

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

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

**Analyse von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei  
Patienten mit Morbus Crohn**

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

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

**vorgelegt von**

**Hauk, Helen Feodora Sweta**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wehkamp

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Albert

Tag der Disputation: 12.06.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Der anatomische Aufbau des Gastrointestinaltraktes .....	1
1.1.1 Der Dünndarm .....	2
1.1.2 Der Dickdarm.....	2
1.1.3 Die Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes .....	3
1.2 Abwehrstrategien des humanen Gastrointestinaltraktes.....	4
1.2.1 Mechanische Barriere: Epithel und Mukus .....	5
1.2.2 Das angeborene Immunsystem im Darm: Antimikrobielle Peptide .....	6
1.2.3 Erkennung bakterieller Bestandteile im Darm .....	7
1.3 Die Rolle der Paneth-Zelle in der antimikrobiellen Abwehr.....	9
1.3.1 Regulation der Stammzellnische durch Paneth-Zellen.....	9
1.3.2 Paneth-Zell-Metaplasie.....	11
1.4 Der Wnt-Signalweg .....	11
1.4.1 Der kanonische Wnt-Signalweg .....	12
1.4.2 Der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Defensin-Expression .....	13
1.4.3 Die Rolle des Wnt-Signalweges in der Karzinogenese .....	13
1.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen - Störung der Barriere .....	14
1.4.1 Morbus Crohn.....	14
1.5 Maligne Erkrankungen des Darmes.....	16
1.5.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Krebs.....	16
1.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Geräte.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	18
2.1.3 Chemikalien, Antikörper und Kits .....	18
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	20
2.1.5 Bakterien .....	22
2.1.6 Primer und Plasmide .....	22
2.1.7 Patientenproben .....	24
2.1.8 Software .....	27
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Nukleinsäuremethoden.....	27
2.2.2 Proteinmethoden .....	35
2.2.3 Statistische Methoden .....	36

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 Expressionsanalyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Genen im Darm ..	37
3.1.1 Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren im Ileum.....	37
3.1.2 Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren im Kolon .....	42
3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren.....	50
3.2 Immunhistochemischer Nachweis von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon .....	51
3.2.1 Immunhistochemische Detektion von HD5 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileum-Kolonbefall und Entzündung .....	51
3.2.2 Immunhistochemische Detektion von HD6 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileum-Kolonbefall und Entzündung .....	52
3.3 Analyse der Auswirkung von metaplastischen Paneth-Zellen auf Bakterien im Kolon bei MC.....	54
3.3.1 Niedrigere Expression der bakteriellen 16S rRNA im Kolon bei Morbus Crohn bei einer hohen HD5- und HD6-Expression .....	54
3.4 Analyse von Wnt-Liganden im Kolon mit metaplastischen Paneth-Zellen	56
3.4.1 Erhöhte Expression von Wnt1 im Kolon bei Morbus Crohn besonders bei NOD2-Wildtyp und Entzündung.....	56
3.4.2 Niedrigere Expression von Wnt2 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und tendenziell höhere Expression bei Ileum-Kolonbefall .....	59
3.4.3 Niedrigere Expression von Wnt3 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und geringeres Wnt3-Defizit bei (Ileum-)Kolonbefall.....	61
3.4.4 Niedrigere Expression von Wnt3a im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und tendenziell höhere Expression bei (Ileum-)Kolonbefall .....	63
3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Analyse von Wnt-Liganden.....	65
3.5 Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Genen in Kolonkarzinomgewebe..	66
3.5.1 Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren in Kolonkarzinomen.....	66
3.5.2 Analyse von Wnt-Liganden in Kolonkarzinomen mit metaplastischen Paneth-Zellen .....	68
3.5.3 Zusammenfassung der Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Faktoren in Kolonkarzinomen.....	70
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1 Reproduzierbarkeit von Erkenntnissen zu Paneth-Zell-Defensinen im Ileum .....	71
4.2 Expression von Paneth-Zell-Faktoren im Kolon bei MC .....	73
4.2.1 Repräsentativität des Kolonkollektivs für metaplastische Paneth-Zellen.....	73
4.2.2 Einfluss des genetischen NOD2-Status auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden durch metaplastische Paneth-Zellen .....	75
4.2.3 Einfluss des Entzündungsstatus auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden durch metaplastische Paneth-Zellen .....	76
4.3 Antimikrobielle Funktion der metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC.....	77
4.4 Expression von Wnt-Liganden im Kolon mit metaplastischen Paneth-Zellen .....	79

4.4.1 Mögliche Verknüpfung von NOD2-Status und Wnt-Liganden-Expression.....	79
4.4.2 Wnt-Liganden und die Entstehung der metaplastischen Paneth-Zellen bei MC .....	81
4.5 Zusammenhang zwischen metaplastischen Paneth-Zellen und Kolonkarzinomen .....	83
4.5.1 Nachweis von Paneth-Zell-Faktoren in Kolonkarzinomen.....	83
4.5.2 Karzinogenese im Kolon: Metaplastische Paneth-Zellen und ihr möglicher Einfluss auf den Wnt-Signalweg .....	84
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick .....	87
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>104</b>
7.1 Expression von antimikrobiellen Paneth-Zell-Genen im Kolon .....	104
7.1.1 Expression von HD5, HD6 und Lysozym im Kolon mit Streuung ....	104
7.1.2 Expression von HD5 im Kolon normiert auf HPRT1 .....	106
7.1.3 Expression von HD6 im Kolon normiert auf HPRT1 .....	107
7.1.4 Expression von Lysozym im Kolon normiert auf HPRT1 .....	108
7.2 Analyse der Auswirkung von metaplastischen Paneth-Zellen auf Bakterien im Kolon bei MC.....	109
7.3 Expression von Wnt-Liganden im Kolon mit metaplastischen Paneth-Zellen .....	110
7.3.1 Expression von Wnt-Liganden im Kolon mit Streuung .....	110
7.3.2 Expression von Wnt1 im Kolon normiert auf HPRT1.....	112
7.3.3 Expression von Wnt2 im Kolon normiert auf HPRT1.....	114
7.3.4 Expression von Wnt3 im Kolon normiert auf HPRT1.....	115
7.3.5 Expression von Wnt3a im Kolon normiert auf HPRT1.....	117
7.4 Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Genen in Kolonkarzinomen .....	118
7.4.1 Expression von HD5, HD6 und Lysozym normiert auf $\beta$ -Actin .....	118
7.4.2 Expression von Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a normiert auf $\beta$ -Actin.....	119
<b>8. Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....</b>	<b>120</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
AMP	antimikrobielles Peptid
Anti-HD5	Antikörper gegen HD5
Anti-HD6	Antikörper gegen HD6
BMP	„ <i>bone morphogenetic protein</i> “
Atg16L1	„ <i>autophagy-related 16-like 1 gene</i> “
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CFU	„ <i>colony forming units</i> “
Cp-Wert	„ <i>Crossing-point</i> “
CRC	„ <i>colorectal cancer</i> “
CU	Colitis Ulcerosa
Dvl	„ <i>Dishevelled</i> “
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	„ <i>epithelial growth factor</i> “
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fz	Frizzled
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$
HBD1-4	Humanes beta-Defensin 1-4
HD5, 6	Humanes Defensin 5, 6
HG	„ <i>Housekeeping</i> “ Gen
HNP1-4	Humanes neutrophiles Peptid 1-4
HPRT1	„ <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1</i> “
IL-1	Interleukin 1
LGR5	„ <i>Leucine-rich repeat-containing G- protein coupled receptor 5</i> “

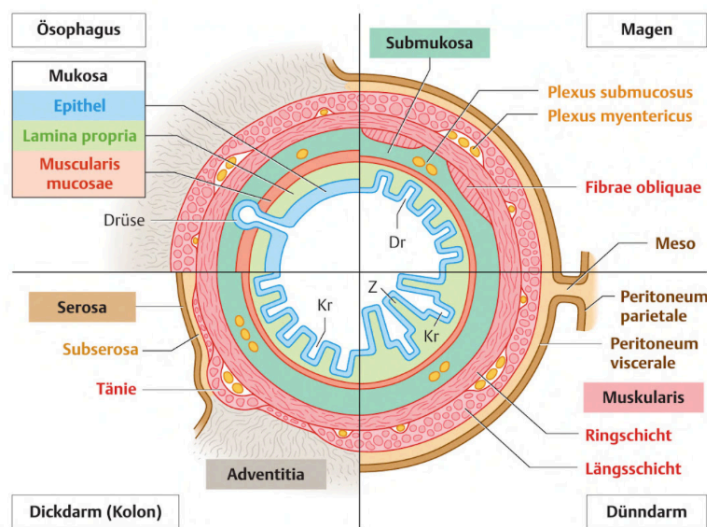
LOH-MS	<i>„loss-of-heterozygosity of microsatellitemarkers“</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>„low-density lipoprotein receptor-related protein“</i>
LRR	<i>„Leucine-rich Repeat“</i>
MAP	<i>“mitogen-activated protein”</i>
MC	Morbus Crohn
NG	Neutrophiler Granulozyt
„NOD-like“-Rezeptoren	<i>„nucleotide-binding oligomerization domain-like“</i> Rezeptoren 1, 2
ns	Nicht signifikant
PAMPs	<i>“Pathogen associated molecular patterns”</i>
PBMCs	<i>„Peripheral Blood Mononuclear Cell”</i>
PCR	<i>„polymerase chain reaction”</i>
PRR	<i>“Pattern-Recognition”-Rezeptor</i>
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RegIIIγ	<i>„regenerating islet-derived 3 gamma“</i>
RIP2	<i>“receptor-interacting protein 2”</i>
SNP	<i>„single-nucleotide polymorphism”</i>
sPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2
TCF1, 4	<i>„Transcription factor“</i> 1, 4
TLR	<i>„Toll-like“-Rezeptor</i>
TGFα	<i>„Transforming growth factor alpha“</i>
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Wnt	<i>„Wingless-related integration site“</i>

## 1. Einleitung

### 1.1 Der anatomische Aufbau des Gastrointestinaltraktes

Der Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) ist ein mit Epithel ausgekleideter Muskelschlauch, der von der Mundhöhle bis zum Anus reicht. Die Organe des GI-Traktes umfassen den Ösophagus, den Magen, den Dün- und den Dickdarm. Sie arbeiten in Koordination mit der Leber, der Gallenblase und dem Pankreas, um die lebenserhaltenden Aufgaben der Verdauung und der Nahrungsaufnahme zu bewerkstelligen.

Der Wandaufbau des GI-Traktes ist weitgehend einheitlich. Die innerste Schicht, die *Tunica mucosa* (Mukosa), setzt sich aus einer luminalen Epithelschicht, einer bindegewebsartigen *Lamina propria* und einer dünnen Muskelschicht, der *Lamina muscularis mucosae*, zusammen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Wandschichten des Gastrointestinaltraktes**

Zu Verfügung gestellt von Thieme, aus Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012, Thieme, Taschenlehrbuch Histologie, Entwurf von B. Kurz, Anatomisches Institut, Kiel

Unterhalb der Mukosa befindet sich die bindegewebsartige *Tunica submucosa* (Submukosa). Sie beherbergt neben Blut- und Lymphgefäßen auch Teile des enterischen Nervensystems. Darauf folgt die *Tunica muscularis* (Muskularis), die ein zusätzliches enterisches Nervengeflecht enthält. Dieses generiert die

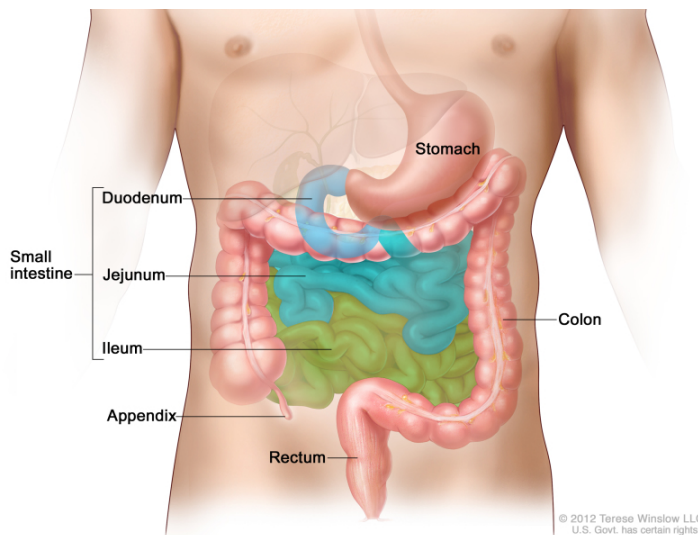
peristaltischen Bewegungen des GI-Traktes. Abschließend ist der GI-Trakt von einer *Tunica adventitia* oder *Tunica serosa* (Serosa) umgeben (Thompson et al., 2018) (Abbildung 1).



## 1.1.1 Der Dünndarm

Die Hauptfunktion des Dünndarms liegt in der Resorption von Nahrungsbestandteilen. Er gliedert sich in drei funktionelle Abschnitte:

Duodenum, Jejunum und Ileum (Jeejeebhoy, 2002; Thompson et al., 2018) (Abbildung 2). Diese schließen sich an den Pylorus des Magens an (Koop,



**Abbildung 2: Lage und Gliederung des Dünndarms**

Mit Genehmigung von Terese Winslow, aus PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002, For the National Cancer Institute © (2012) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

2013). Im rechten Unterbauch mündet das Ileum in das Kolon. Die Ringmuskulatur ist in diesem Bereich lokal verstärkt und bildet so eine bakterielle Barriere, indem sie den Rückfluss von Koloninhalt in das terminale Ileum verhindert (Koop, 2013).

