einflüssen auf diese Regulation beschäftigt. Sie konnte bereits zeigen, dass Dünndarm-Biopsien von MC-Patienten nach Stimulation mit gesunden PBMC-Überständen signifikant zur Induktion von α -Defensinen in der Lage sind. Dieser Effekt blieb jedoch aus, wenn die PBMC-Überstände von Patienten mit MC des Ileums stammten. Daraus konnte man schließen, dass ein funktioneller Defekt in den PBMCs vorliegen musste. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt über Wnt-Liganden vermittelt wurde. Die Analyse der vier wichtigsten Wnt-Liganden exprimiert durch PBMCs bzw. adhärenente Zellen der PBMCs zeigten verminderte Expressionslevel. Dies führte zur Erkenntnis, dass das Epithel von Patienten mit ilealem MC selbst zur Induktion von Defensinen fähig ist, jedoch die adhärenente Zellen der PBMCs der MC-Patienten einen funktionellen Defekt aufwiesen, der in einer Barriestörung resultierte (Courth et al., 2015).

Ziel dieser Arbeit war es heraus zu finden, ob die unterschiedliche Induzierbarkeit der α -Defensine bedingt ist durch quantitative oder qualitative Veränderungen der adhärenente Zellen der PBMCs bei MC. Dazu war es notwendig ein Verfahren zu etablieren, welches es ermöglicht Subpopulationen

aus PBMCs zu identifizieren, quantitativ zu messen und darüber hinaus die identifizierten Populationen zu isolieren, sie zu stimulieren und ihre Genexpression zu messen. Diese Messung sollte über die mRNA-Analyse der Wnt-Liganden hinausgehen und weitere Teile der Signalkaskade untersuchen. Da bereits gezeigt wurde, dass auch der Wnt-Signalweg epigenetisch reguliert werden kann (H. Wang et al., 2016), sollte auch die Expression verschiedener HDACs gemessen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle hier nicht aufgelisteten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien gehören zur Grundausrüstung eines Labors.

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Geräteliste mit Angaben zum Hersteller

Gerät	Hersteller
BD FACS Aria	BD Bioscience, USA
BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer	BD Bioscience, USA
Hearus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Fischer Scientific, USA
Heracell vios 160i Brutschrank	Thermo Fischer Scientific, USA
LightCycler® 480	Roche, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon Instruments Europe B.V., Niederlande
Mikroskop Primovert	Zeiss, Deutschland
Multifuge 3 S-R Hearus	Thermo Fischer Scientific, USA
Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie, Deutschland
Rollmischer RS-TR05	Phoenix Instrument, Deutschland
Sterilwerkbank Maxisafe 2020	Thermo Fischer Scientific, USA
Thermocycler	Eppendorf, Deutschland
Wasserbad	Neolab, Deutschland
Zählkammer	Neubauer, Deutschland

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien mit Angaben zum Hersteller

Artikel	Hersteller
Cellstar® 24 Well Cell Culture Plate	Greiner bio-one, Deutschland
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche, Deutschland
S-Monovette® EDTA KE/9ml	Sarstedt, Deutschland
EASYstrainer™ Cell Sieves 40µm	Greiner Bio-One, Deutschland

2.1.3. Chemikalien, Antikörper und Kits

2.1.3.1. Chemikalien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien mit Angaben zum Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Asparagine	Merck Millipore, Germany
Biocoll (Ficoll)	Merck Millipore, Deutschland
DPBS	Gibco®, Life technologies™, USA
FCS	Life Technologies™, USA
Glutamaxx	Life Technologies, USA
Hepes Buffer, 1M	Invitrogen, USA
Non-Essential Amino Acids Solution 100x	Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies, USA
PHA-L	Merck Millipore, Deutschland
RPMI 1640	Merck Millipore, Deutschland
Sodium Pyruvate (100 nM)	Life Technologies, USA

Trypanblau	Sigma-Aldrich, USA
------------	--------------------

2.1.3.2. Antikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper mit Angaben zum Klon und Hersteller

Antikörper	Klon	Hersteller
CD 1c PE-Dazzle	L161	Biolegend, USA
CD 3 BV510	OKT3	Biolegend, USA
CD 11c PE-Cy7	Bu15	Biolegend, USA
CD14 FITC	M5E2	Biolegend, USA
CD 16 AF700	3G8	Biolegend, USA
CD 16 APC anti-human	3G8	Biolegend, USA
CD 19 BV510	HIB19	Biolegend, USA
CD 20 BV510	2H7	Biolegend, USA
CD 56 BV510	HCD56	Biolegend, USA
CD 141 APC	M80	Biolegend, USA
CD 303 PerCP/Cy5.5	201A	Biolegend, USA
HLA-DR BV650	L243	Biolegend, USA
Human Ig-G bloc	-	Sigma-Aldrich, USA
Zombie Aqua	-	Biolegend, USA

2.1.3.3. Kits

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits mit Angaben zum Hersteller

Kits	Hersteller
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, USA
LightCycler®480 SYBR Green I Master Kit	Roche, Deutschland

2.1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Liste der angesetzten Puffer und Lösungen mit deren Zusammensetzung

FACS-Puffer	PBS	500 ml
	FCS	5 ml
	Natriumazid (10 %ig)	4,5 ml
	EDTA (100 mM)	1 ml
Sorting Buffer	PBS	47,75 ml
	BSA (10 %ig)	1,25 ml
	EDTA (100 mM)	1 ml
RPMI full medium	RPMI	500 ml
	FCS	50 ml
	AddR	29 ml
AddR (20x)	Pen/Strep	100 ml
	β-Mercaptoethanol	100 ml
	Hepes Buffer (1 M)	100 ml
	Asparagine (10 mg/ml)	20 ml

Sodium Pyruvate	100 ml
Glutamaxx	100 ml
NEAA	60 ml

2.1.5. Humane Primer und Plasmide

Alle in der Arbeit verwendeten Plasmide wurden in der AG Wehkamp hergestellt. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Deutschland) bezogen.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer mit Angaben zu den Primersequenzen für die qualitative Real Time-PCR

Primer	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
EVI/WLS	TCA TGG TAT TTC AGG TGT TTC G	GCA TGA GGA ACT TGA ACC TAA AA
APC	AAA CGA GCA CAG CGA AGA AT	CTG CCA CTC CTT GAC CTT CA
Axin-2 1se/1as	CTG GCT TTG GTG AAC TGT TG	AGT TGC TCA CAG CCA AGA CA
β-Actin	GCC AAC CGC GAG AAG ATG A	CAT CAC GAT GCC AGT GGT A
DKK 1 for/rev1	GGG TCT TTG TCG CGA TGG TA	CGG GTA CGG CTG GTA GTT G
DKK 2	CTC GCT TGG GTT CCG CTA A	GCC GAA TGC CAG TCC TTG
DKK 3 for/rev2 PI.4	TGG GGT CAC TGC ACC AAA AT	GGT GAT GAG GTC CAG AAG CC
DVL-2	TCA CGC TAA ACA TGG AGA AGT	TGG GAA GGT GCC AGT CAG
DVL-3	TAC ATC TTC GGT GAC CTC TGC	TGC GGG TTG TAT GGG TGC
Fz-5 Variante 1	TCG GTG CTG TGC TTC ATC TCC	AGG GCC CGT GGT CTG GTA GTG
HDAC1	CCA AGT ACC ACA GCG ATG AC	TGG ACA GTC CTC ACC AAC G
HDAC3	GAGTGGCCGCTACTACTGTC	ATTCAACGCATTCCCCATGC

HDAC8	GCT GGT CCC GGT TTA TAT CT	TGC AGT GCA TAT GCT TCA ATC
HDAC9	TCA GCT CAG TGG ATG TGA AGT	GCT GCC GTG TCA AGT TCT CAT
HPRT1	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GA	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT
LEF-1	AAA GAC AAT CAC TGC CAA CC	TGC CTT GCC GAA AGG TTA
LRP-6	TGC CAT TGC CAT AGA TTA C	CCA TTG AGC CTT GTC ACT
TCF-1 se/as new	CTC ATA AGT TGG ACC AGA GGA AG	GGC GGA CTG AAT GCT GAA AGA
TCF-12	TGG TCA CCC GTA TTT CCT	TTT GGG TCC TTT CCT CTG
Wnt-1 for/rev4	CCG ATG GTG GGG TAT TGT GAA	TCC CCG GAT TTT GGC GTA TC
Wnt-2 for/rev3	TAG TCG GGA ATC TGC CTT TG	AAA TGC CTT TGC TGT CCT TG
Wnt-3 2se/as	ATG CCA CTG CAT CTT CCA CT	GTG CCC TAC TTG CAG GGT GT
Wnt-3A	TTG TCC ACG CCA TTG CCT CA	AGA CAC CAT CCC ACC AAA CTC G
Wnt-9B	TGC CAC TCA CCA CCA TTC CTT	ATG TCT TTC TCA CTC TGC CCT CC

2.1.6. Probanden

Alle Probanden (MC-Patienten und Kontrollprobanden) gaben ihre informierte und schriftliche Einverständniserklärung und wurden zuvor über die Risiken der Probenentnahme durch einen Arzt aufgeklärt. Die Blutabnahme der Patienten erfolgte in der MC-Sprechstunde. Die Kontrollen wurden durch mich abgenommen.

Es wurde nicht nach dem Alter oder Geschlecht selektiert.

Die Diagnosen der MC-Patienten wurden durch den aufklärenden Arzt anhand der klinischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Befunde gestellt.

Das zustimmende Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Tübingen liegt vor (Nr. 687/2012B01).

2.1.6.1. *Ex vivo* PBMC Zell-Analyse Kollektiv

Tabelle 8: Zusammensetzung des *ex vivo* PBMC Kollektivs bei der Zell-Analyse

Gruppe	N (total)
MC-Patienten	6
Kontrollprobanden	5

2.1.6.2. *Ex vivo* PBMC Zell-Sortierung Kollektiv

Tabelle 9: Zusammensetzung des *ex vivo* PBMC Kollektivs bei der Zell-Sortierung mit Angaben zum Geschlecht und der Lokalisation des MC

Gruppe	N (total)	Geschlecht		Lokalisation	
		w	m	L2	L3
MC-Patienten	6	33 %	66 %	33 %	66 %
Kontrollprobanden	10	40 %	60 %		

2.1.6.3. *Ex vivo* PBMC Stimulation Kollektiv

Angegeben ist hier die Verteilung der Proben, aus denen ausreichend *complementary DNA* (cDNA) für eine Expressionsanalyse extrahiert werden konnten.

Tabelle 10: Zusammensetzung des ex vivo PBMC Kollektivs, welches nach der Zell-Sortierung stimuliert wurde, mit Angaben zum Geschlecht und der Lokalisation des MC

Gruppe	N (total)	Geschlecht		Lokalisation	
		w	m	L2	L3
MC-Patienten	6	33 %	66 %	33 %	66 %
Kontrollprobanden	4	50 %	50 %		

2.1.7. Software

Tabelle 11: Liste der verwendeten Programme mit Angaben zum Hersteller

Programm	Hersteller
CorelDRAW X7 Graphics Suite	Corel Corporation, Kanada
GraphPad Prism 7	GraphPad, San Diego, USA
LightCycler Software V.3.5	Roche, Deutschland
BD FACSDiva™ Software Version 8.0.1	BD Bioscience, USA
FlowJo® V10.2	LLC Media, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation der PBMCs

Zur Gewinnung der PBMCs wurde das abgenommene Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) -Blut 1:1 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gemischt und anschließend vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll geschichtet. Das Falcon wurde für 25 min (ohne Bremse) zentrifugiert. Ficoll, als hydrophiles Polymer aus Saccharose, ermöglicht eine Trennung der

Blutbestandteile anhand ihrer Dichte. Während sich das Blutplasma und die PBMCs oberhalb der Trennlösung anreichern, wandern die Erythrozyten und Granulozyten nach unten. Die hier relevanten PBMCs stellen sich als dünner Interphasering bzw. weißliche Phase dar. Sie wurden vorsichtig entnommen und für weitere 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 10 ml PBS resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Auch der neue Überstand wurde verworfen. Es folgte das erneute Resuspendieren in 10 ml PBS. Zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurde eine 1:10 Verdünnung mit Trypanblau (auch 1:10 verdünnt) hergestellt.

2.2.2. Durchflusszytometrie

2.2.2.1. Zell-Analyse

Die isolierten PBMCs wurden nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wiederholt für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und es folgte die Resuspendierung des Pellets in 1000 µl FACS-Puffer. Es wurden 3×10^6 Zellen entnommen und in FACS-Tubes überführt. Mittels 1000 µl / Tube Human IgG-blocking wurden die F_c-Rezeptoren der Antikörper (AK) blockiert (20 min, RT, im Dunkeln). Es wurden anschließend 1000 µl FACS-Puffer zum Abstoppen der Reaktion hinzugegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen. Dem Pellet wurde der Mastermix aus extrazellulären AK, Lebend-/Tod-Farbstoff Zombie-Aqua und FACS-Puffer zugegeben (siehe Tabelle 12). Die Antikörper CD3, CD19, CD20 und CD56 dienen hier der Färbung der B-, T- und der natürlichen Killerzellen. Diese werden nachfolgend als *lineage*⁺ bezeichnet und sind genauso wie die toten Zellen in den Dotplots C der Abbildungen 4 und 7 als Fraktion dargestellt, die den *lineage*⁻ und lebenden Zellen gegenübersteht.

Tabelle 12: Mastermix Antikörper-Schema für die Zell-Analyse

Antikörper	Verdünnung	Volumen in µl je 3×10^6 Zellen
CD14 FITC	pur	2,5
CD303 Per-CP-Cy5.5	pur	2,5

CD11c PE-Cy7	1:30	2,5
CD141 APC	1:27	2,5
HLA-DR BV650	1:4	2,5
CD3 BV510	1:5	2,5
CD19 BV510	1:5	2,5
CD20 BV510	1:5	2,5
CD56 BV510	1:4	2,5
CD1c PE-Dazzle	1:9	2,5
CD16 AF700	1:25	2,5
Zombie-Aqua	1:100 (PBS)	1

Die AK im Ansatz inkubierten für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch erneute Zugabe von 1000 µl FACS-Puffer abgestoppt und die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es blieben circa 50 µl im Tube zur Messung am Durchflusszytometer zurück.

Mittels Durchflusszytometrie werden Zellen nach Größe, Granularität und nach intrazellulärer bzw. extrazellulärer Expression unterschiedlicher Zellmarker aufgetrennt. Dies lässt Rückschlüsse auf die Eigenschaften dieser Zellen zu. Im Durchflusszytometer, hier der BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer, wird mittels einer Trägerflüssigkeit eine laminare Strömung erzeugt, die es ermöglicht, die Zellen der Probe einzeln an den Lasern vorbei zu leiten. Die Laser messen das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*), das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) und Fluoreszenzen sowie deren Intensität. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mit der Software FACSDiva™ Software Version 8.0.1. Die Gates wurden für alle Proben (n=11) gleichgesetzt (siehe Kapitel 3.1.). Die quantitative Bestimmung erfolgte anhand von ca. 3×10^6 Zellen.

2.2.2.2. Zell-Sortierung

Die Versuchsvorbereitungen für das Sortieren der PBMCs entsprachen denen für die Zell-Analyse, mit dem Unterschied, dass nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer rund $3,5 \times 10^7$ Zellen zur Färbung entnommen wurden. Das Volumen mit der entsprechenden Zellzahl wurde mit Sorting Buffer wieder auf 1000 μ l aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 10 μ l human IgG-Block (20 min, RT, im Dunkeln). Nach dem Waschen wurde der AK-Mastermix nach folgendem Schema hinzugegeben und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Tabelle 13: Mastermix Antikörper-Schema für die Zell-Sortierung

Antikörper	Verdünnung	Volumen in μ l je 3×10^6 Zellen
CD14 FITC	pur	2,5
CD16 APC anti-human	pur	2,5
CD3 BV510	pur	0,5
CD19 BV510	pur	0,5
CD20 BV510	pur	0,5
CD56 BV510	pur	0,625
Zombie-Aqua	1:100 (Sorting Buffer)	0,5

Der Zell-Sortierer, hier BD FACS Aria, nimmt die Proben in die Trägerflüssigkeit auf und produziert einen konstanten Strahl von Tropfen, welche die einzelnen Zellen enthalten. Wenn eine Zelle die gesuchten Eigenschaften enthält, wird der Tropfen elektrisch aufgeladen und über ein Spannungsfeld in die gewünschte Richtung abgelenkt und schließlich in ein Gefäß geleitet.

Das Gerät zur Zell-Sortierung arbeitet mit max. 1×10^7 Zellen/ml am effektivsten. Dafür wurde ein zweites Mal die Zellzahl bestimmt und nach Bedarf erfolgte eine Verdünnung mit dem Sorting Buffer. Jede einzelne Probe wurde direkt vor dem Sortieren gefiltert ($40 \mu\text{m}$), damit Zellklumpen verhindert werden konnten. Die sortierten Zellen wurden in mit 1 ml FCS ausgekleideten Gefäßen aufgenommen.

Die Begrenzung der Zellen auf eine Ausgangszahl von $3,5 \times 10^7$ Zellen bedingt sich aus der Messgeschwindigkeit des Zell-Sortierers und der Stabilität der AK-Färbung. Diese ist nur über etwa 4 Stunden im Messgerät stabil. Darüber hinaus lässt die Intensität des Signals nach und die Zellen werden ggf. falsch zugeordnet.

Die als klassische Monozyten isolierten Zellen wurden vor der Stimulation noch einmal im Zell-Sortierer gemessen, um die Reinheit der Probe zu überprüfen. Von allen Proben, bei denen nachfolgend die Genexpression gemessen wurden ($n=10$), lag die Reinheit durchschnittlich bei 98,93 %.

Die Daten wurden in der BD FACSDiva™ Software Version 8.0.1 aufgezeichnet. Die Gates wurden für alle gemessenen Proben ($n=16$) gleichgesetzt (siehe Kapitel 3.1.).

2.2.3. Stimulation der Monozyten

Die humanen klassischen Monozyten, welche mittels Zell-Sortierung gewonnen wurden (400.000 Zellen je FCS-Tube), wurden für 5 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in RPMI-full medium mit dem Zusatz PHA-L resuspendiert und die Zellen wurden in eine 24 Well-Platte ausgesät. Ein 24 Well enthielt je 200.000 Zellen, 500 μl RPMI-full und 1,25 μg PHA-L.

Die Stimulation im Brutschrank ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2) erfolgte für ca. 24 Stunden.

2.2.4. Nukleinsäuremethoden

2.2.4.1. RNA Isolation aus Monozyten

Nach ca. 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mit dem Medium aus der Platte genommen. Die adhärennten klassischen Monozyten wurden für 4 min mit Accutase inkubiert und anschließend mit dem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellen wurden dann bei 1500 x rpm für 5 min zentrifugiert, anschließend mit 200 µl PBS resuspendiert und in ein Eppi überführt. Es folgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 13.000 x rpm und das Resuspendieren in 200 µl PBS und 400 µl Lysis Buffer. Durch das anschließende Vortexen wurden die Zellwände zerstört und die RNA freigesetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Vorgabe des Herstellers und beinhaltete folgende wichtige Schritte:

Das Lysat wurde auf den HighPure Filter gegeben und zentrifugiert. Auf den Filter wurde DNase gegeben, welche die DNA zerstörte. Es folgten drei Waschschrirte, welche überschüssige Zellwandreste und Zellbestandteile entfernten. Zuletzt wurde der Filter (abweichend vom Hersteller) mit 30 µl RNase-freiem Wasser benetzt und zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gewünschte RNA.

Eine RNA-Quantitätsprüfung wurde mittels Nanodrop-Spectrophotometer durchgeführt.

2.2.4.2. cDNA Umschreibung

Das Umschreiben der sehr instabilen RNA in cDNA erfolgte mit dem iScript cDNA-Synthesis Kit von Bio-Rad. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) lässt sich so cDNA herstellen und vervielfältigen. Dadurch wird die qualitative Genexpressionsanalyse möglich und die cDNA ist zudem stabiler - gegenüber dem Abbau durch Enzyme - als die RNA.

2.2.4.3. Qualitative Real-Time PCR

Um zu ermitteln, wie hoch in den klassischen Monozyten die mRNA-Expression verschiedener Signalmoleküle ist, nutzten wir die quantitative RT-PCR-Analyse (qRT-PCR) mit dem LightCycler®480.

Für die quantitative Analyse ist es notwendig, Standardkurven als Berechnungsvorlage zu erstellen. Hierfür wurden aus 25 ng der jeweiligen Plasmide Verdünnungsreihen erstellt.

Die Real-Time PCR wurde mit den jeweiligen Primern durchgeführt, welche in Tabelle 7 einzusehen sind. Des Weiteren wurde das LightCycler®480 SYBR-Green I Master Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird bei jeder Amplifikation in die Doppelstrang-DNA eingebaut und emittiert Licht bestimmter Wellenlänge, dessen Intensität gemessen werden kann. Nach Abgleich mit der Standardkurve lässt sich schließlich die Konzentration der Probe bestimmen. Hierfür wird außerdem noch der Crossing Point ermittelt. Er beschreibt den Messpunkt, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant stärker ist als die Hintergrund-Fluoreszenz. Je mehr Ausgangstemplates in der Probe waren, desto weniger Amplifikationszyklen sind notwendig, um den Crossing Point zu erreichen. Anschließend wurde der Schmelzpunkt ermittelt. Durch einen kontinuierlichen Temperaturanstieg kommt es zum Zerfall der DNA in die Einzelstränge, was wiederum mit dem Verlust der Fluoreszenzstärke einhergeht. Dabei liegt der Schmelzpunkt für doppelsträngige DNA höher als für einzelsträngige DNA und unspezifische Produkte oder Primerdimere der PCR. So lässt sich die Spezifität des Probenlaufs ermitteln.

Die Temperatur und die Dauer der Denaturierung, der nachfolgenden 40 Amplifikationszyklen sowie der Schmelzkurve sind für jedes Gen spezifisch. In Tabelle 14 sind die verwendeten Primerprogramme mit den Temperaturen für die jeweiligen Gene aufgelistet.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Real-Time PCR Programme für die jeweiligen Gene

Gen	Cut (°C)	Denaturierung (°C)	Amplifikation (°C)	Schmelzkurve (°C)	Elongation (min)
HPRT1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-9B, DVL-2, DKK-3, LRP-6, HDAC3, HDAC9		96	96-62-72	95-60-95	
Fz-5		96	96-66-72	95-64-95	
Wnt-1, EVI/WLS, Axin-2, LEF-1, TCF-12,		96	96-62-72	95-58-95	
DKK-1	85	96	96-60-72	95-58-95	
APC		96	96-58-72	95-60-95	
DVL-3	88	96	96-62-72	95-60-95	
Wnt-3A	88	97	96-65-72	95-65-99	
β-Actin, TCF-3		95	95-60-72	95-65-95	10 min
TCF-1	83	96	96-60-72	95-58-95	

2.2.5. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 7.03.

Aufgrund der geringen n-Zahl, wurden keine statistischen Tests durchgeführt. Alle Daten sind dargestellt als Scatterplot mit Balken \pm SEM. Die Expressionswerte wurden auf das Housekeeping-Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) normalisiert.

3. Ergebnisse

3.1. Morbus Crohn-Patienten zeigen im Blut einen Anstieg an klassischen Monozyten jedoch eine Verringerung an Dendritischen Zellen

In unserer Gruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Monozyten eine Schlüsselrolle in der Induktion von α -Defensinen spielen. Courth *et al.* stimulierten MC-Darmbiopsien mit PBMCs von Kontrollprobanden und konnte damit die verringerte Expression von HD-5 und HD-6, die sich in Kultur mit PBMCs von MC-Patienten zeigten, wieder normalisieren. Weitere Versuche deuteten auf einen von Wnt-Liganden vermittelten Effekt hin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es insbesondere die Zellen der adhären Phase der PBMC-Kultur sind und nicht die Zellen im Überstand, welche die Unterschiede in der Wnt-Liganden-Expression aufweisen (Courth *et al.*, 2015).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse erfolgte zu allererst die Untersuchung der Verteilung der PBMC-Subpopulationen mit der Fragestellung, ob es einen quantitativen Unterschied zwischen den MC-Patienten und den Kontrollprobanden gibt. Da Courth *et al.* den Effekt für die adhären Phase der PBMCs nachgewiesen hat, wurden hier zu Beginn sowohl die Monozyten- als auch die DC-Subpopulation analysiert.

Abbildung 4 zeigt die Gating-Strategie der Zell-Analyse. In Dotplot A wurden die einzelnen Zellen von den Dubletten getrennt und anschließend die Leukozyten ausgewählt (Dotplot B). In Dotplot C wurden die lebenden von den toten und den *lineage*⁺ Zellen getrennt und in Dotplot D anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16 in die Monozyten-Subpopulation aufgeteilt. CD14⁺⁺/CD16⁻ sind die klassischen Monozyten, CD14⁺⁺/CD16⁺ die intermediären Monozyten, CD14⁺/CD16⁺⁺ die nicht-klassischen Monozyten und CD14⁻/CD16⁻ sind die doppelt negativen Zellen. Die zuletzt genannte Fraktion wurde noch weiter analysiert. Die HLA-DR⁺ Zellen (Dotplot E) wurden in drei Subpopulationen der DCs unterteilt. Diese sind anhand folgender Oberflächenmarker unterteilt:

myeloide CD141⁺ (high) DCs (Dotplot F), myeloide CD1c⁺ DCs (Dotplot G) und plasmacytoide CD303⁺ (CD1c⁻) DCs (Dotplot H).

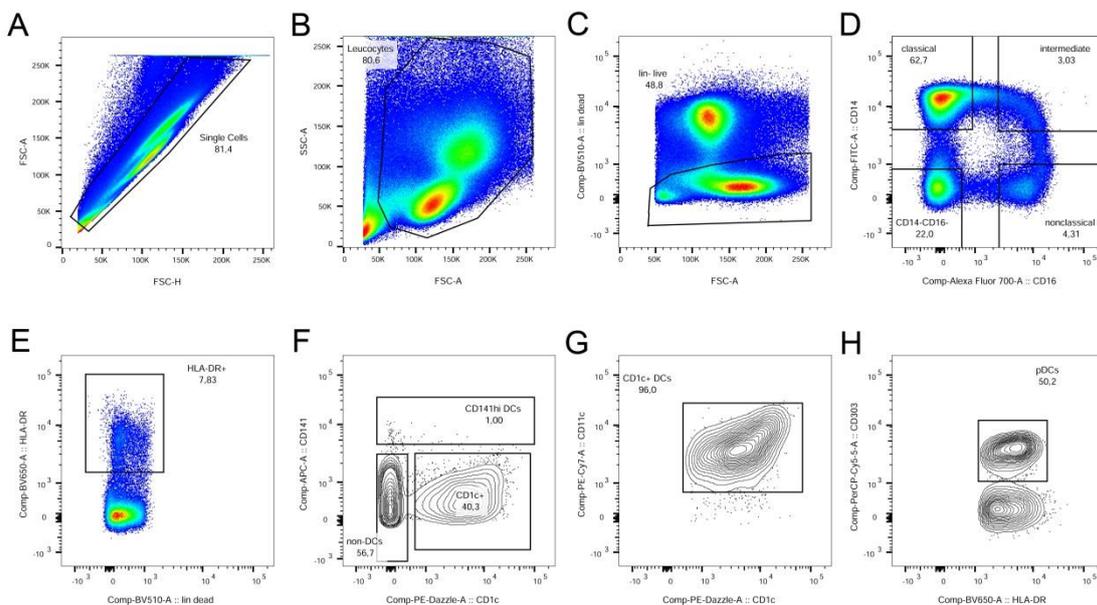


Abbildung 4: Gating-Strategie der Zell-Analysen

Die Dotplots A-H zeigen, wie die Subpopulationen der Monozyten und DCs definiert wurden. Die Zellpopulationen wurden wie folgt ausgewählt: einzelne Zellen/Leukozyten/lebende und *lineage* Zellen/ klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten sowie doppelt negative Zellen. Aus den doppelt negativen Zellen wurden die HLA-DR⁺ Zellen ausgewählt und weiter unterteilt in: CD141^{high} DCs, CD11c⁺CD1c⁺ DCs und CD303⁺DCs.