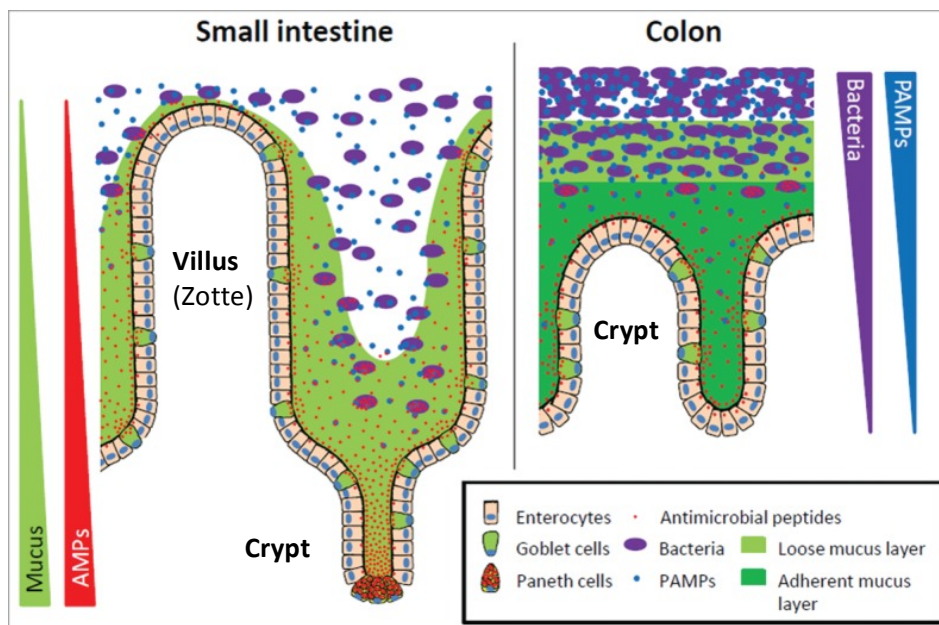
Die spezialisierten intestinalen Epithelzellen der Mukosa erfüllen zum einen die Funktion der Absorption von Nahrungsbestandteilen (Autschbach, 2004). Um diese effizient zu bewerkstelligen, ist das Schleimhautrelief von einem Wechselspiel aus Mikrovilli-besetzten Zotten, d. h. fingerförmigen Schleimhautausstülpungen, und Furchen - den sog. „Lieberkühn-Krypten“ - geprägt (Haubrich, 2003; Koop, 2013). So entsteht eine vergrößerte Resorptionsfläche (Elphick and Mahida, 2005) von etwa 400 m<sup>2</sup>, die allerdings ebenso eine potentielle Eindringfläche für Bakterien darstellt. Daher verfügt die Mukosa zum anderen über Verteidigungsmechanismen, wie Paneth-Zellen, die antimikrobiell aktive Substanzen sezernieren (Elphick and Mahida, 2005).

## 1.1.2 Der Dickdarm

Der Dickdarm beginnt mit dem Caecum, dem sog. „Blinddarm“. An seinem Ende liegt der Wurmfortsatz (*Appendix vermiformis*). Nach aboral folgt der Kolonrahmen (Koop, 2013) (Abbildung 2). Die Hauptfunktion des Kolons

besteht in der Absorption von Wasser und Elektrolyten (Jeejeebhoy, 2002). Im Anschluss folgen das Rektum und der Anus, mit dem der Dickdarm endet (Koop, 2013).

Im Schleimhautrelief des Dickdarms finden sich im Gegensatz zum Dünndarm keine Zotten mit Mikrovilli. Dagegen sind viele Krypten vorhanden (Koop, 2013). Da der Dickdarm die dichteste bakterielle Besiedlung des ganzen GI-Traktes aufweist (Ostaff et al., 2013), sind hier adäquate Verteidigungsmechanismen wichtig, um die Bakterien auf Distanz zu halten. Anders als im Dünndarm, kommen im gesunden Kolon allerdings keine Paneth-Zellen vor (Cunliffe et al., 2001). Dagegen finden sich dort vorwiegend Becherzellen, die den Mukus bilden (Abbildung 3). Er hält hier vor allem die Mikrobiota auf Distanz zum Epithel und bietet so eine erste mechanische Barriere (Stange, 2015).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Unterschiede von Dünndarm- und Dickdarmschleimhaut**  
 Mit Genehmigung von Taylor & Francis Ltd, geändert nach Dupont *et al*, 2014, Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa, Gut Microbes

### 1.1.3 Die Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes

Der menschliche Darm beherbergt in der Summe mehr als  $10^{14}$  Mikroorganismen. Sie gehören mehr als tausenden verschiedenen Spezies an, hauptsächlich Bakterien, jedoch auch *Eukaryoten*, Viren und *Archaeen* (Backhed, 2005; Ostaff et al., 2013). In Abhängigkeit von Alter, Gesundheitszustand, Ernährung und Umweltfaktoren verändert sich die

Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota ständig (Lozupone et al., 2012). Zusätzlich variiert sie abhängig von der Lokalisation im GI-Trakt: Im Magen und im proximalen Dünndarm ist die Bakteriendichte relativ gering, da hier durch die Magensäure und Gallensäuren ein relativ saures Milieu herrscht. Im Jejunum und Ileum findet man ca.  $10^4$ – $10^7$  CFU/ml und im Kolon mit ca.  $10^{11}$ – $10^{12}$  CFU/ml am meisten (Justesen et al., 1984; O'Hara and Shanahan, 2006; Ostaff et al., 2013). Kommensale Mikroorganismen tragen zur Ernährung, der epithelialen Proliferation und der Differenzierung des Wirtsorganismus bei (Be, 1981; Hooper, 2001; O'Hara and Shanahan, 2006). Zudem verhindern die residenten Mikrobiota eine zu starke Besiedelung durch pathogene Mikroorganismen, indem sie u. a. mit diesen um Platz, Nahrungsmittel und Wirtsrezeptoren konkurrieren (Lupp et al., 2007; Mushin and Dubos, 1965; Reid et al., 2001; Sekirov and Finlay, 2009; Sprunt and Leidy, 1988). Des Weiteren sind die Mikrobiota bei der Entwicklung und Regulation des mukosalen intestinalen Immunsystems beteiligt (Bevins and Salzman, 2011; Hill and Artis, 2010; Round and Mazmanian, 2009). Beim gesunden Erwachsenen dominieren im Wesentlichen vier Bakterienstämme. Am häufigsten findet man die gram-negativen *Bacteroidetes* und die gram-positiven *Firmicutes* (Bevins and Salzman, 2011). Bei Störungen der Darmmikrobiota, z.B. unter sterilen Bedingungen oder Antibiotikaeinnahme, steigt die Anfälligkeit gegenüber Darminfektionen (Bammann et al., 1978; Vollaard et al., 1992). Im Zuge chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CEDs) wurden in diesem Zusammenhang Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota beobachtet (Martinez-Medina et al., 2006).

### **1.2 Abwehrstrategien des humanen Gastrointestinaltraktes**

Das Immunsystem lässt sich im Allgemeinen in eine angeborene und eine erworbene Komponente der Immunantwort unterteilen (Medzhitov and Janeway, 2000). Die erworbene Immunantwort benötigt längere Zeit. Sie wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt, die zunächst durch Stimulation mit einem spezifischen Antigen aktiviert werden müssen und sich dann aber gezielt gegen dieses richten. Dagegen wirkt die angeborene Immunantwort unmittelbar

und unspezifisch gegen körperfremde Mikroorganismen und kann daher als erste Verteidigungsstufe gesehen werden. So soll eine Invasion in den menschlichen Organismus verhindert werden, bevor Lymphozyten überhaupt auf spezifische Antigene stoßen können (Elphick and Mahida, 2005).

Im Darm besteht die angeborene Immunantwort zum einen aus den mechanischen Elementen Epithel und Mukus, zum anderen setzt sie sich aus chemischen und zellulären Elementen zusammen, die zum Immunsystem gehören. Diese Komponenten arbeiten auf drei Ebenen: dem extraepithelialen, dem epithelialen und dem subepithelialen Raum (Elphick and Mahida, 2005). Hinsichtlich der hohen bakteriellen Besiedlung des Darmes ist eine adäquate Barriere unabdingbar. Neben ihrer Funktion in der Abwehr von Pathogenen beeinflusst die mukosale Barriere außerdem die Zusammensetzung des Darmmikrobioms (Salzman et al., 2010).

### **1.2.1 Mechanische Barriere: Epithel und Mukus**

Die mechanische Barriere aus Epithel und Mukus, die Abstoßung von Enterozyten und die Peristaltik bilden die mechanischen Elemente der angeborenen Immunantwort als Teil der intestinalen Barriere. Die einlagige Epithelschicht verhindert mit ihren „*Tight-Junctions*“ das Eindringen von Bakterien (Elphick and Mahida, 2005). Durch die Sekretion von großen Glykoproteinen, den Muzinen, produzieren Becherzellen als spezialisierte Epithelzellen ein viskoses Sekret, den Mukus. Er ermöglicht es, dass die Mikrobiota zusammen mit Antikörpern und antimikrobiellen Peptiden (AMPs) eingefangen werden, die gegen eindringende Mikroorganismen wirken (Johansson et al., 2013; Ramanan and Cadwell, 2016). Im Dickdarm besteht der Mukus im Gegensatz zum Dünndarm aus zwei Lagen. Die innen gelegene Schicht kann dort nicht von Bakterien durchdrungen werden. Somit ist der Dickdarm vor der großen Bakterienmenge geschützt, während im Dünndarm bei einer einlagigen Schicht die Resorption ermöglicht werden kann (Ermund et al., 2013).

### 1.2.2 Das angeborene Immunsystem im Darm: Antimikrobielle Peptide

Zu den extraepithelialen Verteidigungsmechanismen des Darms gehören mehrere Komponenten des angeborenen Immunsystems. Dazu zählen antimikrobielle Peptide (AMPs) oder Komponenten des Komplementsystems (Sina et al., 2018; White et al., 1995). AMPs sind z.B. in der Lage, das Wachstum von Bakterien zu stören (White et al., 1995). Sie werden im Dünndarm u. a. von Paneth-Zellen produziert (Zaslouff, 2002). Im Dickdarm, wo in der Regel keine Paneth-Zellen vorkommen, bilden Enterozyten antimikrobielle Substanzen. Sie sezernieren beispielsweise kontinuierlich HBD1, Cathelicidin und S100-Protein und verhindern so die bakterielle Invasion. Im Falle von Infektionen kommt es zur Induktion von HBD2 und HBD3, wodurch ein zusätzlicher Schutz besteht (Stange, 2015). Eine Untergruppe der AMPs sind die sogenannten Defensine, die meist über eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur verfügen. Sie sind etwa 30-40 Aminosäuren lang und werden von drei Disulfidbrücken stabilisiert (Bevins and Salzman, 2011; White et al., 1995). Anhand des strukturellen Aufbaus dieser (vgl. Lehrer and Ganz, 2002) unterscheidet man humane  $\alpha$ -Defensine (HD) und  $\beta$ -Defensine (HBD) (Coretti et al., 2017). Neben Defensinen sezernieren Paneth-Zellen noch weitere AMPs, wie z.B. Lysozym, „*regenerating islet-derived 3 gamma*“ (RegIII $\gamma$ ) und die Phospholipase A2 (sPLA2) (Wehkamp and Stange, 2010). Allerdings werden die  $\alpha$ -Defensine durch Paneth-Zellen etwa um das 100-Fache höher exprimiert (Wehkamp et al., 2006).

#### 1.2.2.1 alpha-Defensine

Im Menschen werden sechs  $\alpha$ -Defensine unterschieden. Die humanen neutrophilen Peptide 1-4 (HNP1-4, auch: „HD1-4“), die von Neutrophilen Granulozyten (NGs) gebildet werden und die humanen Defensine 5 und 6 (HD5, HD6), die von Paneth-Zellen der Dünndarmkrypten exprimiert werden (Jones and Bevins, 1992; Ouellette et al., 1989). Paneth-Zellen produzieren und sezernieren  $\alpha$ -Defensine in Folge bakterieller Stimulation (Ayabe et al., 2000). Die Expression von HD5 und HD6 durch Paneth-Zellen ist daher je nach ihrer Lokalisation im Dünndarm unterschiedlich stark. Ihr Maximum liegt im

terminalen Ileum, dort wo die Refluxrate von Bakterien aus dem Kolon am höchsten ist (Darmoul and Ouellette, 1996; Elphick and Mahida, 2005). Paneth-Zellen exprimieren HD5 jedoch nur in seiner inaktiven Vorläuferform, während die Prozession in die aktive Form erst nach der Sekretion in das Kryptenlumen stattfindet (Dipankar Ghosh et al., 2002). Die  $\alpha$ -Defensine zeichnen sich funktionell durch ihre antimikrobielle Wirkung aus. Diese richtet sich gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, einige Pilze, *Spirocheten*, Protozoen und Viren (Ouellette, 2011). Somit nehmen sie Einfluss auf die Dichte und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota (Salzman et al., 2010). HD5 fügt Mikroporen in die bakterielle Zellmembran ein und führt somit zur Zerstörung der Bakterienzelle (Zhang et al., 2010). HD6-Moleküle sind in der Lage, Bakterien einzufangen, indem sie Nanonetze bilden. So verhindern sie deren Invasion in die Darmmukosa (Chairatana and Nolan, 2014; Chu et al., 2012; Schroeder et al., 2014).