In der Zell-Analyse der Monozyten-Subpopulationen erwiesen sich die klassischen Monozyten bei beiden Gruppen als stärkste Fraktion, wie es bereits Wong *et al.* 2011 in einer umfassenden Studie beschrieben hat.

Die MC-Patienten hatten durchschnittlich 76,4 % und damit 11,6 % mehr klassische Monozyten als die Kontrollgruppe. Bei den nicht-klassischen Monozyten wies im Gegensatz dazu die Patientengruppe mit MC einen durchschnittlichen Anteil von 20,12 % auf und hatte damit um 12,7 % weniger klassische Monozyten als die Kontrollgruppe. Die intermediäre Subpopulation war durchgängig die niedrigste Fraktion und zeigte kaum Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und MC-Patienten (siehe Abbildung 5).

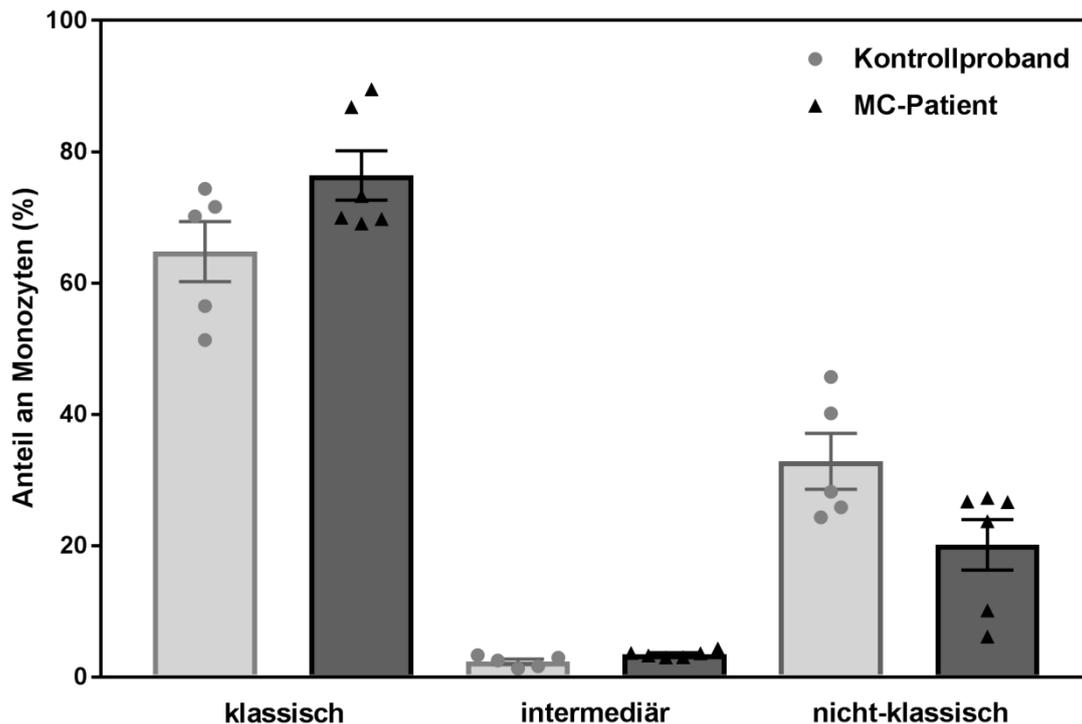


Abbildung 5: Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden in der Zell-Analyse

PBMCs wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden isoliert und extrazellulär mit lebend/tot, CD56 BV510, CD20 BV510, CD19 BV510, CD3 BV510, CD16 AF700 und CD14 FITC gefärbt.

Dargestellt sind die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM von n=5 Kontrollprobanden und n= 6 MC-Patienten.

Nicht nur die Subpopulationen der Monozyten, sondern auch die der DCs wurden analysiert und es konnten Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und MC-Patienten festgestellt werden. So war der Anteil der Subpopulationen gemessen an den lebenden und *lineage*⁻ Zellen bei den MC-Patienten in allen drei Subpopulationen geringer als bei den Kontrollprobanden. Beide Gruppen zeigen mit absteigender Anzahl CD1c⁺ > CD303⁺ > CD141⁺ dendritische Zellen, gemessen am Anteil der lebenden und *lineage*⁻ Zellen (siehe Abbildung 6).

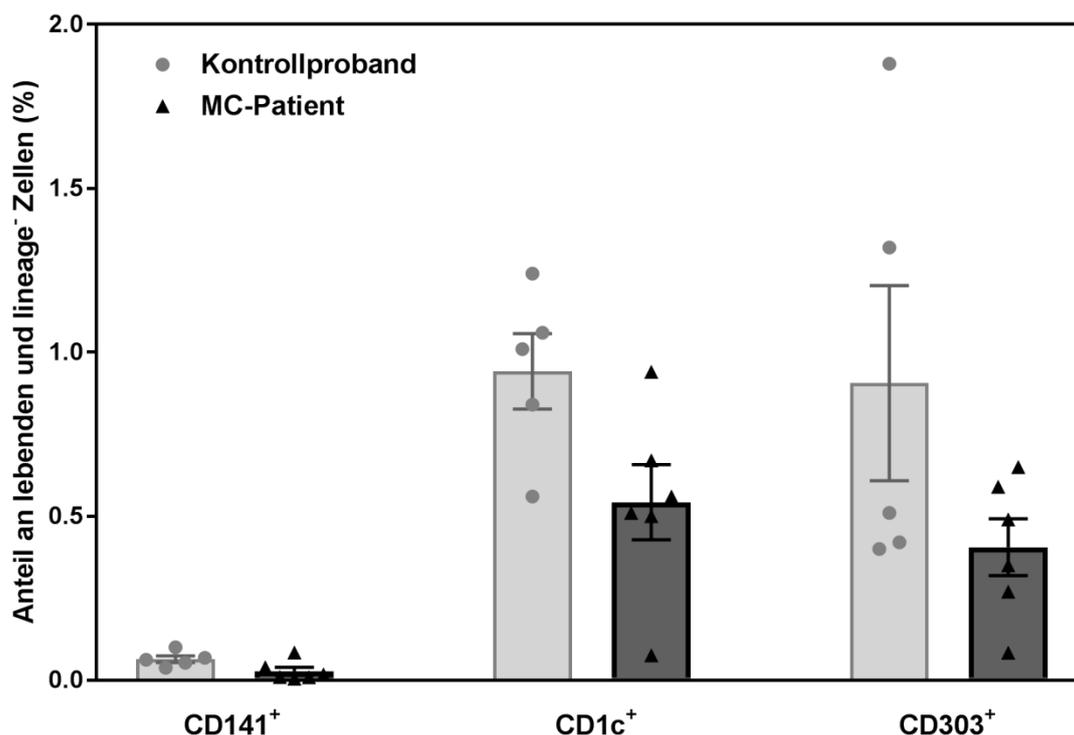


Abbildung 6: Verteilung der Subpopulationen Dendritischer Zellen im Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden in der Zell-Analyse

PBMCs wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden isoliert und anschließend extrazellulär mit lebend/tot, CD56 BV510, CD20 BV510, CD19 BV510, CD3 BV510, CD16 AF700, CD14 FITC, HLA-DR BV650, CD141 APC, CD1c PE-Dazzle, CD11c PE-Cy7 und CD303 PerCP/Cy5.5 markiert. Dargestellt sind die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM von n=5 Kontrollprobanden und n=6 MC-Patienten.

Im nächsten Schritt sollten die verschiedenen Monozyten-Subpopulationen sortiert und anschließend stimuliert werden, damit die Expression von Proteinen des Wnt-Signalwegs analysiert werden konnten. Basierend auf den Ergebnissen der Zell-Analyse zur Verteilung der Subpopulationen lag nachfolgend der Fokus auf den Subpopulationen der Monozyten. Der Anteil an DC-Subpopulationen im Blut war zu gering und es waren nicht ausreichend Zellen vorhanden, um RNA für weitere Analysen zu isolieren.

Ausgang für dieses Verfahren bildeten erneut die PBMCs aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden. Abbildung 7 zeigt die Gating-Strategie für die Sortierung der Monozyten-Subpopulationen. Ähnlich der Zell-Analyse wurden hier die einzelnen Zellen von den Dubletten getrennt (Dotplot A) und die Leukozyten isoliert (Dotplot B). In Dotplot C wurden die lebenden von den toten

und *lineage*⁺ Zellen getrennt. Die Aufteilung in die Monozyten-Subpopulationen erfolgte in Dotplot D erneut anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16. Nach Abschluss des Sortiervorgangs jedoch vor der Stimulation der Monozyten wurde die Reinheit der Subpopulationen durch eine Re-Analyse überprüft. Diese lag im Schnitt bei 98,93 %.

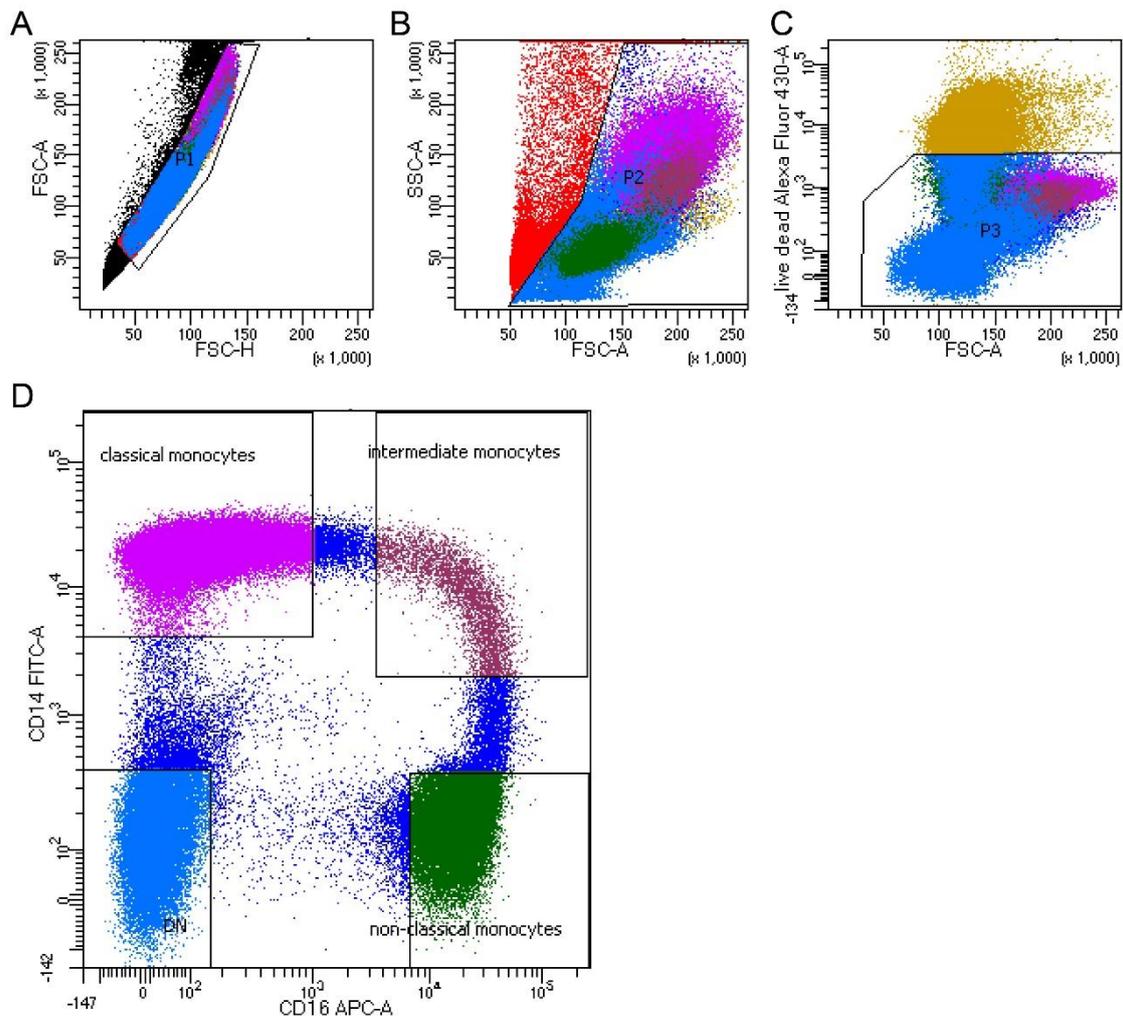


Abbildung 7: Gating-Strategie der Zell-Sortierung

Die Dotplots A-D zeigen, wie die Subpopulationen der Monozyten definiert wurden. Die Zellpopulationen wurden wie folgt ausgewählt: einzelne Zellen/Leukozyten/lebende und *lineage*⁻ Zellen/ klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten sowie doppelt negative Zellen.

Für die Aufteilung der Monozyten-Subpopulationen in der Sortierung wurde ebenfalls eine Populationsanalyse durchgeführt. Es bestätigten sich hier die Ergebnisse der Zell-Analyse (siehe Abbildung 8, Vergleich zu Abbildung 5). Im Durchschnitt hatten die MC-Patienten 83,7 % klassische Monozyten und damit

15,56 % mehr als die Kontrollprobanden. Bei den nicht-klassischen Monozyten lag der Wert der MC-Patienten um 14,67 % unter dem der Kontrollen. Wie auch in der Zell-Analyse stellten die intermediären Monozyten die kleinste Fraktion dar. Hier war kein Unterschied zwischen MC-Patienten und Kontrollprobanden zu sehen.

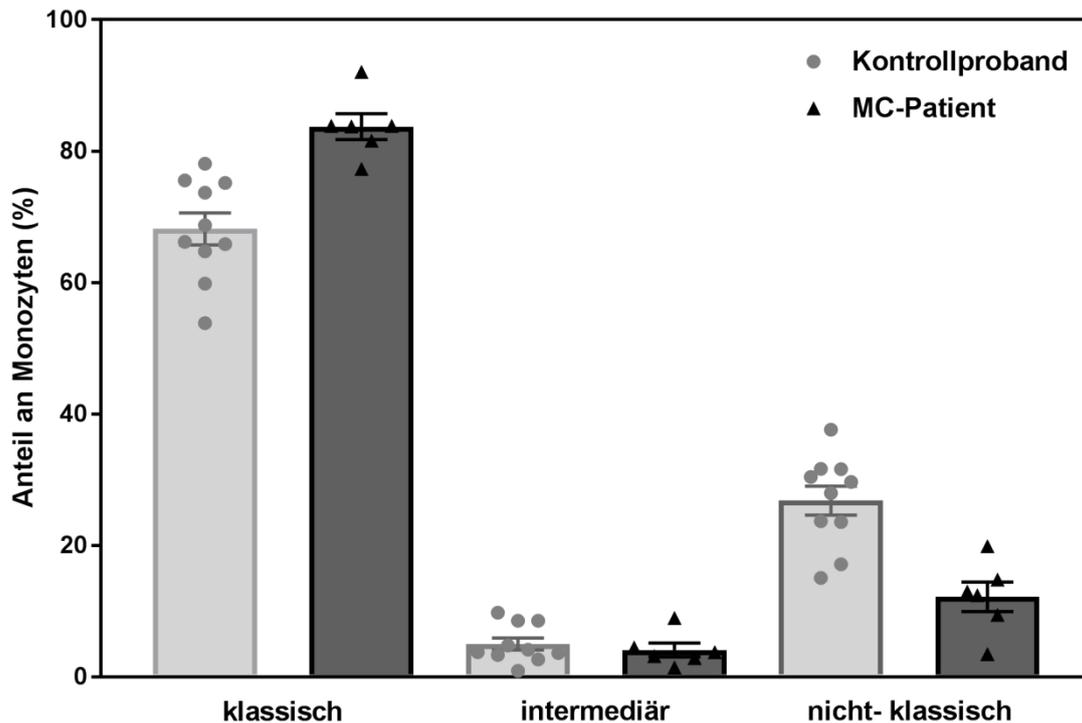


Abbildung 8: Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden in der Zell-Sortierung

PBMCs wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden isoliert und extrazellulär mit lebend/tot, CD56 BV510, CD20 BV510, CD19 BV510, CD3 BV510, CD16 APC und CD14 FITC gefärbt. Dargestellt sind die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM von n=10 Kontrollprobanden und n= 6 MC-Patienten.

3.2. Klassische Monozyten von Morbus Crohn-Patienten exprimieren weniger Wnt-Liganden als Kontrollprobanden

Die Expressionsanalysen, die bisher in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, beschränkten sich auf einige Wnt-Liganden (Courth et al., 2015). Nachfolgend wurden diese und weitere Komponenten der Wnt-Signalkaskade speziell für die klassischen Monozyten untersucht. Denn nur bei dieser Population war die Zellzahl ausreichend hoch, sodass die notwendige RNA-Konzentration zum

Umschreiben in cDNA erreicht werden konnte. Die gemessenen Transkripte wurden auf das House-keeping-Gen HPRT normiert.

Die Wnt-Liganden sind notwendig, um an die Rezeptoren der PZ zu binden und dort die Expression von HD-5 und HD-6 zu induzieren. Diese AMPs sind wiederum wichtig, für die Aufrechterhaltung der Schutzbarriere des Dünndarms.

Es zeigte sich, dass die klassischen Monozyten von Patienten mit MC deutlich weniger der Wnt-Liganden exprimierten als die Kontrollprobanden.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, exprimierten die MC-Patienten nur einen Bruchteil dessen, was die Kontrollprobanden an Transkripten erreichten. Der größte Unterschied zwischen MC Patient und Kontrollproband ist für den Wnt-Liganden 3A zu sehen. Dieser erreicht nur 2,35 % des Wertes für die Kontrollprobanden. Selbst der geringste Unterschied zwischen MC-Patienten und Kontrollprobanden erreicht nur einen Anteil von 11,02 % und wurde für den Wnt-Liganden 2 ermittelt. Die Expressionsergebnisse der Wnt-Liganden 1, 3, und 9B liegen zwischen diesen beiden Extrembeispielen. Mehrmals war, trotz wiederholter Untersuchungen, bei der Wnt-Liganden-Expressionsmessung der klassischen Monozyten von MC-Patienten überhaupt keine Expression mehr detektierbar.

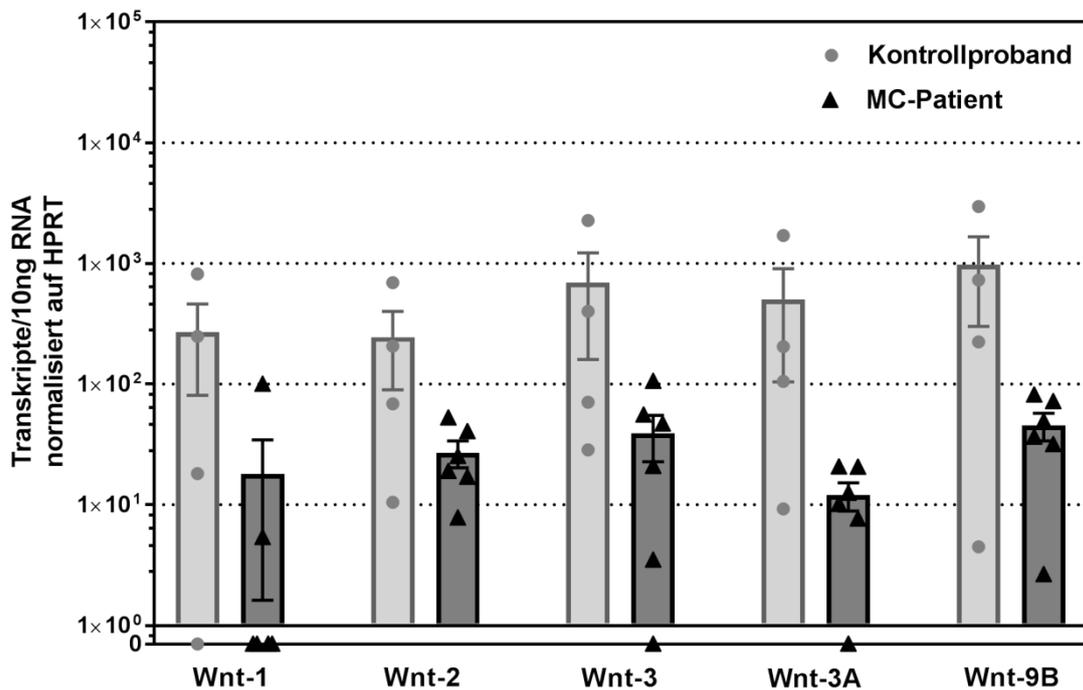


Abbildung 9: Wnt-Liganden-Expression in den klassischen Monozyten

Klassische Monozyten wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden mittels Sortierung isoliert und für ca. 24 Stunden mit PHA-L stimuliert. Dargestellt sind die Transkripte von verschiedenen Wnt-Liganden pro 10 ng RNA normalisiert auf HPRT. Die Balkendiagramme zeigen die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM für n=4 Kontrollprobanden und n=6 für die MC-Patienten.

3.3. Klassische Monozyten von Morbus Crohn-Patienten weisen Unterschiede in der Expression von diversen Komponenten der kanonischen Wnt-Signalkaskade auf

Nachfolgend wurden weitere Komponenten der Wnt-Signalkaskade analysiert, um die klassischen Monozyten von MC-Patienten auf grundlegende Defekte bzw. auf die Auswirkung der Selbstregulation hin zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Expression der wichtigen Rezeptoren und Co-Rezeptoren LRP-6 und Fz-5 ebenfalls vermindert ist. Die MC-Patienten erreichten hier nur 23,07 und 24,81 % der Kontrollwerte für LRP-6 bzw. Fz-5 (siehe Abbildung 10). Diese sind relevant, damit das Wnt-Signal von extern an das Zellinnere vermittelt werden kann (Henderson and Fagotto, 2002; Städeli et al., 2006).

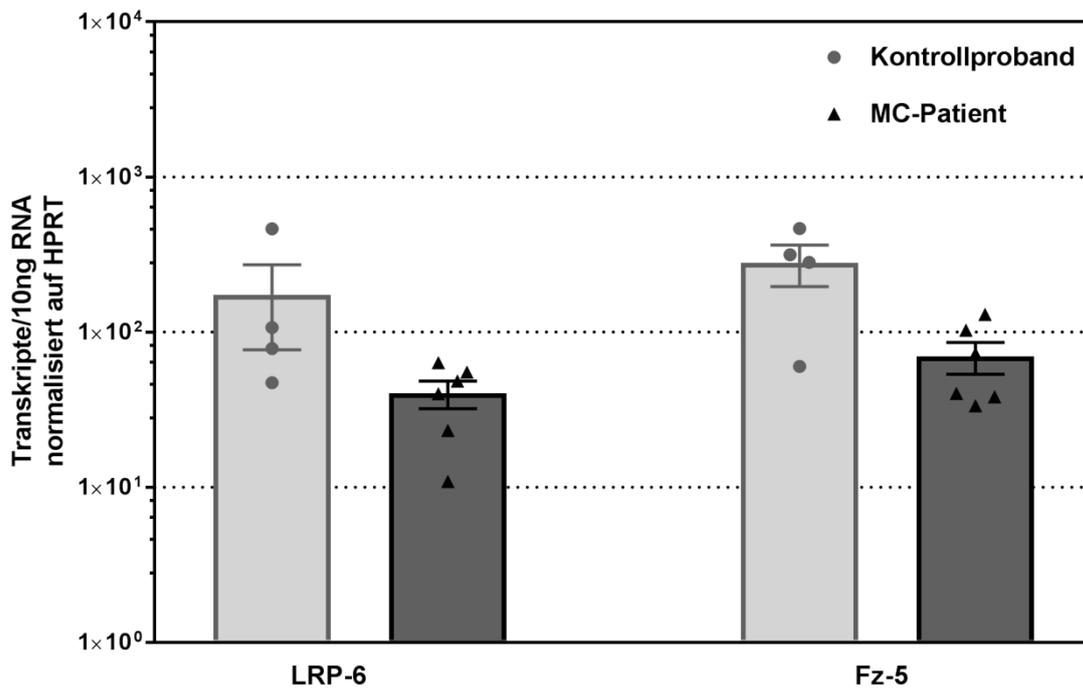


Abbildung 10: Rezeptor und Co-Rezeptor-Expression in den klassischen Monozyten

Klassische Monozyten wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden mittels Sortierung isoliert und für ca. 24 Stunden mit PHA-L stimuliert. Dargestellt sind die Transkripte von LRP-6 und Fz-5 pro 10 ng RNA normalisiert auf HPRT. Die Balkendiagramme zeigen die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM für n=4 Kontrollprobanden und n=6 für die MC-Patienten.

Der Wnt-Signalkaskade folgend wurden als Bestandteile des *DesCom* APC und Axin-2 untersucht. Eine starke Verminderung des Expressionslevels konnte nur für Axin-2 ermittelt werden. Hier exprimierten die MC-Patienten nur 10,41 % des Kontrollwertes. APC war hingegen leicht erhöht (siehe Abbildung 11). An dieses Protein bindet LRP, wenn es das Wnt-Signal in das Innere der Zelle weiterleitet (Mao et al., 2001).

EVI, auch bekannt als WLS, wies in dieser Untersuchung - entgegen der Ergebnisse von Lioba Courth - keinen Unterschied zwischen MC-Patienten und Kontrollprobanden auf. Dieses Protein ist dafür zuständig, die Wnt-Liganden, die am Golgi-Apparat gebildet werden, an die Zelloberfläche zu transportieren und dort die Exozytose zu unterstützen (Herr and Basler, 2012). Es scheint, dass die Expression dieses Proteins in den klassischen Monozyten der MC-Patienten nicht verändert ist (siehe Abbildung 11).