### **1.2.2.2 beta-Defensine**

Es wurden bereits drei humane  $\beta$ -Defensine (HBD1-3) isoliert und auf Proteinebene näher strukturell und funktionell charakterisiert. Zudem wurde die Expression eines weiteren  $\beta$ -Defensins (HBD4) gemessen (Selsted and Ouellette, 2005). Die Expression der  $\beta$ -Defensine erfolgt durch Epithelzellen und Leukozyten. Diese exprimieren HBD1-4 – wie im Falle von HBD1 – teils kontinuierlich sowie zum Teil auch nach Induktion (Selsted and Ouellette, 2005). So wird HBD2 z.B. nach Stimulation durch Mikroorganismen oder Cytokinen, wie Interleukin 1 (IL-1) oder Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), exprimiert. HBD3 wird ebenfalls nach Induktion durch Mikroorganismen produziert und zeigt eine breite antimikrobielle Aktivität, die sich auch gegen multiresistente Bakterien richtet (Harder et al., 2001).

### **1.2.3 Erkennung bakterieller Bestandteile im Darm**

Ein weiteres chemisches Element der angeborenen Immunantwort sind „*Pattern-Recognition*“-Rezeptoren (PRRs). Diese erkennen Pathogene anhand von charakteristischen Merkmalen, den sogenannten „Pathogen-assoziierten

molekularen Mustern“ (PAMPs). Zu PAMPs zählen rein mikrobielle Strukturen, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykan (Elphick and Mahida, 2005; Medzhitov and Janeway, 2002). Die Bindung von PAMPs an PRRs aktiviert Transkriptionsfaktoren und induziert so die Expression von Genen, welche in Entzündungs- und Immunreaktionen involviert sind. Dies bewirkt die Sekretion von Chemokinen, welche wiederum die Rekrutierung von zellulären Komponenten der angeborenen Immunantwort veranlassen (Inohara et al., 2000). Zwei große Klassen von PRRs in Säugetieren sind „*Toll-like*“-Rezeptoren (TLRs) und „*NOD-like*“-Rezeptoren (Philpott and Girardin, 2004).

### 1.2.3.1. NOD-Proteine und NOD2-Mutation

Die „*nucleotide-binding oligomerization domain-like*“ Proteine NOD1 und NOD2 bilden ein intrazelluläres Pathogen-Erkennungs-System. NOD1 erkennt Muramyltripeptide spezifisch von gram-negativen Bakterien (Girardin et al., 2003a), während NOD2 unspezifische Muramyl-dipeptide erkennt (Girardin et al., 2003b). Die Aktivierung von NOD1 und NOD2 setzt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. Der am besten erforschte Interaktionspartner ist das „*receptor-interacting protein 2*“ (RIP2). Es führt über die Aktivierung weiterer Komponenten, wie dem „*mitogen-activated protein*“ (MAP)-Kinase-Weg und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, zur Aktivierung von Genen, welche in Entzündungs- und Immunreaktionen involviert sind (Boyle et al., 2014; Philpott and Girardin, 2004). NOD2 wird nicht nur von Dendritischen Zellen (Gutierrez et al., 2002) und Monozyten (Ogura et al., 2001b) exprimiert, sondern auch von den Paneth-Zellen (Lala et al., 2003).

Für das Gleichgewicht zwischen dem Wirtsorganismus und der intestinalen Mikrobiota ist eine konstitutive Aktivierung der NOD-Kaskade auf niedrigem Niveau unabdingbar. Bei Morbus Crohn (MC) ist dieser Stoffwechselweg teilweise gestört (Stange, 2015). Studien haben gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen drei Mutationen in den Genen von NOD2, den Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) SNP8, SNP12 und SNP13 und der Entstehung von MC des Ileums gibt. Dies ist vor allem bei der Frameshift-Mutation SNP13 der Fall, die durch eine Cytosin-Insertion (3020insC) zur

Ausbildung eines Stop-Codons führt. In der Folge kommt es zur Ausbildung einer trunkierten Rezeptorversion, bei der die „*Leucine-rich Repeats*“ (LRR)-Domäne des NOD2-Proteins betroffen ist (Economou et al., 2004; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001a). Hierdurch ist die Erkennung von PAMPs wie LPS und Peptidoglykan durch die Paneth-Zellen gestört (Bonen et al., 2003; Ogura et al., 2003). Neben der gestörten Bildung von antimikrobiellen Effektormolekülen, scheint eine NOD-Mutation auch eine Rolle in der Dysbiose bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) zu spielen. Studien zeigten, dass eine NOD2-Defizienz in Mäusen eine veränderte Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota verursachte (Al Nabhani et al., 2016; Couturier-Maillard et al., 2013; Rehman et al., 2011).

### **1.3 Die Rolle der Paneth-Zelle in der antimikrobiellen Abwehr**

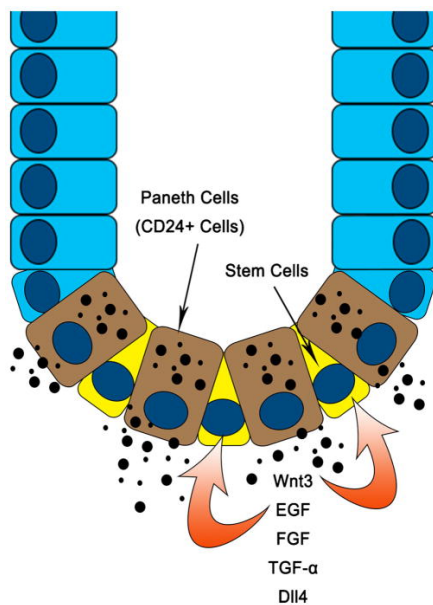
Die Paneth-Zellen wurden erstmals von Gustav Schwalbe (1872) und Josef Paneth (1988) beschrieben. Sie identifizierten mit Granula gefüllte Zellen, die an der Basis der Lieberkühn-Krypten des Dünndarms lokalisiert waren. Im Verlauf des Dünndarms nimmt ihre Dichte nach distal zu (Peterson and Artis, 2014). Nach Entdeckung von Lysozym in den Granula durch Deckx *et al* (1967) und Defensinen durch Ouellette *et al* (1989) lag die Vermutung nahe, dass Paneth-Zellen eine Rolle in der angeborenen Abwehr des Wirtsorganismus spielen. Zusätzlich sind Paneth-Zellen im Dünndarm an der Regulation der intestinalen Stammzellen in ihrer Umgebung beteiligt (Sato et al., 2011) und beeinflussen die Morphologie der Krypt-Villus-Architektur (Langlands et al., 2016).

#### **1.3.1 Regulation der Stammzellnische durch Paneth-Zellen**

Die Paneth-Zellen befinden sich angrenzend zu den intestinalen „*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*“ (LGR5)-positiven Stammzellen (Abbildung 4), die die ständige Erneuerung des intestinalen Epithels ermöglichen (Marshman et al., 2002; Wehkamp and Stange, 2010). Abkömmlinge dieser Zellen wandern von der Stammzellzone aus nach oben an die Spitze der Villi und differenzieren sich zu Becherzellen, Mikrovilli-tragenden



„Bürstenzellen“, Enteroendokrinen Zellen und Enterozyten aus. Im Gegensatz dazu wandern Paneth-Zellen nach unten zur Kryptenbasis und bleiben somit in Stammzellnähe. Der wichtigste Signalweg zur Vermittlung der Proliferation und Differenzierung des Darmepithels ist der Wnt-Signalweg. Er wird durch das Binden von Wnt-Liganden an den Wnt-Liganden-Rezeptor Lgr-5 auf den Stammzellen in Gang gesetzt (Wehkamp and Stange, 2010). Zum Erhalt der Stammzellen müssen vier Signale vorhanden sein: der Wnt-Agonist bzw. Lgr5-Ligand R-Spondin1, der epitheliale Wachstumsfaktor EGF, aktive Notch-Signale und die Inhibition des „bone morphogenetic protein“ (BMP)-Signalwegs durch Noggin (Clevers and Bevins, 2013). Sato *et al* (2011) konnten zeigen, dass Paneth-Zellen hohe Spiegel an EGF, „Transforming growth factor alpha“



**Abbildung 4: Stammzellregulation durch Paneth-Zellen im Dünndarm**

Mit Genehmigung von Springer Nature, Journal of Gastrointestinal Surgery, The Colon Cancer Stem Cell Microenvironment Holds Keys to Future Cancer Therapy, Chen and Huang, 2014

(TGF $\alpha$ ), dem Wnt-Liganden Wnt3 und dem Notch-Liganden Dll4 bilden und somit zum Erhalt der Stammzellen beitragen (Abbildung 4). Dabei werden nur die Zellen von den Paneth-Zell-Signalen erreicht, die direkt benachbart zu den Paneth-Zellen liegen. „Short range Wnt 1“ aus Paneth-Zellen wird noch durch R-spondin1 lokal verstärkt, das überall exprimiert wird, aber ohne Wnt inaktiv ist. Somit konkurrieren die aus den Stammzellen entstehenden „Tochter-Zellen“ miteinander um verfügbare Paneth-Zell-Flächen. Da ein zu stark aktivierter Wnt-Signalweg mit der Entstehung von Karzinomen in Verbindung steht, muss neben den Stammzell-Zahlen auch die Anzahl der Paneth-Zellen streng reguliert werden (Clevers and Bevins, 2013).

### 1.3.2 Paneth-Zell-Metaplasie

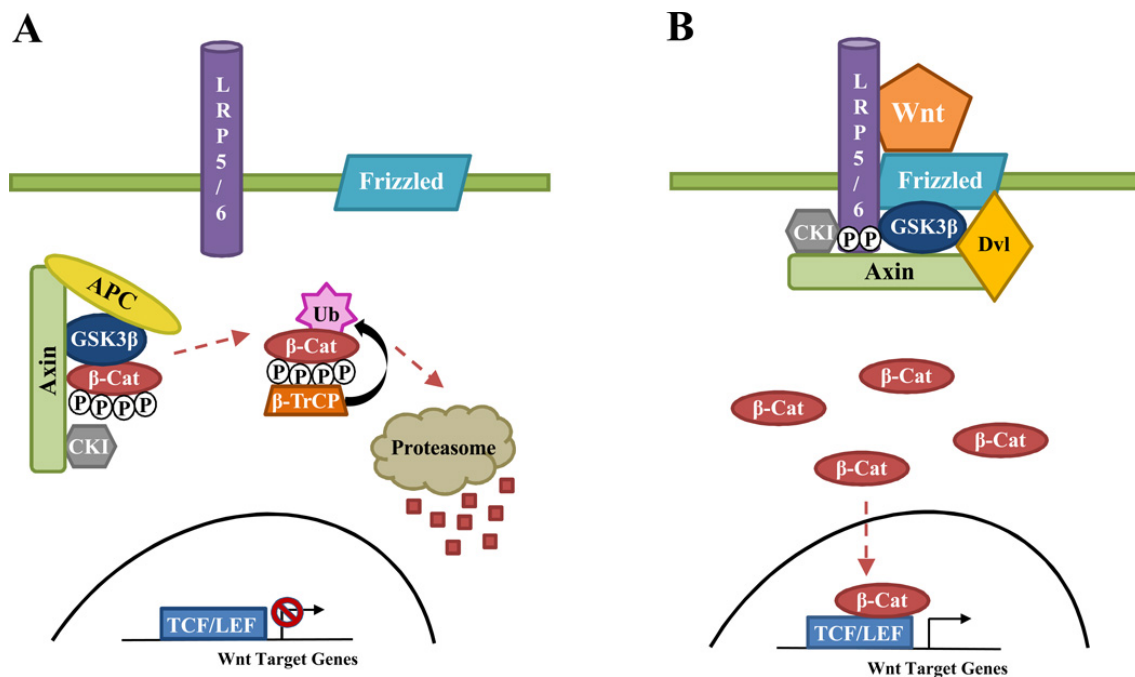
Das Vorkommen eines differenzierten Zelltyps an einem Ort, an dem dieser normalerweise histomorphologisch nicht zu finden ist, bezeichnet man als Metaplasie (Gassler, 2017). Im Zuge chronischer Entzündungen treten metaplastische Paneth-Zellen z.B. im entzündeten Kolon von Erwachsenen (Cunliffe et al., 2001; Fahlgren et al., 2003; Wehkamp et al., 2002) und Neugeborenen (Puiman et al., 2011) auf. Dort sind sie vor allem in der Kryptenregion lokalisiert und erinnern morphologisch an die Paneth-Zellen des Dünndarms (Cunliffe et al., 2001). Zudem kommen metaplastische Paneth-Zellen im entzündeten Ösophagus (Shen et al., 2005) oder, bei einer Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori*, im Magen (Tanabe et al., 2008) vor. Metaplastische Paneth-Zellen wurden auch schon in extraintestinalen Geweben wie der Lunge und dem Tracheobronchialsystem, dem Urogenitaltrakt oder dem Nasopharynx gefunden (Gassler, 2017). Wie genau es zur Entstehung der Paneth-Zell-Metaplasie kommt und welche genaue Funktion metaplastische Paneth-Zellen im Kolon haben, ist allerdings noch unklar.

### 1.4 Der Wnt-Signalweg

„*Wingless-related integration site*“ (Wnt)-Gene und Komponenten des Wnt-Signalwegs spielen eine zentrale Rolle bei der Embryogenese (Cadigan and Nusse, 1997). Sie vermitteln die Proliferation und Differenzierung von Zellen und werden auch mit der Entstehung von Krankheiten – insbesondere der Krebsentstehung – in Verbindung gebracht (Nusse and Varmus, 2012). Heute sind 19 Wnt-Gene im Menschen bekannt, die für die sekretierten Wnt-Proteine kodieren (Nusse, 2001). Wnt-Liganden werden von sekretorischen Zellen abgegeben und lösen an der Zielzelle zwei unterschiedliche Signalwege aus. Zum einen gibt es den nicht-kanonischen Signalweg, welcher unabhängig von  $\beta$ -Catenin aktiviert wird, und zum anderen den besser erforschten kanonischen Signalweg, welcher durch  $\beta$ -Catenin aktiviert wird (Bernard et al., 2008; Gordon and Nusse, 2006). Entsprechend ihrer Aktivierung des jeweiligen Wnt-Signalwegs, wurden die Wnt-Liganden als kanonisch – z.B. Wnt1 oder Wnt3a - oder als nicht-kanonisch klassifiziert (Bernard et al., 2008; Niehrs, 2012).