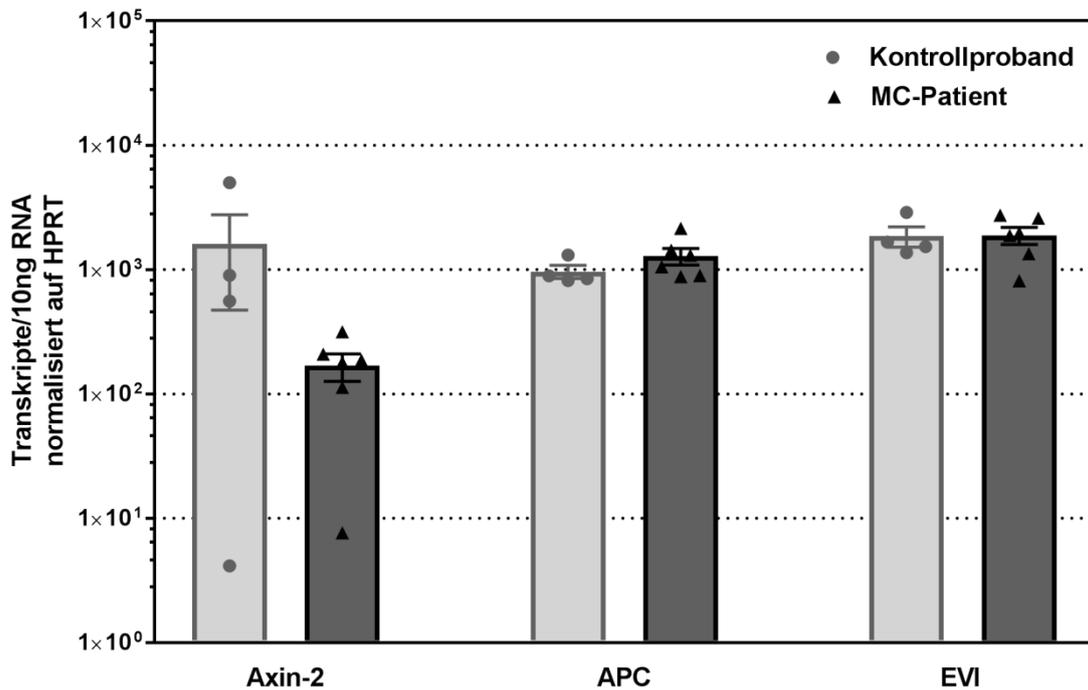


Abbildung 11: Expression intrazellulärer Komponenten des Wnt-Signalweges in den klassischen Monozyten
 Klassische Monozyten wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden mittels Sortierung isoliert und für ca. 24 Stunden mit PHA-L stimuliert. Dargestellt sind die Transkripte von Axin-2, APC und EVI pro 10 ng RNA normalisiert auf HPRT. Die Balkendiagramme zeigen die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM für n=4 Kontrollprobanden und n=6 für die MC-Patienten.

Wenn β -Catenin sich im Zellkern anreichert, beeinflusst es dort durch Interaktion mit TCF/LEF die Genexpression (Arce et al., 2006; MacDonald et al., 2009). Die MC-Patienten wiesen unter den hier getesteten Transkriptionsfaktoren für LEF-1 eine stark verminderte Expression auf. Die klassischen Monozyten der MC-Patienten exprimierten lediglich 6,81 % des Kontrollwertes für LEF-1. Bei den Transkriptionsfaktoren TCF-1 und TCF-12 wurden nur geringfügige Unterschiede gemessen (siehe Abbildung 12).

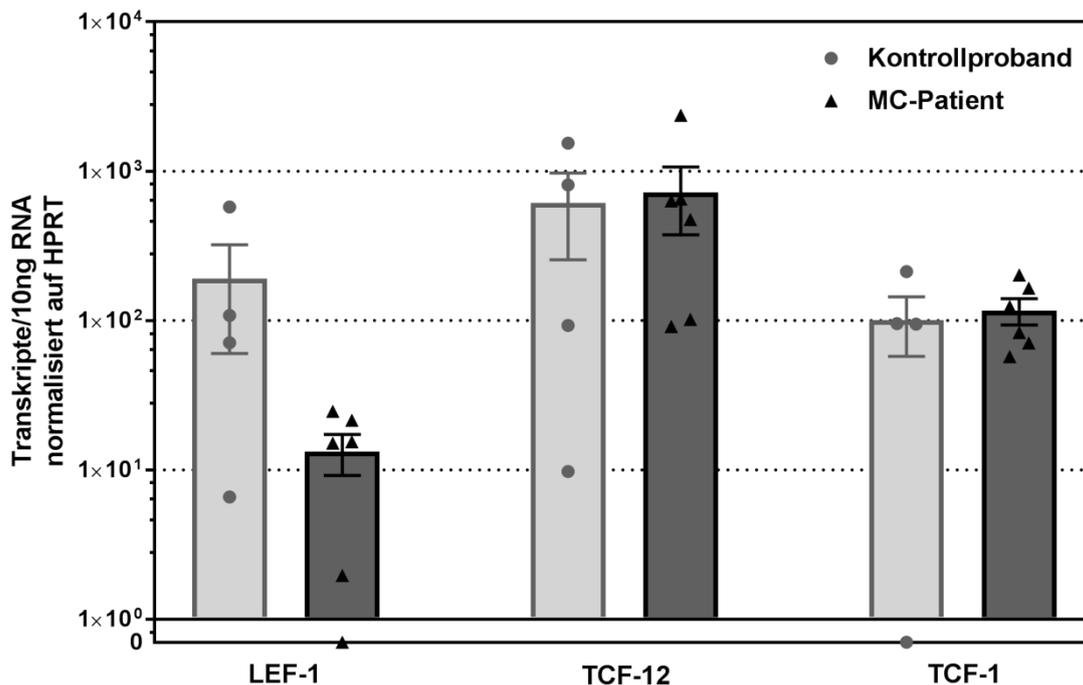


Abbildung 12: Expression von Transkriptionsfaktoren in den klassischen Monozyten

Klassische Monozyten wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden mittels Sortierung isoliert und für ca. 24 Stunden mit PHA-L stimuliert. Dargestellt sind die Transkripte von LEF-1, TCF-12 und TCF-1 pro 10 ng RNA normalisiert auf HPRT. Die Balkendiagramme zeigen die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM für n=4 Kontrollprobanden und n=6 für die MC-Patienten.

3.4. Klassische Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn weisen gegenüber Kontrollprobanden nur geringe Unterschiede in der Expression von HDACs auf

Ferner wurde bereits beschrieben, dass der Wnt-Signalweg über HDACs epigenetisch reguliert werden kann (H. Wang et al., 2016). Daher wurde in dieser Arbeit auch die Expression verschiedener HDACs in klassischen Monozyten untersucht.

Allgemein dienen HDACs der Herunterregulierung von Transkription, indem sie durch Deacetylierung die Chromatinstruktur verändern (Seto and Yoshida, 2014). Die HDACs 1, 3 und 8 entsprechen der Klasse 1 der Familie der klassischen HDACs. Als Vertreter der Klasse 2a wurde HDAC9 getestet. Bei allen hier untersuchten Vertretern exprimierten die klassischen Monozyten der

MC-Patienten mehr HDACs als die Kontrollprobanden. Maximal wurde für HDAC9 das 1,7fache vom Kontrollwert exprimiert (siehe Abbildung 13).

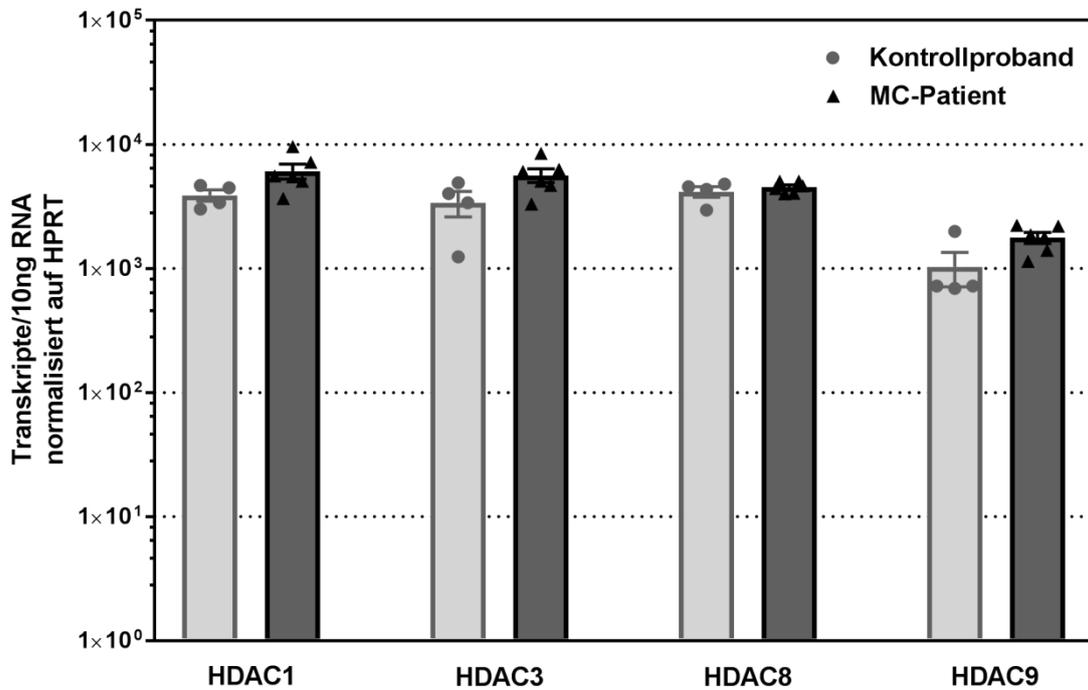


Abbildung 13: Expression von HDACs in den klassischen Monozyten

Klassische Monozyten wurden aus dem Blut von MC-Patienten und Kontrollprobanden mittels Sortierung isoliert und für ca. 24 Stunden mit PHA-L stimuliert. Dargestellt sind die Transkripte von HDAC1, HDAC3, HDAC8 und HDAC9 pro 10 ng RNA normalisiert auf HPRT. Die Balkendiagramme zeigen die Einzel- und Mittelwerte \pm SEM für n=4 Kontrollprobanden und n=6 für die MC-Patienten.

4. Diskussion

4.1. Die Schlüsselrolle der Monozyten bei Morbus Crohn

Betrachtet man die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im Blut, so decken sich die Ergebnisse aus unserer Studie mit dem was der allgemeine Wissensstand vorgibt. Dies bedeutet, dass der Anteil an klassischen Monozyten im Blut am größten ist, gefolgt von den nicht-klassischen Monozyten und zuletzt den intermediären Monozyten (Wong et al., 2011). Abweichungen in den prozentualen Angaben im Vergleich zu unseren Daten ergeben sich durch die Methodik der Zell-Analyse, also der jeweiligen Gating-Strategie bedingt durch die Färbung und damit der Zuschreibung zu einer Fraktion.

Die Daten aus der Zell-Analyse und der Sortierung weisen Unterschiede in der Verteilung der Monozyten-Subpopulationen von MC-Patienten zu Kontrollprobanden auf. Das Blut der MC-Patienten enthielt mehr klassische Monozyten als die Kontrollen. Die Werte liegen zwischen 11,6 % mehr bei der Zellanalyse und 15,56 % mehr bei der Sortierung. Dieser Anstieg ging vor allem zu Lasten der Fraktion der nicht-klassischen Monozyten. Die Population der intermediären Monozyten war bei allen Analysen durchgängig der kleinste Anteil und wies geringfügige Unterschiede auf.

Koch *et al.* stellten in Bezug auf die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen eine Erhöhung der CD16⁺ Monozyten (also intermediäre und nicht-klassische Monozyten zusammen) im aktiven MC, aber nicht in der Remission fest. Diese Erhöhung korrelierte bei ihnen jedoch nicht mit der Stärke der Erkrankung (Koch et al., 2010). Thiesen *et al.* konnten die Beobachtung über den Anstieg der CD16⁺ Monozyten bestätigen und beschrieben eine anteilige Verringerung der klassischen Monozyten (Thiesen et al., 2014). In unserer Studie können wir mit der bisherigen Fallzahl noch keine Aussage über die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen während eines aktiven MC-Schubes und der Remission treffen. Auch Analysen zur Verteilung der Monozyten-Subpopulationen in den unterschiedlichen Ausprägungen der Erkrankung sind sinnvoll.

Vermutlich spielt bei der Verteilung der Monozyten auch die Medikation, die die Patienten bekommen eine nicht unwesentliche Rolle. So gibt es Ergebnisse, die eine Verringerung der Gesamtanzahl der klassischen und intermediären Monozyten im Blut in zeitlichem Zusammenhang zur Applikation von Infliximab beschreiben (Slevin et al., 2016). Eine andere frühere Studie widerspricht dieser Beobachtung und belegt eine Zunahme der intermediären Fraktion um rund 6 % nach dreimaliger Applikation von Infliximab (Nazareth et al., 2014). Slevin *et al.* stellten unabhängig von der Infliximab-Therapie bei den MC-Patienten einen höheren Anteil der intermediären Fraktion im Vergleich zu Kontrollprobanden fest. Somit sollte ebenfalls der Einfluss der Medikation auf die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen weiter untersucht werden.

Auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen hat man sich bereits mit der Verteilung der Monozyten-Subpopulationen beschäftigt. Zumeist wird die Fraktion der CD16⁺ Monozyten mit entzündlichen Prozessen in Verbindung gebracht. So wurde ein Anstieg dieser Subpopulationen bei Übergewicht, rheumatoider Arthritis, Artherosklerosis und Sepsis festgestellt. Bei letzterer Erkrankung nahm der Anteil der CD16⁺ Zellen bis zu 50 % an der Gesamtheit der Monozyten zu. Häufig kam es infolge des Anstiegs der proinflammatorischen Monozyten zu einem kompensatorischen Abfall der klassischen Monozyten (Fingerle et al., 1993; Horelt et al., 2002; Kawanaka et al., 2002; Kim et al., 2017; Poitou et al., 2011; Rogacev et al., 2010; Rossol et al., 2012).