### 1.4.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Im kanonischen Signalweg binden Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled (Fz) und seinen Co-Rezeptor „*low-density lipoprotein receptor-related protein*“ (LRP), die auf der Oberfläche der Zielzelle einen Komplex bilden. Der Rezeptor gibt daraufhin ein Signal an einen intrazellulären Proteinkomplex (Abbildung 5). Während der Wnt-Signalweg inaktiv ist, ist  $\beta$ -Catenin in diesem sog. „*Destruction-Komplex*“ gebunden, welcher dann im Proteasom abgebaut wird (Abbildung 5A). Neben  $\beta$ -Catenin besteht der Komplex aus den Proteinen Dishevelled (Dvl), der Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), Axin und dem Adenomatösen-Polyposis-Coli (APC)-Protein (Abbildung 5). Durch Aktivierung der Wnt-Signalkaskade wird der *Destruction-Komplex* inhibiert (Abbildung 5B). Infolge wird  $\beta$ -Catenin frei und kann im Zellkern die Transkription verschiedener Gene aktivieren (Logan and Nusse, 2004).



**Abbildung 5: Der kanonische Wnt-Signalweg in (A) inaktiver und (B) aktiver Form**

(A) Inaktiver Signalweg: Keine Wnt-Liganden binden, daher ist  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat) an den „*Destruction-Komplex*“ aus APC, Axin, GSK-3 $\beta$  und Dishevelled (Dvl) gebunden. Dieser wird im Proteasom abgebaut und es kann keine Transkription von „*Wnt Target Genes*“ erfolgen. (B) Aktiver Signalweg: Wnt-Liganden binden an den Rezeptorkomplex aus Frizzled und LRP. Als Folge wird  $\beta$ -Catenin frei und aktiviert im Zellkern die Transkription von „*Wnt Target Genes*“. Mit Genehmigung von Elsevier, reprinted from Elsevier, Brain Research, 1514, Scott and Brann, 2013, Estrogen regulation of Dkk1 and Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in neurodegenerative disease, p. 63-74, 2013

### 1.4.2 Der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Defensin-Expression

Wnt-Signale sind für die Differenzierung und Reifung der Paneth-Zellen essentiell. So beeinflusst der Wnt-Signalweg die Expression von  $\alpha$ -Defensinen durch die Paneth-Zellen (Armbruster et al., 2017; Es et al., 2005). Bei der Aktivierung des Wnt-Mechanismus durch Wnt-Liganden wandert  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wo es mit dem Wnt-Transkriptionsfaktor „*Transcription factor 4*“ (TCF4) interagiert. Der  $\beta$ -Catenin-TCF4-Komplex bindet an die Kern-DNA in der Promotorregion von HD5 und HD6 und kann so deren Expression induzieren (Bernard et al., 2008; Coretti et al., 2017). Im Pathomechanismus von MC mit Ileumbefall kommt es in diesem Zusammenhang - unabhängig vom NOD2-Genotyp - bei einer reduzierten TCF4-Expression zu einer reduzierten  $\alpha$ -Defensin-Expression (Wehkamp et al., 2007). Beisner *et al* (2014) haben festgestellt, dass der „*Transcription factor 1*“ (TCF1) auf diese Weise ebenfalls die Defensin-Expression beeinflusst. Zudem wird eine Mutation in dem Gen für das „*low-density lipoprotein receptor-related protein 6*“ (LRP6-Protein) mit MC mit Ileumbefall in Verbindung gebracht. LRP6 ist eine weitere Komponente der Wnt-Signalkaskade und als Wnt-Co-Rezeptor für die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma verantwortlich (Koslowski et al., 2012). Courth *et al* (2015) konnten außerdem zeigen, dass bei MC mit Ileumbefall die Produktion von Wnt-Liganden durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) ebenfalls beeinträchtigt ist. Normalerweise sind PBMCs – zusätzlich zu den Paneth-Zellen - in der Lage, über die Expression von Wnt-Liganden die Defensin-Expression in der Paneth-Zelle zu induzieren (Courth et al., 2015).

### 1.4.3 Die Rolle des Wnt-Signalweges in der Karzinogenese

Eine dauerhafte Aktivierung der Wnt-Signalkaskade führt zur Entstehung von Karzinomen (Sun et al., 2013). Dies wird z.B. durch Mutationen in Genen verursacht, die in die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade involviert sind. So wurden in den meisten sporadischen, d. h. genetisch nicht determinierten (Junginger et al., 2002) Kolonkarzinomen, Mutationen in Inhibitoren des Wnt-Signalwegs entdeckt (Giles et al., 2003; Liu et al., 2000; Morin et al., 1997). Mutationen in der Wnt-Signalkaskade führen neben der Entstehung von CRC

auch zu weiteren Erkrankungen, wie z.B. Karzinomen des oberen GI-Traktes oder Melanomen (Giles et al., 2003).

### **1.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen - Störung der Barriere**

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CEDs) sind durch chronische und schubförmig wiederkehrende Entzündungen in der Schleimhaut des GI-Traktes charakterisiert. Die zwei häufigsten Entitäten der CEDs sind Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU). Trotz vielerlei Studien sind die Ursachen und die genaue Krankheitsentstehung der CEDs noch nicht vollständig geklärt. Bei jedem Individuum spielen hierbei genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und immunologische Mechanismen in unterschiedlichem Maße eine Rolle (Podolsky, 2002). Eine typische genetische Risikovariante für MC liegt beispielsweise im NOD2-Gen (Wehkamp et al., 2004, p. 2). Bei CEDs kommt es zu einer übermäßigen und ständigen Immunreaktion gegenüber residenten intestinalen Mikroorganismen, die normalerweise vom Immunsystem toleriert werden (Duchmann et al., 1999). Es wird angenommen, dass dies primär durch Defekte der epithelialen Barriere und des Immunsystems der Mukosa bedingt ist. Somit können Bakterien ungehindert in die Darmschleimhaut eindringen, worauf das Immunsystem reagiert. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion in der Schleimhaut des GI-Traktes. Obwohl sich diese Abwehrreaktion in erster Linie gegen körperfremde Organismen richtet, nimmt dabei auch das körpereigene Gewebe Schaden (Wehkamp et al., 2005a).

#### **1.4.1 Morbus Crohn**

Das Befallsmuster von MC reicht vom Mund bis zum Anus und kann somit den kompletten GI-Trakt betreffen. Am häufigsten manifestiert sich MC jedoch im terminalen Ileum, wohingegen nur in 10-20% der Fälle allein das Kolon befallen ist. Anhand der Befallslokalisierung und weiterer Komponenten wurde die Montreal-Klassifikation entwickelt, um individuelle Unterschiede in der Symptomatik und dem Verlauf der Erkrankung zu berücksichtigen. Nach der Lokalisation des Befalls unterscheidet man zwischen: L1: Ileum; L2: Kolon; L3: Ileum und Kolon; L4: nur oberer GI-Trakt (Silverberg et al., 2005).

Bei MC zeigen sich makroskopisch diskontinuierliche Schleimhautläsionen. Die Entzündung kann die kompletten Wandschichten des GI-Traktes befallen und sogar bis in die Tiefe der *Tunica muscularis propria* reichen. Häufig kommt es zur Ausbildung von Abszessen, Fisteln und Fissuren, die in der Folge zu narbigen Veränderungen der Darmwand mit Strikturen und Obstruktionen führen können. Histologisch finden sich gelegentlich Granulome und metaplastische Paneth-Zellen (Stange, 2015).

### **1.4.1.1 Morbus Crohn mit Ileumbefall**

Der klinische Phänotyp L1, d. h. MC mit Ileumbefall, geht mit verschiedenen Paneth-Zell-Defekten einher. Eine Assoziation zwischen MC und Defekten im NOD2-Gen, welches von Paneth-Zellen exprimiert wird, wurde bereits von Lala *et al* (2003) beschrieben. Zudem führen Defekte im Wnt-Signalweg zu einer gestörten Paneth-Zell-Differenzierung und einer verminderten Expression der  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 (Beisner *et al.*, 2014; Koslowski *et al.*, 2009; Wehkamp *et al.*, 2007). Da Paneth-Zellen eine deutlich längere Lebenszeit haben als andere intestinale Epithelzellen, können aggregierte Proteine und geschädigte Organellen nicht einfach während der Replikation beseitigt werden. Daher verfügen sie über den Mechanismus der Autophagie, der dem Recycling intrazellulärer Komponenten via Autodigestion dient. Bei CEDs konnte ein Defekt im Autophagie-vermittelnden Protein „*autophagy-related 16-like 1 gene*“ (Atg16L1) entdeckt werden, wodurch die Exozytose von Paneth-Zell-Granula gestört ist (Cadwell *et al.*, 2008; Hampe *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurden Mutationen im Transkriptionsfaktor XBP1 gefunden, welcher für die Paneth-Zellen ein wichtiges Schlüsselement im Gegenmechanismus zu Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER) darstellt. In der Folge kommt es zur Induktion von Entzündungsreaktionen und somit zur Anfälligkeit für CEDs (Kaser *et al.*, 2008, p. 1).

### **1.4.1.2 Morbus Crohn mit Kolonbefall**

Dem MC mit Kolonbefall liegen vermutlich andere Pathomechanismen zu Grunde als dem MC mit Ileumbefall. Hierzu gibt es jedoch deutlich weniger

Erkenntnisse. Bereits bekannt sind die metaplastischen Paneth-Zellen in der Kolonmukosa. Diese exprimieren die  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6, die im gesunden Kolon nicht vorkommen (Cunliffe et al., 2001; Wehkamp et al., 2002). Wie auch bei MC mit Ileumbefall ist bei MC mit Kolonbefall die Verteidigung gegenüber der kommensalen Mikrobiota gestört (Nuding et al., 2007). Hier scheinen ebenfalls Defekte in antimikrobiellen Effektormolekülen eine Rolle zu spielen. So ist bei manchen Patienten mit CEDs die Bildung eines mukosalen Redoxenzym gestört, welches für die Aktivierung von HBD1 benötigt wird (Jaeger et al., 2013). Zudem kommt es bei MC-Patienten zu einer verminderten Induktion von HBD2, HBD3 (Wehkamp et al., 2003) und Cathelicidin LL37 (Schauber et al., 2006).

### **1.5 Maligne Erkrankungen des Darmes**

Kolorektale Karzinome (CRCs) sind der dritthäufigste maligne Tumor des Menschen. Geographische Unterschiede in der CRC-Inzidenz lassen darauf schließen, dass Umweltfaktoren bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen (Saleh and Trinchieri, 2011). Vogelstein *et al* (1988) konnten zeigen, dass sporadische CRCs zum größten Teil in einem mehrstufigen Prozess aus genetischen Mutationen entstehen. Dieser wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet. Des Weiteren sind auch „*loss-of-heterozygoty of microsatellitemarkers*“ (LOH-MS) oder Replikationsfehler an der Entstehung von CRCs beteiligt (Senba et al., 1998; Thibodeau et al., 1993). Darüber hinaus wirken hereditäre Komponenten bei der Karzinogenese mit (Valle, 2014).

#### **1.5.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Krebs**

Als Konsequenz von chronischen Entzündungen kommt es häufig zur Karzinogenese. Daher haben CED-Patienten ein erhöhtes Risiko, CRCs zu entwickeln (Eaden et al., 2001; Roon et al., 2007). Die Karzinogenese bei CEDs erfolgt hauptsächlich auf dem Boden gutartiger Vorstufen in den Schritten Entzündung, Regeneration und Neoplasie. Karzinome bei CEDs zeigen jedoch im Unterschied zu sporadischen CRCs frühere und häufigere p53-Mutationen und haben nur selten eine Mikrosatelliteninstabilität. Daher wird

davon ausgegangen, dass sie auf dem Boden mehrerer Mutationen entstehen (Klöppel et al., 2013; Stange, 2015). Ein früher Krankheitsbeginn, die Dauer der Erkrankung und die Ausdehnung des Kolonbefalls erhöhen im Allgemeinen das Risiko für ein CRC (Bansal and Sonnenberg, 1996; Beaugerie et al., 2013). CED-Patienten, die zusätzlich unter der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) leiden, haben zudem ein höheres Risiko für die Krebsentstehung (Razumilava et al., 2011; Torres et al., 2011). Generell haben Patienten mit CU im Vergleich zu MC-Patienten ein höheres Risiko ein CRC zu entwickeln. Patienten mit MC zeigen gegenüber der Normalbevölkerung ein etwa 6-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Dünndarmkarzinoms (Stange, 2015).

### **1.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit**

Im Dünndarm sezernieren Paneth-Zellen  $\alpha$ -Defensine und Wnt-Liganden, weshalb sie dort eine große Rolle in der antimikrobiellen Verteidigung und in der Stammzellregulation spielen (Jones and Bevins, 1992; Sato et al., 2011). MC des Ileums ist mit verschiedenen Paneth-Zell-Defekten assoziiert (Wehkamp and Stange, 2010) und so konnte bereits gezeigt werden, dass bei MC mit Ileumbefall weniger  $\alpha$ -Defensine gebildet werden, wodurch die körpereigene Barrierefunktion gestört ist. Somit ist das Eindringen von Bakterien in die Darmschleimhaut deutlich erleichtert (Wehkamp et al., 2007). Dagegen gibt es wenige Erkenntnisse über die Pathomechanismen bei MC mit Kolonbefall. Im gesunden Kolon kommen normalerweise keine Paneth-Zellen vor, jedoch treten sie bei chronischen Entzündungen auch an anderen Orten in Form von metaplastischen Paneth-Zellen auf. Dies ist bereits bei MC mit Kolonbefall (Cunliffe et al., 2001) oder in kolorektalen Adenomen und Karzinomen (Mothes et al., 2010; Wada et al., 1992) gezeigt. Weshalb metaplastische Paneth-Zellen bei CEDs im Kolon entstehen und inwieweit sie an der Entstehung von CRCs beteiligt sein könnten ist noch unklar. Daher ist das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, wie die metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon durch die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden und Wnt-Liganden auf ihre Umgebung einwirken und welche Rolle sie bei MC mit Kolonbefall spielen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Im Folgenden nicht genannte Materialien sind Teil der Standardausstattung eines Labors.