Mit unserer Arbeit haben wir einen ersten wichtigen Schritt in Richtung Monozyten-Subpopulationsanalyse gemacht. Die hier benannten Studien sind derzeit, bedingt durch die Methodik, jedoch schwer miteinander zu vergleichen. Auf Grundlage der neuen und alten Erkenntnisse, wäre eine großangelegte Studie zur Analyse der Monozyten-Subpopulationen mit ausreichend hohen Fallzahlen und einer einheitlich konsequenten, nachvollziehbaren Gating-Strategie wünschenswert und notwendig, um eine zuverlässige Aussage der aufgezeigten Aspekte treffen zu können. Darin sollte auch die, auch von uns

angewendete aktuelle Differenzierung der CD16⁺ Fraktion, in intermediäre und nicht-klassische Monozyten, durchgehend Anwendung finden, da sich diese in ihrer Morphologie und Funktion unterscheiden. Neben der Medikation und der Aktivität der Erkrankung müssen auch die verschiedenen Lokalisationen des MC (L1 bis L4+) betrachtet werden.

Darüberhinausgehend scheint es vielversprechend, diese Untersuchung auf weitere chronisch entzündliche Erkrankungen auszuweiten. Insbesondere sollte die Verteilung der Subpopulationen für CU-Patienten analysiert werden, da es dazu bisher keinerlei Daten gibt.

4.2. Der Einfluss von Morbus Crohn auf die Subpopulationen Dendritischer Zellen

In dieser Arbeit zeigten die PBMCs der MC-Patienten in allen drei DC-Subpopulationen einen deutlichen prozentualen Abfall im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Baumgart *et al.* bereits veröffentlichten Daten. In der Studie mit 49 MC-Patienten konnte ein verringerter Anteil an DCs bei MC in Remission gegenüber Kontrollprobanden nachgewiesen werden. Dieser Effekt war noch ausgeprägter, bei aktiver Erkrankung (Baumgart *et al.*, 2005).

Nicht nur im humanen System, sondern auch in Mausexperimenten wurde untersucht, wie die Abnahme der DCs infolge eines bakteriellen Stimulus zustande kommt. Dabei zeigte sich, dass es während einer systemischen Infektion mit gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien zu einer Reduktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen der DCs kommt, welche mit einer Zunahme von monozytären Vorläuferzellen im Knochenmark wie auch der Milz einhergeht (Pasquevich *et al.*, 2015). Eine Übertragung dieses Versuches auf die humane Situation der PBMCs von MC-Patienten könnte allerdings schlecht praktikabel sein.

Weitere Untersuchungen könnten jedoch überprüfen, ob die Verringerung der DCs im Blut durch eine vermehrte Migration der DCs in das Darmgewebe, im Sinne eines erhöhten Bedarfs, bedingt ist. Hinweise dazu liefert Bernardo *et al.* Er berichtet in seiner aktuellen Arbeit von einer erhöhten Anzahl von DCs im

intestinalen Gewebe bei CED-Patienten. Des Weiteren beschreibt er eine gesteigerte Migration von im Blut zirkulierenden DCs in bevorzugt entzündetes Darmgewebe (Bernardo et al., 2018).

4.3. Morbus Crohn-Patienten zeigen vielfältige und komplexe Defekte in der Wnt-Signalkaskade

Daten aus der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass PBMC-Überstände in Dünndarm-Biopsien aus MC-Patienten die α -Defensine HD-5 und HD-6 unterschiedlich stark induzieren können. Weitere Analysen zeigten, dass diese Induktion über den Wnt-Signalweg beeinflusst wird. Zusätzlich wurde die Expression von Wnt-Liganden zwischen Lymphozyten und Monozyten verglichen. Ein signifikanter Unterschied wurde nur innerhalb der Monozyten festgestellt. Die bisherige Studie umfasste die Wnt-Liganden Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-3A und den intrazellulären Wnt-Liganden-Transporter EVI/WLS (Courth et al., 2015).

In dieser Arbeit konnten wir den Effekt von Courth *et al.* für die Subpopulation der klassischen Monozyten bestätigen. Die Wnt-Liganden Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-3A und Wnt-9B zeigten eine deutliche Reduzierung in den klassischen Monozyten von MC-Patienten.

Bringt man diese Beobachtung zusammen mit dem Wissen, dass der Anteil an klassischen Monozyten im Blut die stärkste Fraktion darstellt, so liegt es nahe die Darmbiopsie-Versuche von Courth *et al.* spezifisch mit sortierten klassischen Monozyten zu wiederholen und zu reproduzieren. Zumal der Anteil an klassischen Monozyten im Blut von MC-Patienten in unserer Studie prozentual erhöht war.

In weiteren Analysen der Wnt-Signalkaskade haben wir bei den MC-Patienten eine Reduktion der Transkripte der Rezeptoren Fz-5 und LRP-6 festgestellt. Diese Co-/Rezeptoren sind dafür verantwortlich, dass externe Wnt-Signale in die Zelle geleitet werden. Eine Variante im LRP-6-Gen zeigte bereits bei Koslowski *et al.* nachweislich eine verminderte Expression von HD-5 in PZ (Koslowski et al., 2012).

Die Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Aktivierung von DVL, welches den *DesCom* inhibiert. Dieser setzt sich unter anderem aus APC und Axin zusammen und in aktivierter Form baut er intrazellulärer angereichertes β -Catenin ab (Henderson and Fagotto, 2002; Städeli et al., 2006). Unsere Analyse zeigt eine deutliche Verminderung der Expression für Axin-2. Dieses Protein ist auch bekannt als *conductin* oder *axil*. Axin-2 wird induziert durch einen aktiven Wnt-Signalweg und agiert als negative Feedback-Schleife (Jho et al., 2002; Lustig et al., 2002; Yan et al., 2001).

APC reguliert auf mehreren Wegen den Gehalt von β -Catenin im Zellplasma und -kern (Raji et al., 2018). Darüber hinaus finden sich bei malignen Erkrankungen, wie dem Kolorektalem Karzinom, häufig Mutationen im APC-Gen. Bekannt ist zudem, dass MC-Patienten ein leicht erhöhtes Risiko haben im Laufe ihres Lebens an einem Kolorektalen Karzinom zu erkranken. Studien haben jedoch gezeigt, dass bei den CED-Patienten vergleichsweise seltener Mutationen im APC-Gen vorlagen als in der Gruppe der sporadischen Kolorektalen Karzinome (Hirsch et al., 2018; Robles et al., 2016). Hinsichtlich der Expression von APC in den klassischen Monozyten konnten wir keinen Unterschied, zwischen unseren MC-Patienten und den Kontrollprobanden feststellen.

Sofern β -Catenin in den Zellkern gelangt und sich dort anreichert, bildet es einen Komplex mit TCF/LEF. Gemeinsam können sie TLE1 verdrängen und Einfluss auf die Transkription nehmen (Brantjes et al., 2002; Daniels and Weis, 2005).

Ist die Funktion von TCF-1 und TCF-4 gestört, so kann es zu einer reduzierten Bildung von α -Defensinen kommen (Beisner et al., 2014; Wehkamp et al., 2005). In unserem Experiment konnten keine Unterschiede in der Expression von TCF-1 (auch bekannt als TCF-7) und TCF-12, in den klassischen Monozyten im Blut von MC-Patienten festgestellt werden. LEF-1, auch bekannt als TCF-10, ist hingegen von den MC-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden stark verringert exprimiert worden.

Da es neuerdings Hinweise darauf gibt, dass die HDACs mit Teilen der Wnt-Signalkaskade interagieren, haben wir auch diese erfasst (H. Wang et al., 2016). Unsere Ergebnisse zeigen bisher nur eine kleine Erhöhung in der Expression von HDAC1, 3, 8 und 9 in der Patientengruppe gegenüber den Kontrollprobanden.

Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass die Veränderungen in der Expression nicht nur die Wnt-Liganden betreffen, sondern wesentlich komplexer sind.

Es gilt zu prüfen, ob noch weitere Anteile der Signalkaskade verringert oder erhöht exprimiert werden. Besonderes Augenmerk sollte hier auf das Protein PORCN gelegt werden. Es gehört zur Familie der membrangebundenen O-Acyltransferasen und befindet sich in der Membran des ER (Hofmann, 2000; Nile and Hannoush, 2016). PORCN ist für die meisten Wnt-Liganden notwendig, um von EVI erkannt und schließlich extrazellulär sekretiert zu werden (Herr and Basler, 2012). So untersuchte man Zellen, in denen die Bildung von PORCN blockiert wurde. Sie bildeten zwar Wnt-3A, waren aber nicht in der Lage dieses zu sekretieren. Es kam zur Akkumulation im ER (Proffitt and Virshup, 2012). Saha et al. zeigte, dass Mäuse, deren *porcn*-Gen abgeschaltet wurde, wesentlich sensibler auf Ganzkörperbestrahlung reagierten. Mit Makrophagen-konditioniertem Medium von Wildtyp-Mäusen war es möglich, die Mäuse zu retten bzw. heilte ihr Darmepithel wieder aus. Mit dem Makrophagen-konditionierten Medium aus dem Knochenmark, dessen *porcn*-Gen abgeschaltet ist, war dies nicht möglich (Saha et al., 2016). Dies macht deutlich, wie wichtig die von den Makrophagen gebildeten Wnt-Liganden für das Heilungs- und Regenerationspotenzial des Darms sind und dass ihre Sekretion von PORCN abhängig ist.

Eine große Genexpressionsanalyse der klassischen Monozyten und gegebenenfalls anderer Subpopulationen der PBMCs, könnte Hinweise auf die ursächlichen molekularen Mechanismen der Defekte geben.

5. Zusammenfassung

Der menschliche Darm ist permanent von Bakterien besiedelt. Um sich vor ihnen zu schützen, weist der Darm eine physikalische und immunologische Barriere auf. Diese intestinale Barriere ist es, die bei Morbus Crohn geschwächt ist und Defekte aufweist. Infolge dessen können Bakterien ungehindert in die Darmschichten eindringen und chronische Entzündungen auslösen, die bisher vor allem mit Immunsuppressiva behandelt wurden. Eine entscheidende Komponente dieser Barriere sind die antimikrobiellen Peptide, wie z.B. die α -Defensine 5 und 6, welche ausschließlich von Paneth-Zellen im Dünndarm produziert werden. Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass diese antimikrobiellen Peptide bei Morbus Crohn vermindert exprimiert werden. Zuletzt konnte dies mit dem Sekretom von peripheren Blutzellen (PBMCs) in Verbindung gebracht werden. Bei weiteren Analysen fiel auf, dass die adhärenzte Phase der PBMCs von Patienten mit Morbus Crohn weniger Wnt-Liganden exprimieren als die Kontrollprobanden. Im Dickdarm spielt das antimikrobielle Peptid humanes β -Defensin2 eine wichtige Rolle. Von diesem ist bereits bekannt, dass es epigenetisch über Histon-Deacetylasen (HDACs) reguliert wird. Außerdem steht auch der Wnt-Signalweg selbst unter dem Einfluss von HDACs.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Monozyten aus PBMCs isoliert und mittels Durchflusszytometrie die Verteilung der Subpopulationen von Monozyten sowie Dendritischen Zellen (DCs) analysiert. Es zeigte sich, dass bei Patienten durchgängig alle drei Subpopulationen von DCs verringert waren und unter den Monozyten der Anteil an klassischen deutlich zu Lasten der nicht-klassischen Monozyten erhöht war. Die durch Zellsortierung gewonnenen klassischen Monozyten wurden mit PHA-L stimuliert, um eine Entzündungssituation zu simulieren. Anschließend wurde mit der RNA eine qualitative Real-Time PCR durchgeführt. Es zeigte sich bei der Expressionsanalyse der klassischen Monozyten, dass alle gemessenen Wnt-Liganden (Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-3A und Wnt-9B) massiv reduziert waren. Darüber hinaus wurde hier eine Reduktion der Rezeptoren und Co-Rezeptoren LRP-6 und Fz-5 festgestellt, die dafür verantwortlich sind, Wnt-Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten.

Folgend im Signalweg, wurde eine verringerte Expression von Axin2 festgestellt. Dieses ist Teil des *destrucion complex*, welcher in aktiver Form β -Catenin im Zellplasma abbaut. Für das Protein EVI, welches nötig ist, um Wnt-Liganden nach extrazellulär zu schleusen, konnte keine Verringerung bestätigt werden. Unter den Transkriptionsfaktoren zeigte LEF1 eine stark verminderte Expression. Für die HDACs konnten bisher nur kleine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen belegt werden.