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Jenway Spektrophotometer 7300	Jenway, USA
Light Cycler <sup>®</sup> 480	Roche, DE
Mastercycler gradient	Eppendorf, DE
Nanodrop 2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, DE

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Multiwell Plate 96 (Light Cycler <sup>®</sup> 480)	Sarstedt, DE
Reaktionsgefäße (DNase-, RNasefrei) 0,6 ml	Biozym Scientific GmbH, DE
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> plus	Thermo Fischer Scientific, USA

#### 2.1.3 Chemikalien, Antikörper und Kits

##### 2.1.3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Invitrogen AG, USA
Agarose NEEO Roti <sup>®</sup> garose	Roth, DE
Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Bacto <sup>™</sup> Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto <sup>™</sup> Tryptic Soy Broth	Becton Dickinson, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA

## 2. Material und Methoden

Dampfgarpuffer pH6, S1699	Dako, DK
Dampfgarpuffer pH9, S2367	Dako, DK
Difco™ Luria Bertani Broth	Becton Dickinson, USA
EDTA	Roth, DE
Ethanol absolute (100 %)	VWR International GmbH, DE
Ethanol (96 %)	VWR International GmbH, DE
Ethanol (70 %)	VWR International GmbH, DE
Ethidiumbromid Lösung (0,025 %)	Roth, DE
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II (25 %), 105175	Merck KGaA, DE
Isopropanol (99,7 %)	VWR International GmbH, DE
Neo-Clear®	Merck KGaA, DE
Neo-Mount®	Merck KGaA, DE
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, DE
Peroxidase-Blocking Solution, S2023	Dako, DK
Saccharose	Roth, DE
TRIS Hydrochlorid, PUFFERAN® ≥ 99 %, p.a.	Roth, DE
TRIzol	Life Technologies, USA
Tween 20	Merck KGaA, DE
X-Gal	Roth, DE
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, USA

### 2.1.3.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti DEFA5 Antikörper, HPA015775	Sigma-Aldrich, DE
Anti DEFA6 Antikörper, NBP1-84281	Novus Biologicals, USA

### 2.1.3.3 Enzyme und Kits

Enzym, Kit	Hersteller
AMV Reverse Transkriptase Kit	Promega, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+	Dako, DK
Direct-zol™ RNA MiniPrep	Zymo Research Corp, DE
dNTP Mix, PCR Grade	Qiagen, DE
EcoR1-HF® Restriktionsenzym	New England Biolabs, USA
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, DE
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit	Roche, DE
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, DE
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, DE
Quick-RNA™ MiniPrep	Zymo Research Corp, DE
Topo® TA Cloning® Kit	Invitrogen AG, USA

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

#### 2.1.4.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium	Menge (1x)
Difco™ Luria Bertani Broth	25 g
H <sub>2</sub> O	250 ml

TSB-Medium	Menge (1x)
Bacto™ Tryptic Soy Broth	30 g
H <sub>2</sub> O	1 l

2.1.4.2 Sonstige Lösungen

<b>Agarosegel (1%; 1,5%)</b>	Menge (1x), aufkochen und bis auf 50 °C abkühlen lassen
Agarose	1 g bzw. 1,5 g
TAE	100 ml
Ethidiumbromid	3 Tropfen

<b>Bromphenolblau/Xylencyanol-Probenpuffer</b>	Menge (1x)
Bromphenolblau/Xylencyanol	0,25 g
Saccharose	40 g
H <sub>2</sub> O	50 ml

<b>PBS ("Phosphate-buffered saline")</b>	Menge (10x)
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
H <sub>2</sub> O	1 l

<b>TAE (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)</b>	Menge (50x)
Essigsäure	57,1 g
0,5 M EDTA ph8	100 ml
TRIS HCl	242 g
H <sub>2</sub> O	Auf 1 l auffüllen

<b>TBS ("Tris-buffered saline")</b>	Menge (10x)
NaCl	400 g
KCl	10 g

TRIS-Base	150 g
HCl	Auf pH 7,4 einstellen
H <sub>2</sub> O	Auf 5 l auffüllen

<b>TBS-T</b> (“ <i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> ”)	Menge (1x)
10 x TBS	500 ml
50 % Tween 20	10 ml
H <sub>2</sub> O	5 l

### 2.1.5 Bakterien

Für die RNA-Extraktion aus Bakterien wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 und *E. coli* MC1000 verwendet (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Verwendete Bakterienstämme für die Extraktion von bakterieller RNA

Bakterium	Quelle
<i>E. coli</i> K12 DSM489	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Braunschweig, Deutschland (DSMZ)
<i>E. coli</i> MC1000	De Duve Institute, Université catholique de Louvain (UCL), Brüssel, Belgien

### 2.1.6 Primer und Plasmide

#### 2.1.6.1 Primer

Die mRNA-Sequenzen der humanen Gene, die für die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)-Analyse verwendet wurden, entstammen der „*Nucleotide*“-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Die dazugehörigen Oligonukleotid-Primer (siehe Tabelle 2) wurden von den Firmen Biomers.net, Eurofins Genomics und MWG-Biotech AG in Deutschland hergestellt. Nach Lieferung wurden sie in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Im Anschluss erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

## 2. Material und Methoden

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

Gen	Sense-Primer (5'-3')	Antisense-Primer (3'-5')	Hersteller
β-Actin	GCC AAC CGC GAG AAG ATG A	CAT CAC GAT GCC AGT GGT A	Biomers
HD5	GCC ATC CTT GCT GCC ATT C	AGA TTT CAC ACA CCC CGG AGA	Biomers
HD6	CCT CAC CAT CCT CAC TGC TGT TC	CCA TGA CAG TGC AGG TCC CAT A	Biomers
HPRT1	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GA	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	Eurofins
Lysozym for/rev2	GCT ACA GGG GAA TCA GCC TA	TGC TTC TGT CTC CAG CAT TG	Eurofins
Wnt1 for/rev4	CCG ATG GTG GGG TAT TGT GAA	TCC CCG GAT TTT GGC GTA TC	Eurofins
Wnt2 for/rev3	TAG TCG GGA ATC TGC CTT TG	AAA TGC CTT TGC TGT CCT TG	Eurofins
Wnt3 2se/as	ATG CCA CTG CAT CTT CCA CT	GTG CCC TAC TTG CAG GGT GT	Eurofins
Wnt3a for1/rev1	TTG TCC ACG CCA TTG CCT CA	AGA CAC CAT CCC ACC AAA CTC G	MWG- Biotech AG

Die mRNA-Sequenz für die qRT-PCR-Analyse des bakteriellen 16S rRNA Genes entstammt der „Nucleotide“-Datenbank des NCBI. Hierbei wurde auf das bakterielle 16S rRNA Gen von *E. coli* MC4100 zurückgegriffen (GenBank: X80732.1). Die Primer (siehe Tabelle 3) wurden mit Hilfe von NCBI/Primer-BLAST designt und detektieren eine 236 bp lange Sequenz (Position 665-881), die spezifisch für das 16S rRNA Gen war (negative „BLAST-Search“).

**Tabelle 3:** Verwendete Primer für die qRT-PCR-Analyse des bakteriellen 16S rRNA Genes

Gen	Sense-Primer (5'-3')	Antisense-Primer (3'-5')	Hersteller
<i>E. coli</i> MC4100 16S rRNA	TCCAGGTGTAGCG GTGAAAT	TGAGTTTTAACCTTGC GGCC	Eurofins

### **2.1.6.2 Plasmide**

Bei der qRT-PCR-Analyse wurden Plasmide als externe Standardreferenz verwendet, die den zu quantifizierenden DNA-Abschnitt enthielten. Ihre Herstellung erfolgte in der AG Wehkamp.

### **2.1.7 Patientenproben**

In der Arbeit wurden Biopsien aus der Mukosa von Ileum und Kolon von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und gesunden Kontrollen sowie Gewebeproben aus dem Tumorgewebe von Kolonkarzinompatienten (CRC-Patienten) verwendet. Diese wurden im Zuge der Defensinstudie IKP-259 entnommen. Ziel der Studie ist es, den Schutzmechanismus des menschlichen Organismus gegenüber Mikroorganismen zu untersuchen. Von 2001 bis 2015 wurde die Studie zunächst im Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart durchgeführt. Seit dem 23.02.2015 wird sie im Universitätsklinikum Tübingen weitergeführt. Die Ethikkommission der Universität Tübingen hat hierfür ein positives Ethikvotum abgegeben (Nr. 687/2012B01). Ebenso hat sie dem in dieser Arbeit untersuchten Teil der Studie zugestimmt. Zuvor erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Patienten bezüglich der wissenschaftlichen Verwendung des Gewebes und der klinischen Daten, auf deren Basis sie ihre Einwilligung gaben.

#### **2.1.7.1 Kollektiv: Ileum- und Kolonbiopsien**

Die Entnahme der Biopsien aus Ileum- bzw. Kolonmukosa erfolgte während endoskopischer Untersuchungen. Die Diagnosestellung für den jeweiligen Patienten wurde durch den aufklärenden Arzt nach klinischen, endoskopischen, radiologischen und pathomorphologischen Kriterien getroffen. Patienten mit MC wurden anhand der Montreal-Klassifikation nach der Lokalisation des Befalls in Phänotypen unterteilt: L1 – MC mit Ileumbefall, L2 – MC mit Kolonbefall, L3 – MC mit Ileum- und Kolonbefall. Für die qRT-PCR-Analyse von Paneth-Zell-Genen in Ileum- und Kolonbiopsien in dieser Arbeit wurden die Patienten zusätzlich nach dem Entzündungsstatus und dem NOD2-Status einzelnen Gruppen zugeteilt. Der genetische Status von NOD2 war zuvor von Dr.

## 2. Material und Methoden

Maureen Ostaff analysiert worden (vgl. Koslowski et al., 2012). Das Patientenkollektiv umfasst (Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7):

**Tabelle 4:** Ileum-Kollektiv (Patientenanzahl) für die qRT-PCR-Analyse von HD5 und HD6 im Ileum

Kontrollen: 30		Patienten mit Morbus Crohn: 65			
+	-	+		-	
<i>SNP13</i> -	NOD-	<i>SNP13</i> -		NOD-	
Mutation:	Mutation:	Mutation:		Mutation:	
3	27	17		48	
		entzündet:	nicht-entzündet:	entzündet:	nicht-entzündet:
		11	6	26	22
		L1: 3	L1: 3	L1: 13	L1: 7
		L3: 8	L2: 2	L3: 13	L2: 9
			L3: 1		L3: 6

**Tabelle 5:** Kolon-Kollektiv (Patientenanzahl) für die qRT-PCR-Analyse von HD5 und HD6 im Kolon

Kontrollen: 34		Patienten mit Morbus Crohn: 130			
+	-	+		-	
NOD-	NOD-	NOD-		NOD-	
Mutation:	Mutation:	Mutation:		Mutation:	
9	25	44		86	
		entzündet:	nicht-entzündet:	entzündet:	nicht-entzündet:
		18	26	33	53
		L2: 8	L1: 16	L2: 14	L1: 28
		L3: 10	L3: 10	L3: 19	L2: 10
					L3: 15



**Tabelle 6:** Selektierte Kolon-Biopsien (Patientenanzahl) für die qRT-PCR-Analyse von Wnt-Liganden und Lysozym

Kontrollen: 19		Patienten mit Morbus Crohn: 95			
+	-	+		-	
NOD-Mutation:	NOD-Mutation:	NOD-Mutation:		NOD-Mutation:	
9	10	38		57	
		entzündet:	nicht-entzündet:	entzündet:	nicht-entzündet:
		18	20	24	33
		L2: 8	L1: 10	L2: 13	L1: 11
		L3: 10	L3: 10	L3: 11	L2: 10
					L3: 12

**Tabelle 7:** Selektierte Kolon-Biopsien (Patientenanzahl) für die qRT-PCR-Analyse des bakteriellen 16S rRNA Genes von *E. coli* MC4100

Kontrollen: 10	Patienten mit Morbus Crohn: 34	
	Hohe HD5-, HD6-Expression im Kolon:	Niedrige HD5-, HD6-Expression im Kolon:
	22	12

### 2.1.7.2 Kolonkarzinom-Biopsien

Die Kolonkarzinomproben (Tabelle 8) wurden im Rahmen der Defensinstudie IKP-259 in Zusammenarbeit mit Dr. Julius Pochhammer am Marienhospital in Stuttgart gesammelt. Pro Patient wurden hierbei zwei ca. 0,5-1 cm<sup>3</sup> große Gewebestücke von Resttumorgewebe im Zuge einer Operation aus dem soliden proliferativen Randbereich des Tumors entnommen. Als Vergleichskontrolle diente das endoskopisch entnommene Kolongewebe aus dem o.g. Patientenkollektiv von gesunden Kontrollpersonen mit NOD2-Wildtyp.

**Tabelle 8:** CRC-Kollektiv (Patientenanzahl) für die qRT-PCR-Analyse von Paneth-Zell-Faktoren und Wnt-Liganden

Kontrollen (Kolonmukosa): 10	CRC-Patienten (Karzinomgewebe): 5
------------------------------	-----------------------------------

Nach Entnahme wurden die Karzinomproben in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit RNAlater gegeben. Anschließend erfolgte eine Zwischenlagerung im Kühlschrank bei 4 °C. Die direkte RNA-Isolation und Umschreibung der gewonnenen RNA in cDNA per Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion erfolgte von einem Mitarbeiter der AG Wehkamp.

### 2.1.8 Software

Programm	Hersteller
CorelDraw® X7	Corel Corporation, CA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc, USA
Light Cycler Software V.3.5	Roche, DE

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Nukleinsäuremethoden

#### 2.2.1.1 RNA-Isolation aus Darmbiopsien

Unmittelbar nach Entnahme wurden die Biopsien aus der Mukosa von Ileum und Kolon in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C im Stickstofftank gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll aus dem Direct-zol™ RNA MiniPrep-Kit (Zymo Research Corp). Dazu wurde jede Biopsie in einem Reaktionsgefäß zu einem Pulver zermörsert und mit TRI Reagent®, d. h. Trizol Reagenz, zu einer einheitlichen Mischung homogenisiert. Nach Zentrifugation befindet sich die RNA im flüssigen Überstand, während sich die DNA und Proteine in der unteren Phase befinden. Zur anschließenden Reinigung der RNA wurde der Überstand in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde dann nach Herstellerprotokoll mit Ethanol präzipitiert, mit Puffern gewaschen und schließlich mit Nuklease-freiem Wasser gespült. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte anschließend bei -80 °C.

### 2.2.1.2 RNA-Analytik

Die qualitative und quantitative Analyse der extrahierten RNA erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000 (Pepqlab). Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Absorptionsvermögen von UV-Licht der konstanten Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der RNA-Probe kann bewertet werden, indem man die Absorptionswerte bei den Wellenlängen von 260 nm und 230 nm bzw. 260 nm und 280 nm vergleicht. Von einer Reinheit der RNA ist auszugehen, wenn das Verhältnis der Absorption bei 260/230 nm bei Werten von etwa 1,8-2,2 und bei 260/280 nm bei Werten von ca. 1,8-2 liegt (Mülhardt, 2009, S.42-44). In diesem Fall wurde die RNA weiterverwendet.

### 2.2.1.3 cDNA-Synthese

Für die Expressionsanalyse von spezifischen Genen in Darmgewebe mit der qRT-PCR wurde die cDNA der jeweiligen Proben benötigt. Die cDNA-Synthese erfolgte über das Verfahren der Reverse-Transkriptase-PCR mit dem AMV Reverse Transkription System (Promega). Hierbei wurden pro Probe jeweils 500 ng RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 10,625 µl verdünnt und wie folgt im Thermocycler inkubiert (Tabelle 9):

**Tabelle 9:** Erster Inkubationsschritt im Thermocycler für die cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit (in Minuten)
70 °C	10
12 °C	∞

Anschließend wurde jede Probe mit einem Mastermix vermengt, der sich aus den für die Reaktion benötigten Komponenten zusammensetzte (Tabelle 10):

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Reagenzien für die cDNA-Synthese

Mastermix für 500 ng RNA	Menge (in µl)
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4
AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer	2
dNTP Mix 10 mM	2

Primer: Oligo (dT)	0,5
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5
AMV Reverse Transkriptase	0,375

Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt im Thermocycler (Tabelle 11):

**Tabelle 11:** Zweiter Inkubationsschritt im Thermocycler für die cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit (in Minuten)
42 °C	15
95 °C	5
12 °C	∞

Anschließend wurde jede Probe mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt, sodass für jede Probe 10 ng/µl RNA eingesetzt wurden.

### 2.2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten: Herstellung von Plasmiden

Um die unbekannte Menge an DNA in einer Probe mit Hilfe der qRT-PCR zu bestimmen, benötigt man eine Vergleichsprobe mit einer definierten DNA-Menge. Hierfür wurden Plasmide synthetisiert, die den gesuchten DNA-Abschnitt enthielten. Nachfolgend ist die Herstellung des Plasmidstandards für das bakterielle 16S rRNA Gen beschrieben.

#### **RNA-Isolation aus *E. coli* MC1000 und cDNA-Synthese**

Für die Herstellung eines externen Plasmidstandards wird eine cDNA-Probe benötigt, die den spezifischen DNA-Abschnitt höchstwahrscheinlich enthält (Mülhardt, 2009). Um Plasmidstandards für das bakterielle 16S rRNA Gen herstellen zu können, musste daher zunächst eine Probe mit bakterieller cDNA gewonnen werden. Dazu wurden *E. coli* MC1000 über Nacht in 10 ml TSB-Medium bei 37 °C kultiviert und nachfolgend in PBS-Puffer gewaschen, um das Medium zu entfernen. Durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm mit dem Spektralphotometer Jenway 7300 (Jenway) konnte die Bakterienkonzentration in der gewaschenen Bakteriensuspension ermittelt werden. Die Konzentration wurde dann auf  $5 \times 10^8$  CFU/ml eingestellt. Die

anschließende RNA-Extraktion erfolgte mit dem Quick-RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research Corp) nach Protokoll des Herstellers. Dabei wurden die Bakterien-Pellets mit Lyse-Puffer und 100%igem Ethanol versetzt. Es folgte eine Behandlung mit dem Enzym DNase, um DNA-Spuren zu beseitigen. Anschließend wurde die RNA mit mehreren Puffern gewaschen und zuletzt mit Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die qualitative und quantitative Analyse der RNA erfolgte im Anschluss mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000 (Peglab). Nachfolgend wurde die RNA durch die zuvor beschriebene Reverse-Transkriptase-PCR mit dem AMV Reverse Transkription System (Promega) in cDNA umgeschrieben. Für die spätere Expressionsanalyse des bakteriellen 16S rRNA Genes wurde zudem cDNA von *E. coli* K12 als Positivkontrolle hergestellt. Die Kultivierung und die anschließende RNA-Extraktion sowie die cDNA-Synthese erfolgten wie zuvor bei *E. coli* MC1000.

### HotStarTaq-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Herstellung des Plasmidstandards für das bakterielle 16S rRNA Gen wurde als Ausgangs-DNA die cDNA von *E. coli* MC1000 bezogen. Unter Verwendung der HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um den spezifischen DNA-Abschnitt der cDNA-Probe zu vervielfältigen. Der für die Reaktion benötigte Mastermix ergab sich wie folgt (Tabelle 12):

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der Reagenzien für die HotStarTaq-PCR

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

Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermocycler (Tabelle 13):

**Tabelle 13:** Zweiter Inkubationsschritt im Thermocycler für die HotStarTaq-PCR

Temperatur	Zeit (in Minuten)
95 °C	15
94 °C	1
59°C (Annealingtemperatur: 50-60 °C, abhängig von der Schmelztemperatur der Primer)	1
72 °C	1
72 °C	10
12 °C	∞

} 45 Zyklen

### Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe der PCR-Produkte (Amplikons) wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet und eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt. Das Agarosegel war zuvor mit Agarose, dem Elektrophoresepuffer TAE und dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angesetzt worden (Kapitel 2.1.4.2). Jede Probe wurde mit 2 µl Xylencyanol-Probenpuffer versetzt, der als Ladungspuffer diente. Auf Grund ihrer negativen Ladung ziehen Nukleinsäure-Moleküle bei Anlage eines elektrischen Feldes zum Pluspol. Somit können sie ihrer Länge nach aufgetrennt werden, wodurch ein charakteristisches Bandenmuster entsteht (Mülhardt, 2009). Mit Hilfe des DNA-bindenden Ethidiumbromids konnten die Banden anschließend bei UV-Belichtung sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit einem Größenmarker, konnte die Länge der Amplikons ermittelt werden. Dazu wurde eine DNA-„Ladder“ eingesetzt, die DNA-Fragmente im Abstand von 100 bp enthielt (Kapitel 2.1.3.1).

### DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde im Anschluss unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### **Transformation der DNA in TOP10 *E. coli***

Die Taq-Polymerase produziert in der PCR keine DNA-Fragmente mit glatten Enden, sondern Überhänge von einer Base, meist Adenosin (Hu, 1993). Um das DNA-Fragment mit einem Vektor ligieren zu können, wird daher meist ein Vektor mit Thymidin-Überhang gewählt. Man nennt die Methode daher auch TA-Klonierung (Mülhardt, 2009). Für die Klonierung wurde der pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> TA Vektor aus dem TOPO<sup>®</sup>-TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Nach Protokoll des TOPO<sup>®</sup>-TA Cloning Kits wurde der DNA-Abschnitt in den Vektor in eine Stelle kloniert, durch die das sogenannte „*LacZ*“ Gen inaktiviert wurde. Anschließend wurde der Vektor über Hitzeschock in Ampicillin-resistente OneShot<sup>®</sup> TOP10 *E. coli* überführt. Durch die Blockierung des *LacZ*' Gens war eine Selektion der Kolonien möglich, die den gewünschten Klon enthielten (Koenen et al., 1982; Mülhardt, 2009). Von der Suspension wurden 100 µl auf LB-Platten mit 40 µl Ampicillin (50 µg/ml) und 50 µl X-Gal (40 mg/ml) über Nacht bei 37 °C angezogen. Durch eine chemische Reaktion färbten sich diejenigen Bakterienkolonien mit Klonen ohne Insertion, d. h. bei aktivem *LacZ*' Gen, blau. Die Kolonien, die das Plasmid mit dem DNA-Abschnitt enthielten, blieben weiß. Daraufhin wurden Plasmid-enthaltende Kolonien ausgewählt und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (120 rpm) inkubiert.

### **Präparation der Plasmide**

Mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) wurden die Plasmide nach Herstellerprotokoll isoliert. Im Anschluss wurden sie mittels Restriktionsendonuklease-Verdau mit 1 µl Restriktionsenzym EcoR1-HF<sup>®</sup> und 2 µl CutSmart Puffer im finalen Volumen von 20 µl für 45 min bei 37 °C geschnitten. Daraufhin wurden die Produkte für 80 Minuten bei 100 V auf ein 1%iges Agarosegel gegeben. Als Ladungspuffer diente wieder Xylencyanol-Probenpuffer. Als Marker wurde neben einer 100 bp DNA-„*Ladder*“ auch eine 1 kb DNA-„*Ladder*“ eingesetzt, für die Bromphenolblau als Ladungspuffer diente. Schließlich folgte die Sequenzierung der Plasmide bei GATC Biotech, um die Sequenz des eingefügten DNA-Abschnitts zu überprüfen.

### 2.2.1.5 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

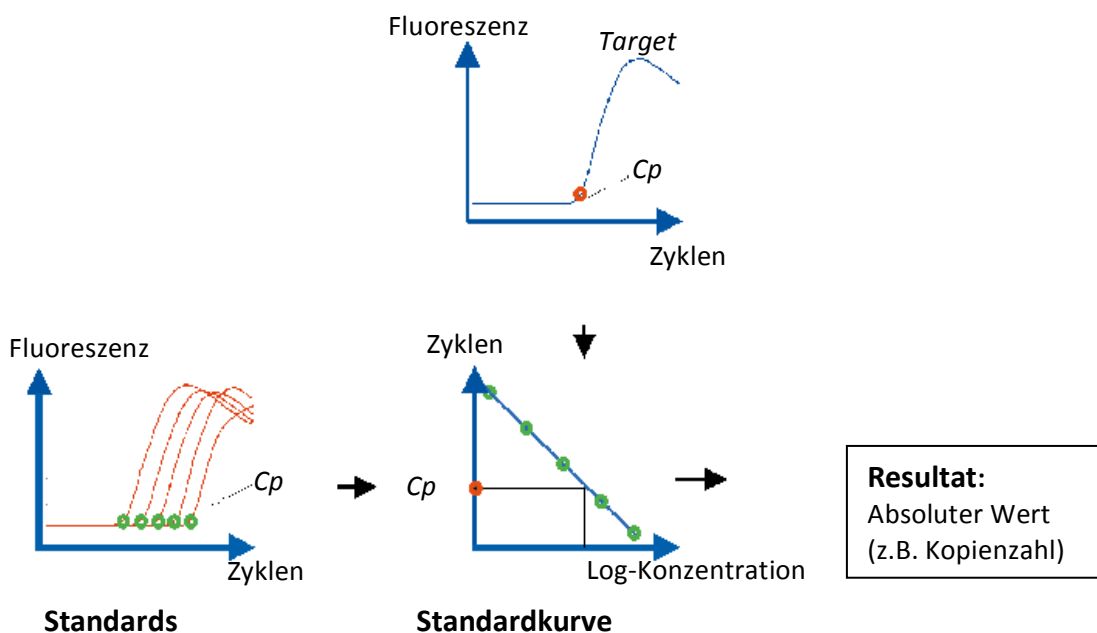
In dieser Arbeit wurden Biopsien aus Ileum- und Kolonmukosa und CRC-Gewebe hinsichtlich der Expression von bestimmten Genen, wie HD5 und HD6, Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a und Lysozym sowie den „Housekeeping“ Genen (HG) „*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1*“ (HPRT1) und  $\beta$ -Actin, untersucht. Zudem wurde die Bakterienmenge in Kolonbiopsien bestimmt, indem die Sequenz des bakteriellen 16S rRNA Genes von *E. coli* MC4100 in den Biopsien quantifiziert wurde. Um die Menge der mRNA eines bestimmten Genes in der Probe zu ermitteln, wurde hier auf das Verfahren der qRT-PCR zurückgegriffen. Diese erfolgte mit dem LightCycler 480<sup>®</sup> (Roche). Nachfolgend sind die Gen-spezifischen Programme mit den jeweiligen Temperaturen aufgelistet (Tabelle 14):