Mit dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass bei Patienten mit Morbus Crohn sowohl Unterschiede in der Quantität als auch Qualität der Monozyten vorliegen, die in einer verminderten Induzierbarkeit der PZ in Entzündungssituationen resultieren. Dadurch fehlt ein zusätzlicher Schutz in der intestinalen Barriere und die Gefahr der bakteriellen Infektion ist erhöht. Mit dem hier entwickelten Verfahren ist es möglich weitere Analysen durchzuführen, damit eine Unterscheidung nach Lokalisation der Erkrankung, Aktivitätsstatus sowie Medikation erfolgen kann. Darüber hinaus sind Defekte im Wnt-Signalweg und unterschiedliche Verteilungen der Monozyten bereits für weitere chronische Entzündungen, aber auch für maligne Krebsformen bekannt. Weitere Analysen der Verteilung der Monozyten und der Ursachen für die funktionellen Defekte im Wnt-Signalweg sollten in den Fokus der Forschung treten, um neue Therapien zur Förderung der Darmbarriere entwickeln zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Abreu, M.T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L.S., Arnold, E.T., Arditi, M., 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 167, 1609–1616.
- Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J.N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., Flak, M.B., Cusick, J.L., Kohno, K., Iwawaki, T., Billmann-Born, S., Raine, T., Bharti, R., Lucius, R., Kweon, M.-N., Marciniak, S.J., Choi, A., Hagen, S.J., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Kaser, A., Blumberg, R.S., 2013. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 503, 272–276. <https://doi.org/10.1038/nature12599>
- Aerts, A.M., François, I.E.J.A., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2008. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2069–2079. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8035-0>
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675–680. <https://doi.org/10.1038/90609>
- Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V.S., Gosselin, A., Zhou, X., Gabuzda, D., 2009. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16-monocyte subsets. *BMC Genomics* 10, 403. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-403>
- Arce, L., Yokoyama, N.N., Waterman, M.L., 2006. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492–7504. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210056>
- 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.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 1, 141–150. <https://doi.org/10.1186/rr25>
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., Wilson, J.M., 1998. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102, 874–880.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Baumgart, D.C., Metzke, D., Schmitz, J., Scheffold, A., Sturm, A., Wiedenmann, B., Dignass, A.U., 2005. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 54, 228–236. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.040360>

- Beisner, J., Teltschik, Z., Ostaff, M.J., Tiemessen, M.M., Staal, F.J.T., Wang, G., Gerseman, M., Perminow, G., Vatn, M.H., Schwab, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2014. TCF-1-mediated Wnt signaling regulates Paneth cell innate immune defense effectors HD-5 and -6: implications for Crohn's disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 307, G487–G498. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00347.2013>
- Belkaid, Y., Bouladoux, N., Hand, T.W., 2013. Effector and Memory T cell Responses to Commensal Bacteria. *Trends Immunol* 34, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.03.003>
- Bernardo, D., Chaparro, M., Gisbert, J.P., 2018. Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol Nutr Food Res* 62, e1700931. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700931>
- Bevins, C.L., Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Micro* 9, 356–368. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Biechele, S., Cox, B.J., Rossant, J., 2011. Porcupine homolog is required for canonical Wnt signaling and gastrulation in mouse embryos. *Dev. Biol.* 355, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.029>
- Bogunovic, M., Davé, S.H., Tilstra, J.S., Chang, D.T.W., Harpaz, N., Xiong, H., Mayer, L.F., Plevy, S.E., 2007. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G1770-1783. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00249.2006>
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., Russell, M.W., 2008. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 1, 31–37. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.9>
- Brantjes, H., Barker, N., van Es, J., Clevers, H., 2002. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol. Chem.* 383, 255–261. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.027>
- Bykov, V.L., 2014. [Paneth cells: history of discovery, structural and functional characteristics and the role in the maintenance of homeostasis in the small intestine]. *Morfologija* 145, 67–80.
- Cario, E., Podolsky, D.K., 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68, 7010–7017.
- Chairatana, P., Chu, H., Castillo, P.A., Shen, B., Bevins, C.L., Nolan, E.M., 2016. Proteolysis Triggers Self-Assembly and Unmasks Innate Immune Function of a Human α -Defensin Peptide. *Chem Sci* 7, 1738–1752. <https://doi.org/10.1039/C5SC04194E>
- Chairatana, P., Nolan, E.M., 2014. Molecular basis for self-assembly of a human host-defense peptide that entraps bacterial pathogens. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 13267–13276. <https://doi.org/10.1021/ja5057906>

- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P.A., de Jong, M.F., Winter, M.G., Winter, S.E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N.H., Underwood, M.A., Tsolis, R.M., Young, G.M., Lu, W., Lehrer, R.I., Bäumlner, A.J., Bevins, C.L., 2012. Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* 337, 477–481. <https://doi.org/10.1126/science.1218831>
- Clatworthy, J.P., Subramanian, V., 2001. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mechanisms of Development* 101, 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00557-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00557-8)
- Clevers, H., 2013. Stem Cells: A unifying theory for the crypt. *Nature* 495, 53–54. <https://doi.org/10.1038/nature11958>
- Clevers, H.C., Bevins, C.L., 2013. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology* 75, 289–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>
- Courth, L.F., Ostaff, M.J., Mailänder-Sánchez, D., Malek, N.P., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2015. Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 14000–14005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510084112>
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.-P., D'Cruz, D., Casanova, J.-L., Trouillet, C., Geissmann, F., 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>
- Cruciat, C.-M., Niehrs, C., 2013. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015081>
- Daniels, D.L., Weis, W.I., 2005. β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 12, 364–371. <https://doi.org/10.1038/nsmb912>
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fassotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239–248.
- de Lau, W.B.M., Snel, B., Clevers, H.C., 2012. The R-spondin protein family. *Genome Biol.* 13, 242. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-242>

- Deuring, J.J., Fuhler, G.M., Konstantinov, S.R., Peppelenbosch, M.P., Kuipers, E.J., Haar, C. de, Woude, C.J. van der, 2014. Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut* 63, 1081–1091. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303527>
- Dijksterhuis, J.P., Petersen, J., Schulte, G., 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology Review: WNT/Frizzled signalling: receptor–ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br J Pharmacol* 171, 1195–1209. <https://doi.org/10.1111/bph.12364>
- Dupont, A., Kaconis, Y., Yang, I., Albers, T., Woltemate, S., Heinbockel, L., Andersson, M., Suerbaum, S., Brandenburg, K., Hornef, M.W., 2015. Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered antibacterial and anti-inflammatory peptide. *Gut* 64, 222–232. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307150>
- Economou, M., Trikalinos, T.A., Loizou, K.T., Tsianos, E.V., Ioannidis, J.P.A., 2004. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 2393–2404. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40304.x>
- Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, Å., Hammarström, M.-L., 2004. β -Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 137, 379–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02543.x>
- Falk, P., Roth, K.A., Gordon, J.I., 1994. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *Am. J. Physiol.* 266, G987-1003.
- Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Strobel, M., Heitbrock, H.Z., 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82, 3170–3176.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., delaMotte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., Strober, W., 1996. Disparate CD4(+) lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease - Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 157, 1261–1270.
- García, J.R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodríguez-Jiménez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.G., Bals, R., 2001. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus*

- oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306, 257–264. <https://doi.org/10.1007/s004410100433>
- Gearry, R.B., 2016. IBD and Environment: Are There Differences between East and West. *Dig Dis* 34, 84–89. <https://doi.org/10.1159/000442933>
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.
- Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S.K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S.P., Crabb, J.W., Ganz, T., Bevins, C.L., 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 3, 583–590. <https://doi.org/10.1038/ni797>
- Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J.T., Spector, T.D., Clark, A.G., Ley, R.E., 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Grigat, J., Soruri, A., Forssmann, U., Riggert, J., Zwirner, J., 2007. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J. Immunol.* 179, 3958–3965.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., Terán, L.M., 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* 135, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004>
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., Fernandez-Luna, J.L., 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 277, 41701–41705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206473200>
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J.M., 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707–5713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008557200>
- Haskill, S., Johnson, C., Eierman, D., Becker, S., Warren, K., 1988. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J. Immunol.* 140, 1690–1694.
- Hatzis, P., van der Flier, L.G., van Driel, M.A., Guryev, V., Nielsen, F., Denissov, S., Nijman, I.J., Koster, J., Santo, E.E., Welboren, W., Versteeg, R., Cuppen, E., van de Wetering, M., Clevers, H., Stunnenberg, H.G., 2008. Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2732–2744. <https://doi.org/10.1128/MCB.02175-07>

- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Henderson, B.R., Fagotto, F., 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* 3, 834–839. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf181>
- Herr, P., Basler, K., 2012. Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls. *Developmental Biology* 361, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.11.003>
- Hirsch, D., Wangsa, D., Zhu, Y.J., Hu, Y., Edelman, D.C., Meltzer, P.S., Heselmeyer-Haddad, K., Ott, C., Kienle, P., Galata, C., Horisberger, K., Ried, T., Gaiser, T., 2018. Dynamics of genome alterations in Crohn's disease associated colorectal carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0630>
- Hofmann, K., 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 111–112. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01539-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01539-X)
- Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J., 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Hoppler, S., Kavanagh, C.L., 2007. Wnt signalling: variety at the core. *Journal of Cell Science* 120, 385–393. <https://doi.org/10.1242/jcs.03363>
- Horelt, A., Belge, K.-U., Steppich, B., Prinz, J., Ziegler-Heitbrock, L., 2002. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur. J. Immunol.* 32, 1319–1327. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:5<1319::AID-IMMU1319>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:5<1319::AID-IMMU1319>3.0.CO;2-2)
- Ivanov, A.I., 2012. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions. *Advances in experimental medicine and biology* 763, 132–148.
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., Costantini, F., 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1172–1183.
- Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 16, 639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Kambayashi, T., Laufer, T.M., 2014. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol* 14, 719–730. <https://doi.org/10.1038/nri3754>
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation

- and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743–756. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.021>
- Katial, R.K., Sachanandani, D., Pinney, C., Lieberman, M.M., 1998. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 78–81.
- Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., Makino, H., 2002. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 2578–2586. <https://doi.org/10.1002/art.10545>
- Kim, J.E., Lin, G., Zhou, J., Mund, J.A., Case, J., Campbell, W.W., 2017. Weight loss achieved using an energy restriction diet with normal or higher dietary protein decreased the number of CD14++CD16+ proinflammatory monocytes and plasma lipids and lipoproteins in middle-aged, overweight, and obese adults. *Nutrition Research* 40, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.007>
- Koch, S., Kucharzik, T., Heidemann, J., Nusrat, A., Luegering, A., 2010. Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 161, 332–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04177.x>
- Koslowski, M.J., Kübler, I., Chamaillard, M., Schaeffeler, E., Reinisch, W., Wang, G., Beisner, J., Teml, A., Peyrin-Biroulet, L., Winter, S., Herrlinger, K.R., Rutgeerts, P., Vermeire, S., Cooney, R., Fellermann, K., Jewell, D., Bevins, C.L., Schwab, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Genetic Variants of Wnt Transcription Factor TCF-4 (TCF7L2) Putative Promoter Region Are Associated with Small Intestinal Crohn's Disease. *PLoS ONE* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004496>
- Koslowski, M.J., Teltschik, Z., Beisner, J., Schaeffeler, E., Wang, G., Kübler, I., Gersemann, M., Cooney, R., Jewell, D., Reinisch, W., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Schwab, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2012. Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet.* 8, e1002523. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002523>
- Koutsounas, I., Pylaris, E., Karantanos, P., Barbatzas, C., 2012. First diagnosis of inflammatory bowel disease in a 91-year-old man. *Case Rep Gastroenterol* 6, 790–796. <https://doi.org/10.1159/000346467>
- Krausova, M., Korinek, V., 2014. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cellular Signalling* 26, 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.032>
- Kübler, I., Koslowski, M.J., Gersemann, M., Fellermann, K., Beisner, J., Becker, S., Rothfuss, K., Herrlinger, K.R., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Influence of standard treatment on ileal and colonic antimicrobial defensin expression in active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology*

& Therapeutics 30, 621–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04070.x>

- Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nuñez, G., Keshav, S., 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125, 47–57. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00661-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00661-9)
- Laurin, M., Everett, M.L., Parker, W., 2011. The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture. *Anat Rec (Hoboken)* 294, 567–579. <https://doi.org/10.1002/ar.21357>
- Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., Raz, E., 2006. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8, 1327–1336. <https://doi.org/10.1038/ncb1500>
- Lehrer, R.I., Ganz, T., Selsted, M.E., 1991. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 64, 229–230. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90632-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90632-9)
- Lehrmann, H., Pritchard, L.L., Harel-Bellan, A., 2002. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv. Cancer Res.* 86, 41–65.
- Liebler, J.M., Kunkel, S.L., Burdick, M.D., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Strieter, R.M., 1994. Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 152, 241–249.
- Liu, Y.J., Kanzler, H., Soumelis, V., Gilliet, M., 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2, 585–589. <https://doi.org/10.1038/89726>
- Louis, E., Collard, A., Oger, A.F., Degroote, E., Aboul Nasr El Yafi, F.A., 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.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., Behrens, J., 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1184–1193.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Mandel, L.J., Bacallao, R., Zampighi, G., 1993. Uncoupling of the molecular “fence” and paracellular “gate” functions in epithelial tight junctions. *Nature* 361, 552–555. <https://doi.org/10.1038/361552a0>

- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D., 2001. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7, 801–809.
- Martini, E., Krug, S.M., Siegmund, B., Neurath, M.F., Becker, C., 2017. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 4, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.007>
- Mathew, B., Nagaraj, R., 2015. Antimicrobial activity of human α -defensin 5 and its linear analogs: N-terminal fatty acylation results in enhanced antimicrobial activity of the linear analogs. *Peptides* 71, 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.009>
- Matsuoka, K., Kanai, T., 2015. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* 37, 47–55. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0454-4>
- Merlini, E., Tincati, C., Biasin, M., Saulle, I., Cazzaniga, F.A., d'Arminio Monforte, A., Cappione, A.J., Snyder-Cappione, J., Clerici, M., Marchetti, G.C., 2016. Stimulation of PBMC and Monocyte-Derived Macrophages via Toll-Like Receptor Activates Innate Immune Pathways in HIV-Infected Patients on Virally Suppressive Combination Antiretroviral Therapy. *Front Immunol* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00614>
- Michielan, A., D'Incà, R., 2015. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/628157>
- Miller, J.R., 2002. The Wnts. *Genome Biol* 3, reviews3001.1-reviews3001.15.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G., 2012. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 142, 46–54.e42. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
- Mow, W.S., Vasilias, E.A., Lin, Y.-C., Fleshner, P.R., Papadakis, K.A., Taylor, K.D., Landers, C.J., Abreu-Martin, M.T., Rotter, J.I., Yang, H., Targan, S.R., 2004. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 126, 414–424.
- Murphy, K., Weaver, C., 2016. *Janeway's Immunobiology*, 9th edition. Garland Science.
- Nazareth, N., Magro, F., Silva, J., Duro, M., Gracio, D., Coelho, R., Appelberg, R., Macedo, G., Sarmiento, A., 2014. Infliximab therapy increases the frequency of circulating CD16+ monocytes and modifies macrophage cytokine response to bacterial infection. *Clin Exp Immunol* 177, 703–711. <https://doi.org/10.1111/cei.12375>