**Tabelle 14:** qRT-PCR-Programme im Light Cycler 480<sup>®</sup>: Touchdown (TD)

Gen	Denaturierung	Amplifikation	Schmelzkurve	Elongation	Cut	TD
16S rRNA, HPRT1, Lysozym, Wnt2, Wnt3	96 °C, 5 min	96-62-72 °C, 10s-5s-10s	95-60-95 °C			
$\beta$ -Actin	95 °C, 10 min	95-60-72 °C, 15s-5s-10s	95-65-95 °C (überall: 1s-15s-∞)	10 min		
HD5, HD6	95 °C, 5 min	95-66-72 °C, 10s-5s-10s	95-65-95 °C			60 °C
Wnt1	96 °C, 5 min	96-62-72 °C, 10s-5s-10s	95-58-95 °C			
Wnt3a	97 °C, 5 min	96-65-72 °C, 10s-5s-10s	95-65-99 °C		88 °C	



Ursprünglich ist die PCR eine Methode, um kleinste DNA-Abschnitte beliebig oft zu vervielfältigen. Da die mathematische Gesetzmäßigkeit der Vermehrung bekannt ist, ist darüber hinaus auch eine Quantifizierung möglich. Dabei nutzt man die Zeit zwischen der ersten und dritten Amplifikationsphase der PCR, in der die Vermehrungsrate exponentiell erfolgt (Mülhardt, 2009). Bei der „*Real-Time*“-PCR kann man die Vervielfältigung zeitgleich über einen Monitor beobachten (Higuchi et al., 1992; Mülhardt, 2009, S.109-114). Der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Roche) wurde eingesetzt, um die amplifizierten PCR-Produkte zu detektieren. Die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus ist dabei im Verlauf der PCR zur Menge der spezifisch zu amplifizierenden DNA-Sequenz proportional (Cardullo et al., 1988; Mülhardt, 2009, S.109-114; Tyagi and Kramer, 1996). Das Erreichen der exponentiellen Phase der Vermehrung wird durch den sog. „*Crossing-Point*“ (Cp-Wert) gekennzeichnet. Dieser bezeichnet die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt (Mülhardt, 2009).



**Abbildung 6: Quantifizierung der Genexpression mittels quantitativer *Real-Time*-PCR**  
 Abbildung zu Verfügung gestellt von Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim

Um die unbekannte Menge an DNA in einer Probe ermitteln zu können, wurde als Referenz eine definierte Menge DNA in Form eines Plasmids in einer Zehner-Verdünnungsreihe mitamplifiziert. Die Template-Konzentration des Plasmidstandards wurde vorher photometrisch bei einer Wellenlänge von 260

nm bestimmt. Dazu wurde das Plasmid 1:25 in EB-Puffer verdünnt. Die erhaltenen Cp-Werte der Plasmidverdünnungen wurden in Abhängigkeit zur logarithmischen Konzentration in ein Diagramm aufgetragen, wodurch eine Standardkurve generiert wurde. Im Anschluss konnte die Menge an PCR-Produkten (Cp-Werten) des Standards mit der Produktmenge (Cp-Werten) der zu untersuchenden Test-Probe verglichen werden. So war es möglich, die zuvor unbekannte Konzentration des jeweiligen DNA-Templates in den zu analysierenden Proben zu ermitteln (Mülhardt, 2009) (siehe Abbildung 6).

### 2.2.2 Proteinmethoden

#### 2.2.2.1 Immunhistochemie

Mit dem Verfahren der Immunhistochemie können spezifische Zellstrukturen durch Antikörper gezielt detektiert werden (Chen et al., 2010). Vor der immunhistochemischen Färbung wurden ausgewählte Biopsien über Nacht mit 4,5%iger Formaldehydlösung fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend im Mikrotom 3 µm dick geschnitten. Die Färbung erfolgte darauf nach Protokoll des Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+ (Dako). Hierzu wurden die Schnitte zuerst mit Hilfe von Neo-Clear entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) hydrolysiert. Um die, bei der Formalinfixierung und Paraffineinbettung verlorengegangene Immunreaktivität des Gewebes wiederherzustellen, muss eine Epitopdemaskierung erfolgen (Krenacs et al., 1999; Shi et al., 1991). Hierzu wurde das Gewebe mit Dampfgarpuffer als „*Target Retrieval Solution*“ (pH6, S1699 von Dako) versetzt und für 30 Minuten im Dampfgarer behandelt. Zwischen den nachfolgenden Anwendungen wurden mehrere Waschschrte mit dem Waschpuffer TBS-T durchgeführt, um verbliebene Reagenzien zu entfernen. Es erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit Hilfe der Peroxidase-„*Blocking Solution*“ S2023, wodurch unerwünschte Hintergrundfärbungen durch unspezifische Reaktionen vermieden werden können (Chen et al., 2010). Zudem wurde der jeweilige Primärantikörper, DEFA5 (1:5000 verdünnt in Antikörper-Diluent S2022) für die spezifische

Färbung des Zielantigens HD5 bzw. DEFA6 (1:500 verdünnt in Antikörper-Diluent S2022) für die Detektion des Zielantigens HD6, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit einem Komplexsystem (K5007, Lösung A) aus Dextran und dem Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (unverdünnt) versetzt. Darauf folgte die Entwicklung der Färbung mit dem DAB-Detektionskit K5007 (Lösung C 1:50 in Lösung B) durch Inkubation im Dunkeln in der feuchten Kammer. Das DAB-Substratsystem besteht aus einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB, Lösung C) und einem Wasserstoffperoxid-haltigen Substratpuffer (Lösung B). Dieses wird durch die HRP enzymatisch umgesetzt, wodurch es zur spezifischen Färbung am Ort des Zielantigens kommt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (1:4 mit H<sub>2</sub>O) nach Gill II gegengefärbt, um die Zellkerne darzustellen. Es folgten eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und eine erneute Behandlung mit Neo-Clear zur Entwässerung. Schließlich wurden die Schnitte mit Neo-Mount eingedeckt. Zur Vergleichskontrolle wurden als Negativkontrolle ein Kolonresektat ohne Antikörper und als Positivkontrolle ein Ileumresektat mit dem Proliferationsmarker Ki67 (1:100) und ein Ileumresektat mit DEFA5 (1:5000) bzw. DEFA6 (1:1000) mitgefärbt. Hierdurch konnten falsch positive und falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden.

### 2.2.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung zwischen verschiedenen Patientengruppen erfolgte anhand statistischer Tests mit der GraphPad Prism Software. Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Bei nicht-parametrischen Daten wurde der „Mann-Whitney-Test“ für die Bewertung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen angewendet, bei mehr als zwei Gruppen wurde der „Kruskal-Wallis-Test“ verwendet. Bei normalverteilten Daten wurden der „*unpaired t-test*“ für die Evaluierung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen und der „*one way ANOVA*“-Test bei mehr als zwei Gruppen verwendet. In den einzelnen Graphen sind die Signifikanzwerte wie folgt gekennzeichnet:  $p > 0.05$  = nicht signifikant (ns);  $p \leq 0.05$  = \*;  $p \leq 0.01$  = \*\*;  $p \leq 0.001$  = \*\*\*;  $p \leq 0.0001$  = \*\*\*\*.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expressionsanalyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Genen im Darm

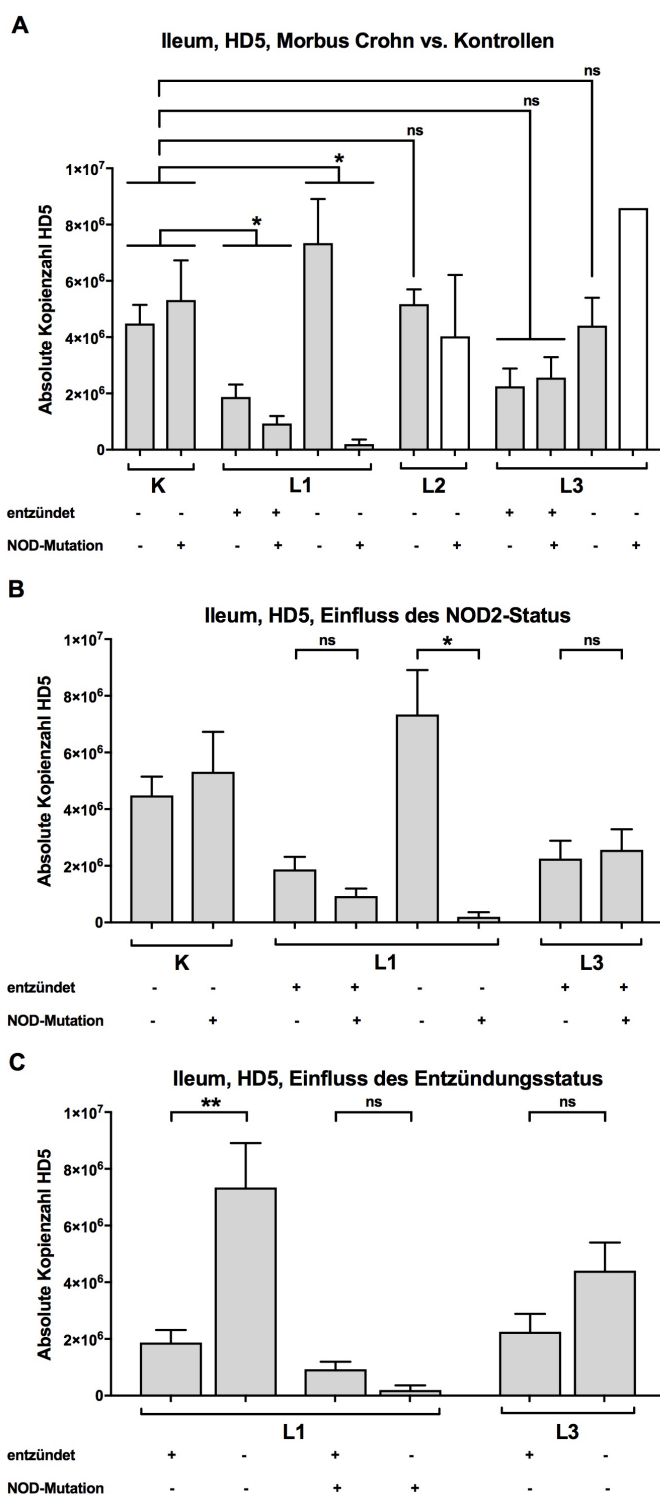
In dieser Arbeit wurden Biopsien aus der Mukosa von Ileum und Kolon mittels qRT-PCR auf die Expression von Genen für antimikrobielle Substanzen untersucht, die typischerweise durch Paneth-Zellen im Dünndarm exprimiert werden. Hierbei wurden die Expressionslevel von MC-Patienten und gesunden Probanden ohne MC verglichen, die als Kontrollgruppe dienten. Die MC-Patienten wurden dabei nach der Befallslokalisierung (L1: Ileumbefall, L2: Kolonbefall, L3: Ileum-Kolonbefall), dem Entzündungsstatus (entzündet, nicht-entzündet) und dem NOD2-Status (NOD2-Wildtyp, NOD2-Mutation) in unterschiedliche Gruppen eingeteilt und hinsichtlich der Expression der untersuchten Zielgene auch untereinander verglichen. So sollte ein Überblick gewonnen werden, wie sich die Expression von antimikrobiellen Paneth-Zell-Genen in der Ileum- und Kolonmukosa bei MC verhält. Die Expression der Zielgene ist jeweils in 10 ng/ $\mu$ l RNA angegeben.

##### 3.1.1 Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren im Ileum

Durch mehrere Studien ist bereits bekannt, dass die Expression von  $\alpha$ -Defensinen im Ileum bei MC mit Ileumbefall reduziert ist (Courth et al., 2015; Watanabe et al., 2005; Wehkamp et al., 2004, p. 2). Dieser Effekt war bei einer NOD2-Mutation, vorwiegend bei der Frameshift-Mutation SNP13, besonders stark (Wehkamp et al., 2005b). Zunächst wurde die Expression der  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 im Ileum bestimmt, um zu testen, ob sich die bereits bekannten Erkenntnisse (vgl. Watanabe et al., 2005; Wehkamp et al., 2004) reproduzieren lassen. Ziel war es, die Verlässlichkeit der qRT-PCR als Methode zur Quantifizierung von Genexpressionsleveln zu prüfen.

#### **3.1.1.1 Reduzierte Expression von HD5 im Ileum bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und Entzündung**

In Abbildung 7 sind die absoluten Kopienzahlen von HD5 im Ileum von gesunden Kontrollen und MC-Patienten gezeigt. Im Ileum von MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) und Entzündung ließen sich gegenüber Kontrollen signifikant geringere Expressionslevel von HD5 beobachten (\*  $p = 0,0126$ ). Bei Ileumbefall ohne Entzündung war die HD5-Expression gegenüber den Kontrollen ebenfalls signifikant verringert (\*  $p = 0,0126$ ). Der Effekt war bei Patienten mit der NOD2-Mutation SNP13 noch deutlicher ausgeprägt. MC-Patienten mit Ileum-Kolonbefall (L3) zeigten bei Entzündung ebenfalls die Tendenz zu einer niedrigeren Expression von HD5, jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Ileum von MC-Patienten mit reinem Kolonbefall (L2) war die Kopienzahl von HD5 im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht vermindert. Der Phänotyp L3 ohne Entzündung mit NOD2-Wildtyp wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollgruppen auf (Abbildung 7A). Der Phänotyp L1 zeigte bei Entzündung und SNP13-Mutation gegenüber der Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp die Tendenz zu einer noch niedrigeren HD5-Expression im Ileum. Dieser Effekt war ohne statistische Signifikanz. Im nicht-entzündeten Kolon war die Expression von HD5 bei L1 mit SNP13-Mutation dagegen signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp (\*  $p = 0,0168$ ). Bei dem Phänotyp L3 nahm der NOD2-Status keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von HD5 (Abbildung 7B). MC-Patienten der Befallslokalisierung L1 mit NOD2-Wildtyp zeigten bei Entzündung gegenüber ihrer Vergleichsgruppe ohne Entzündung eine signifikant geringere Expression von HD5 (\*\*  $p = 0,0032$ ). Bei SNP13-Mutation fand sich bei L1 dagegen kein signifikanter Unterschied abhängig vom Entzündungsstatus. Im Phänotyp L3 mit NOD2-Wildtyp zeigte sich bei Entzündung ebenfalls die Tendenz zu einer noch niedrigeren HD5-Expression gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Entzündung. Hierbei bestand keine Signifikanz (Abbildung 7C).