- Neurath, M.F., 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
- Niehrs, C., 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- Nile, A.H., Hannoush, R.N., 2016. Fatty acylation of Wnt proteins. *Nat. Chem. Biol.* 12, 60–69. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2005>
- Nuding, S., Zabel, L.T., Enders, C., Porter, E., Fellermann, K., Wehkamp, J., Mueller, H.A.G., Stange, E.F., 2009. Antibacterial activity of human defensins on anaerobic intestinal bacterial species: a major role of HBD-3. *Microbes Infect.* 11, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.01.001>
- Nusse, R., Varmus, H., 2012. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J* 31, 2670–2684. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.146>
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., Núñez, G., 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 276, 4812–4818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008072200>
- Ohno, H., 2016. Intestinal M cells. *J Biochem* 159, 151–160. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv121>
- O’Keeffe, M., Mok, W.H., Radford, K.J., 2015. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4309–4325. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2005-0>
- O’Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., Kagnoff, M.F., 1999. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol.* 163, 6718–6724.
- Ostaf, M.J., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Molecular Medicine* 5, 1465–1483. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201773>
- Ouellette, A.J., Greco, R.M., James, M., Frederick, D., Naftilan, J., Fallon, J.T., 1989. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J. Cell Biol.* 108, 1687–1695.
- Pai, S.G., Carneiro, B.A., Mota, J.M., Costa, R., Leite, C.A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J.B., Chae, Y.K., Giles, F.J., 2017. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol* 10, 101. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>
- Pasquevich, K.A., Bieber, K., Günter, M., Grauer, M., Pötz, O., Schleicher, U., Biedermann, T., Beer-Hammer, S., Bühring, H.-J., Rammensee, H.-G., Zender, L., Autenrieth, I.B., Lengerke, C., Autenrieth, S.E., 2015. Innate immune system favors emergency monoipoiesis at the expense of DC-

- differentiation to control systemic bacterial infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 45, 2821–2833. <https://doi.org/10.1002/eji.201545530>
- Passlick, B., Flieger, D., Ziegler-Heitbrock, H.W., 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534.
- Pazgier, M., Hoover, D.M., Yang, D., Lu, W., Lubkowski, J., 2006. Human β -defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1294–1313. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5540-2>
- Perminow, G., Beisner, J., Koslowski, M., Lyckander, L.G., Stange, E., Vatn, M.H., Wehkamp, J., 2010. Defective paneth cell-mediated host defense in pediatric ileal Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 452–459. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.643>
- Peyrin-Biroulet, L., 2010. Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 56, 233–243.
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine* 347, 417–429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Poitou, C., Dalmas, E., Renovato, M., Benhamo, V., Hajduch, F., Abdenmour, M., Kahn, J.-F., Veyrie, N., Rizkalla, S., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., Clément, K., Cremer, I., 2011. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocytes in Obesity and During Weight Loss: Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 2322–2330. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230979>
- Porter, E.M., van Dam, E., Valore, E.V., Ganz, T., 1997. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun* 65, 2396–2401.
- Proffitt, K.D., Virshup, D.M., 2012. Precise Regulation of Porcupine Activity Is Required for Physiological Wnt Signaling. *J Biol Chem* 287, 34167–34178. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381970>
- Quayle, A.J., Porter, E.M., Nussbaum, A.A., Wang, Y.M., Brabec, C., Yip, K.P., Mok, S.C., 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152, 1247–1258.
- Raj, P.A., Dentino, A.R., 2002. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Letters* 206, 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00496-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00496-7)
- Raji, R.J., Sasikumar, R., Jacob, E., 2018. Multiple roles of Adenomatous Polyposis Coli gene in Wnt Signalling - a Computational Model. *BioSystems* 172, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2018.08.001>
- Riedhammer, C., Halbritter, D., Weissert, R., 2016. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol. Biol.* 1304, 53–61. https://doi.org/10.1007/7651_2014_99

- Riordan, S.M., Skinner, N., Nagree, A., McCallum, H., Mclver, C.J., Kurtovic, J., Hamilton, J.A., Bengmark, S., Williams, R., Visvanathan, K., 2003. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 37, 1154–1164. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50180>
- Robles, A.I., Traverso, G., Zhang, M., Roberts, N.J., Khan, M.A., Joseph, C., Lauwers, G.Y., Selaru, F.M., Popoli, M., Pittman, M.E., Ke, X., Hruban, R.H., Meltzer, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Harris, C.C., Papadopoulos, N., 2016. Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* 150, 931–943. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.036>
- Rogacev, K.S., Ulrich, C., Blömer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Köhler, H., Fliser, D., Girndt, M., Heine, G.H., 2010. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 31, 369–376. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp308>
- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., Wagner, U., 2012. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 64, 671–677. <https://doi.org/10.1002/art.33418>
- Saha, S., Aranda, E., Hayakawa, Y., Bhanja, P., Atay, S., Brodin, N.P., Li, J., Asfaha, S., Liu, L., Tailor, Y., Zhang, J., Godwin, A.K., Tome, W.A., Wang, T.C., Guha, C., Pollard, J.W., 2016. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13096>
- Salim, S.Y., Söderholm, J.D., 2011. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 362–381. <https://doi.org/10.1002/ibd.21403>
- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., Bevins, C.L., 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522–526. <https://doi.org/10.1038/nature01520>
- Sancho, E., Batlle, E., Clevers, H., 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.012>
- Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Sartor, R.B., 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577–594. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059>

- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., Clevers, H., 2011. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>
- Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., Fellermann, K., 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 528–535. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03587.x>
- Schmid, M., Fellermann, K., Fritz, P., Wiedow, O., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2007. Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 81, 907–915. <https://doi.org/10.1189/jlb.0906581>
- Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature* 469, 419–423. <https://doi.org/10.1038/nature09674>
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- Semënov, M.V., Zhang, X., He, X., 2008. DKK1 Antagonizes Wnt Signaling without Promotion of LRP6 Internalization and Degradation. *J Biol Chem* 283, 21427–21432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800014200>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164, 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Seto, E., Yoshida, M., 2014. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Simms, L.A., Doecke, J.D., Roberts, R.L., Fowler, E.V., Zhao, Z.Z., McGuckin, M.A., Huang, N., Hayward, N.K., Webb, P.M., Whiteman, D.C., Cavanaugh, J.A., McCallum, R., Florin, T.H., Barclay, M.L., Garry, R.B., Merriman, T.R., Montgomery, G.W., Radford-Smith, G.L., 2010. KCNN4 Gene Variant Is Associated With Ileal Crohn's Disease in the Australian and New Zealand Population. *Am J Gastroenterol* 105, 2209–2217. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.161>
- Singh, P.K., Jia, H.P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B.A., Greenberg, E.P., Valore, E.V., Welsh, M.J., Ganz, T., Tack, B.F., McCray, P.B., 1998. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14961–14966.
- Slevin, S.M., Denny, M.C., Connaughton, E.P., Ribeiro, A., Ceredig, R., Griffin, M.D., Egan, L.J., 2016. Infliximab Selectively Modulates the Circulating Blood Monocyte Repertoire in Crohn's Disease. *Inflamm.*

Bowel Dis. 22, 2863–2878.
<https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000964>

- Söderholm, J.D., Peterson, K.H., Olaison, G., Franzén, L.E., Weström, B., Magnusson, K.E., Sjö Dahl, R., 1999. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117, 65–72.
- Soenen, S., Rayner, C.K., Jones, K.L., Horowitz, M., 2016. The ageing gastrointestinal tract. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19, 12–18.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000238>
- Sommer, F., Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Städeli, R., Hoffmans, R., Basler, K., 2006. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol.* 16, R378-385.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.019>
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A., 1973. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J Exp Med* 137, 1142–1162.
- Stilling, R.M., Bordenstein, S.R., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2014. Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? *Front Cell Infect Microbiol* 4.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00147>
- Surmann-Schmitt, C., Widmann, N., Dietz, U., Saeger, B., Eitzinger, N., Nakamura, Y., Rattel, M., Latham, R., Hartmann, C., von der Mark, H., Schett, G., von der Mark, K., Stock, M., 2009. Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis. *J. Cell. Sci.* 122, 3627–3637.
<https://doi.org/10.1242/jcs.048926>
- 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.
- Thiesen, S., Janciauskiene, S., Uronen-Hansson, H., Agace, W., Högerkorp, C.-M., Spee, P., Håkansson, K., Grip, O., 2014. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 95, 531–541. <https://doi.org/10.1189/jlb.0113021>
- Tollin, M., Bergman, P., Svenberg, T., Jörnvall, H., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., 2003. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides* 24, 523–530.
- Tunzi, C.R., Harper, P.A., Bar-Oz, B., Valore, E.V., Semple, J.L., Watson-MacDonell, J., Ganz, T., Ito, S., 2000. β -Defensin Expression in Human Mammary Gland Epithelia. *Pediatr Res* 48, 30–35.
<https://doi.org/10.1203/00006450-200007000-00008>

- Unitt, J., Hornigold, D., 2011. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochemical Pharmacology* 81, 1324–1328. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.010>
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- Van Limbergen, J., Radford-Smith, G., Satsangi, J., 2014. Advances in IBD genetics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 372–385. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.27>
- Vanuysel, T., Senger, S., Fasano, A., Shea-Donohue, T., 2013. Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Biochemistry of Stem Cells* 1830, 2410–2426. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.006>
- Ventham, N.T., Kennedy, N.A., Nimmo, E.R., Satsangi, J., 2013. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* 145, 293–308. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.050>
- Verma, R., Verma, A.K., Ahuja, V., Paul, J., 2010. Real-Time Analysis of Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease in India. *J Clin Microbiol* 48, 4279–4282. <https://doi.org/10.1128/JCM.01360-10>
- Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L., 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol* 5, 494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00494>
- Wang, G., 2014. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)* 7, 545–594. <https://doi.org/10.3390/ph7050545>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Wang, H., Diao, D., Shi, Z., Zhu, X., Gao, Y., Gao, S., Liu, X., Wu, Y., Rudolph, K.L., Liu, G., Li, T., Ju, Z., 2016. SIRT6 Controls Hematopoietic Stem Cell Homeostasis through Epigenetic Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell* 18, 495–507. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.005>
- Wang, M.-H., Picco, M.F., 2017. Crohn's Disease: Genetics Update. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 46, 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.05.002>
- Wang, X., Reid Sutton, V., Omar Peraza-Llanes, J., Yu, Z., Rosetta, R., Kou, Y.-C., Eble, T.N., Patel, A., Thaller, C., Fang, P., Van den Veyver, I.B., 2007. Mutations in X-linked PORCN, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia. *Nat Genet* 39, 836–838. <https://doi.org/10.1038/ng2057>
- Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W.,

2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* 67, 699–704.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., Stange, E.F., 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, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F., 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.032805>
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., Bevins, C.L., 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18129–18134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>
- Weinberg, A., Quiñones-Mateu, M.E., Lederman, M.M., 2006. Role of human beta-defensins in HIV infection. *Adv. Dent. Res.* 19, 42–48. <https://doi.org/10.1177/154407370601900109>
- Welsch, U., Deller, T., 2011. Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller. Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- White, S.H., Wimley, W.C., Selsted, M.E., 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Current Opinion in Structural Biology* 5, 521–527. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80038-7](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80038-7)
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., Wong, S.-C., 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–e31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A.B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R.H., Fuller, J.H., Reinhard, C., Garcia, P.D., Randazzo, F.M., Escobedo, J., Fantl, W.J., Williams, L.T., 2001. Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14973–14978. <https://doi.org/10.1073/pnas.261574498>
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., Oppenheim, J.J., 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23, 291–296.
- Yatsunenkov, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G.,

- Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
- Zins, S.R., Nelson, C.D.S., Maginnis, M.S., Banerjee, R., O’Hara, B.A., Atwood, W.J., 2014. The human alpha defensin HD5 neutralizes JC polyomavirus infection by reducing endoplasmic reticulum traffic and stabilizing the viral capsid. *J. Virol.* 88, 948–960. <https://doi.org/10.1128/JVI.02766-13>

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der medizinischen Universitätsklinik, Innere Medizin I – Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten, unter der Betreuung von Prof. Dr. Jan Wehkamp durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Jan Wehkamp (Doktorvater) sowie der Betreuung und Unterstützung von Dr. rer. nat. Nicole Armbruster und Dr. rer. nat. Judith Wendler.

Sämtliche Versuche wurden von mir, nach Einarbeitung durch MTA Jutta Bader und Dr. rer. nat. Nicole Armbruster, eigenständig durchgeführt. Die Zell-Analysen und Zell-Sortierungen erfolgten in Kooperation mit der FACS Core Facility.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig mit Unterstützung durch Dr. rer. nat. Nicole Armbruster und Dr. rer. nat. Judith Wendler.

Sämtliche Abbildungen wurden von mir eigenständig erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Das Manuskript wurde durch Dr. rer. nat. Nicole Armbruster korrigiert.

Tübingen, den

(U. Denzau-Graupner)

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Prof. Dr. med. Jan Wehkamp danke ich für die Bereitstellung des Themas, die unkomplizierte Beantwortung meiner Fragen und das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Nicole Armbruster, für die fachliche, freundliche und engagierte Betreuung, die vielen hilfreichen Gespräche, Anregungen sowie das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift. Du warst mir immer eine gute Mentorin.

Weiterhin möchte ich Jutta Bader und Marion Strauß für die Unterstützung im Laboralltag danken.

Ich bedanke mich auch bei Dr. rer. nat. Judith Wendler, Dr. rer. nat. Dirk Ehmman und M. sc. Louis Königer und allen anderen Mitgliedern der AG Wehkamp für das angenehme Arbeitsklima, die vielen guten Tipps und Diskussionen. Ihr zusammen habt mir eine schöne Zeit im Labor und auch danach beschert.

Meiner Familie, ganz besonders meinem Mann, möchte ich für die fortwährende Unterstützung und Liebe danken.