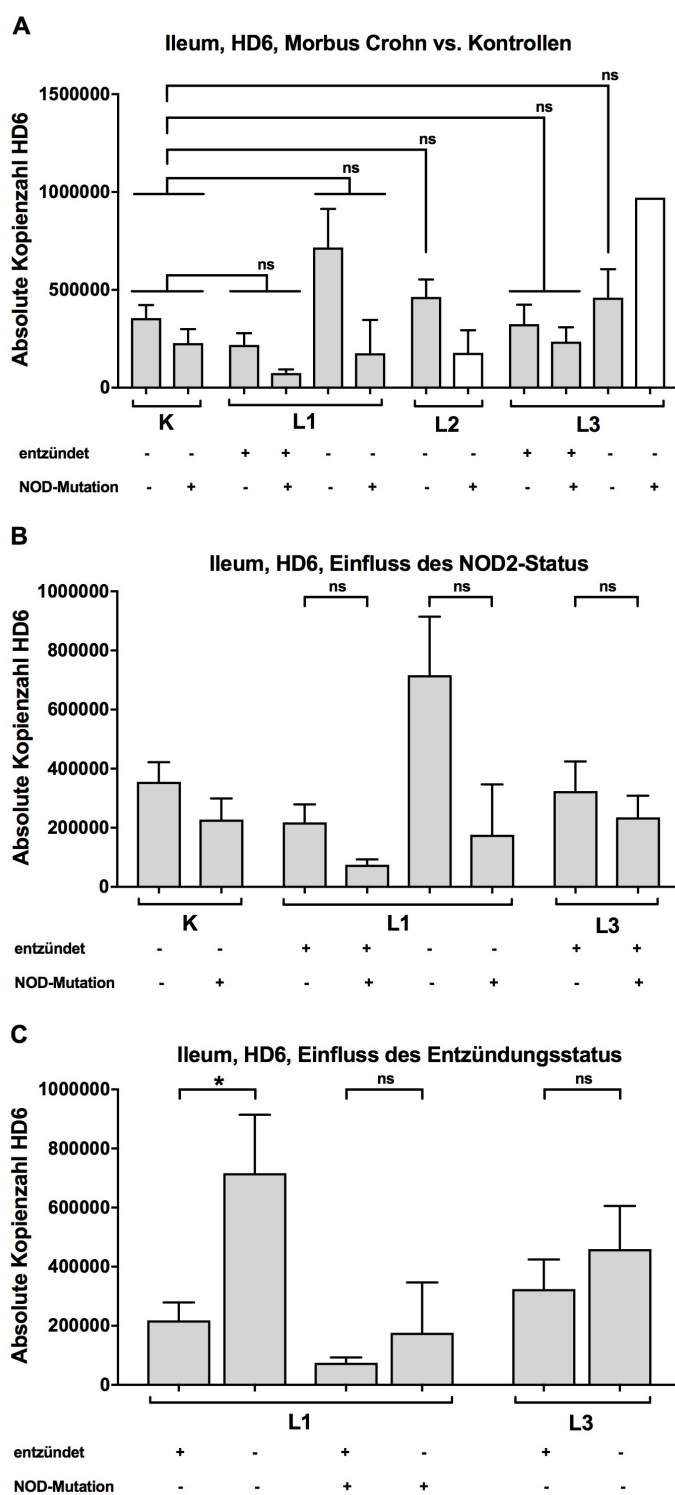


**Abbildung 7: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von HD5 in Ileumbiopsien**

Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5 im Ileum. Die Expression von HD5 in 10 ng/ $\mu$ l RNA von gesunden Kontrollen (K) (n=30) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=65) mit Ileum- (L1)/Kolon- (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten mit identischer MC-Befallslokalisierung und identischem Entzündungsstatus und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und nicht-signifikante Unterschiede sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; *Unpaired t-test*). Die n-Zahlen der MC-Phänotypen „L2, nicht-entzündet, SNP13-Mutation“ und „L3, nicht-entzündet, SNP13-Mutation“ waren zu gering für eine statistische Analyse (Balken: weiß gefärbt).

#### **3.1.1.2 Reduzierte Expression von HD6 im Ileum bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und Entzündung**

Die Expression von HD6 im Ileum von gesunden Kontrollen und MC-Patienten ist in Abbildung 8 dargestellt. Bei MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) und Entzündung sowie bei Ileum-Kolonbefall (L3) und Entzündung, war die Expression von HD6 jeweils tendenziell gegenüber den gesunden Kontrollen verringert. Dieser Unterschied war jeweils ohne statistische Signifikanz. Ohne Entzündung zeigten die Befallstypen L1, L2 und L3 jeweils keinen signifikanten Unterschied in der HD6-Expression gegenüber den gesunden Kontrollen (Abbildung 8A). Das Expressionslevel von HD6 im Ileum war in etwa um den Faktor 10 geringer als das gemessene Expressionslevel von HD5 (Abbildung 7). Die MC-Patienten zeigten bei einer SNP13-Mutation gegenüber ihrer Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisation sowie identischem Entzündungsstatus die Tendenz zu einer noch stärker verringerten Expression von HD6. Hierbei bestand jeweils keine statistische Signifikanz. Der Phänotyp L1 wies bei einer SNP13-Mutation eine besonders niedrige Expression von HD6 im Ileum auf (Abbildung 8B). Patienten mit L1 und NOD2-Wildtyp exprimierten bei Entzündung signifikant weniger HD6 als ihre Vergleichsgruppe ohne Entzündung (\*  $p = 0,0415$ ). Bei L1 und einer SNP13-Mutation war ebenfalls eine tendenziell niedrigere Expression bei Entzündung zu beobachten, jedoch ohne Signifikanz. Eine solche Tendenz zu niedrigeren Expressionsleveln bei Entzündung war auch im Phänotyp L3 mit NOD2-Wildtyp zu erkennen (Abbildung 8C).



**Abbildung 8: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von HD6 in Ileumbiopsien**

Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD6 im Ileum. Die Expression von HD6 in 10 ng/µl RNA von gesunden Kontrollen (K) (n=30) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=65) mit Ileum- (L1)/Kolon- (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Nicht-signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten mit identischer MC-Befallslokalisation und identischem Entzündungsstatus und Kontrollen (gesamt) sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und nicht-signifikante Unterschiede sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). Die n-Zahlen der MC-Phänotypen „L2, nicht-entzündet, SNP13-Mutation“ und „L3, nicht-entzündet, SNP13-Mutation“ waren zu gering für eine statistische Analyse (Balken: weiß gefärbt).



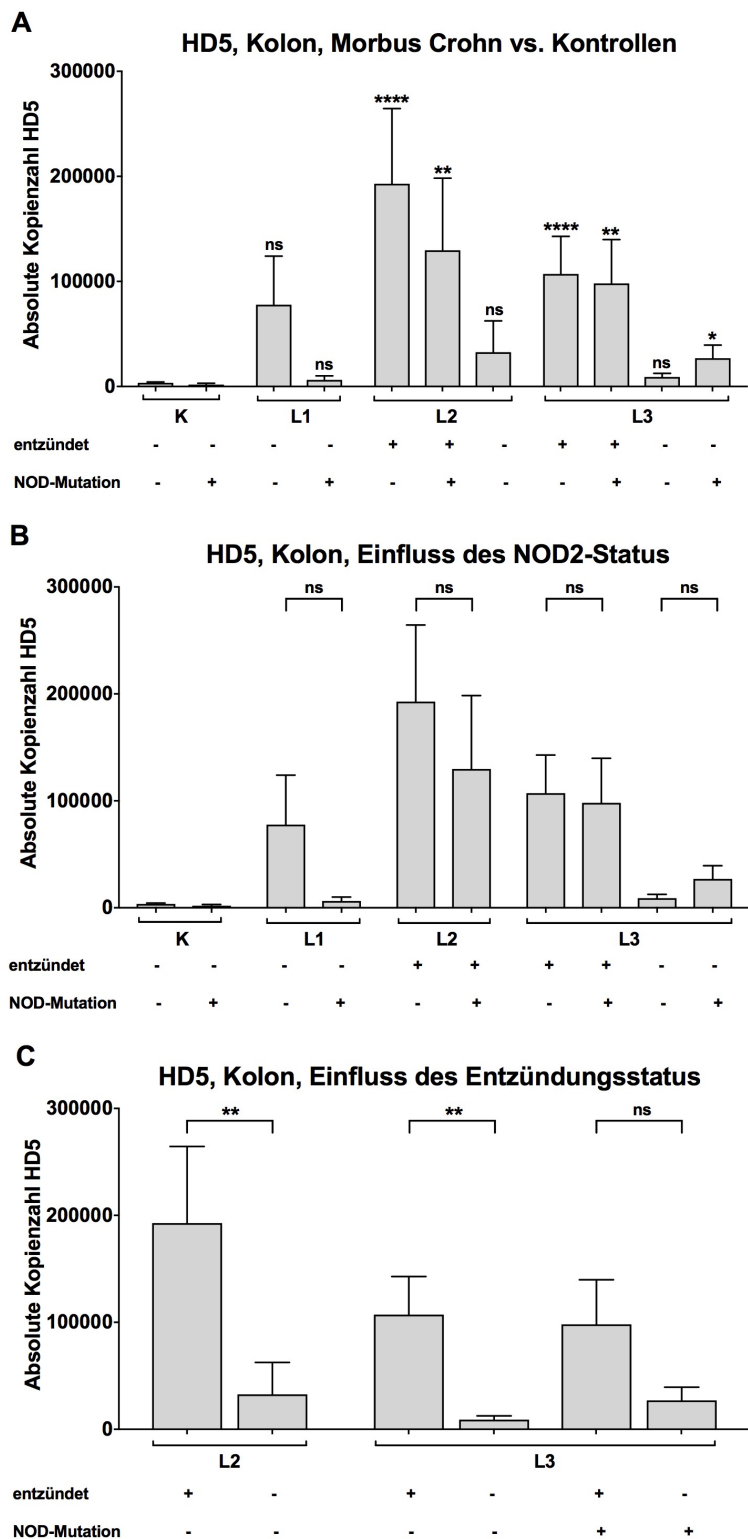
#### **3.1.2 Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren im Kolon**

Im nächsten Schritt wurden die Expressionslevel der antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren HD5, HD6 und Lysozym im Kolon von MC-Patienten und gesunden Kontrollen bestimmt. Bei Gesunden gibt es normalerweise keine Paneth-Zellen im Kolon. Eine Studie konnte allerdings zeigen, dass metaplastische Paneth-Zellen im Kolon bei MC vorkommen und  $\alpha$ -Defensine exprimieren (vgl. Cunliffe et al., 2001). In einer anderen Vorarbeit wurde in diesem Zusammenhang festgestellt, dass die Defensin-Expression im Kolon bei MC-Patienten mit NOD2-Mutation geringer war als bei Patienten mit NOD2-Wildtyp (vgl. Wehkamp et al., 2004, p. 2). Zunächst war das Ziel, festzustellen, ob sich metaplastische Paneth-Zellen in den hier untersuchten Kolonbiopsien von MC-Patienten befinden. Hierdurch sollte geprüft werden, ob das Kolonkollektiv für eine tiefere Analyse von metaplastischen Paneth-Zellen repräsentativ ist. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Expression von HD5, HD6 und Lysozym im Kolon bei MC in Abhängigkeit der unterschiedlichen Befallslokalisationen (L1, L2, L3), dem genetischen NOD2-Status (NOD2-Mutation = SNP8/12/13 gegenüber NOD2-Wildtyp) und dem Entzündungsstatus (entzündet, nicht-entzündet) verhält.

##### **3.1.2.1 Erhöhte Expression von HD5 im Kolon bei Morbus Crohn mit Entzündung, (Ileum-)Kolonbefall und NOD2-Wildtyp**

Abbildung 9 zeigt die absoluten Kopienzahlen von HD5 im Kolon von MC-Patienten und gesunden Kontrollgruppen. Im Kolon der Kontrollen konnte keine Expression von HD5 nachgewiesen werden. Dagegen fiel auf, dass die HD5-Expression im Kolon der MC-Patienten mit (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3) und Entzündung deutlich erhöht war. Der Unterschied im Expressionslevel gegenüber den Kontrollen war dabei unabhängig vom NOD2-Status dieser MC-Phänotypen signifikant (L2, NOD2-Wildtyp: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; L2, NOD2-Mutation: \*\*  $p = 0,0013$ ; L3, NOD2-Wildtyp: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; L3: NOD2-Mutation: \*\*  $p = 0,0035$ ). Die höchste gemessene Expression von HD5 war im Phänotyp L2 bei Entzündung und NOD2-Wildtyp zu sehen. MC-Patienten zeigten in allen Befallstypen (L1, L2, L3) ohne Entzündung im Vergleich zu Gesunden ebenfalls

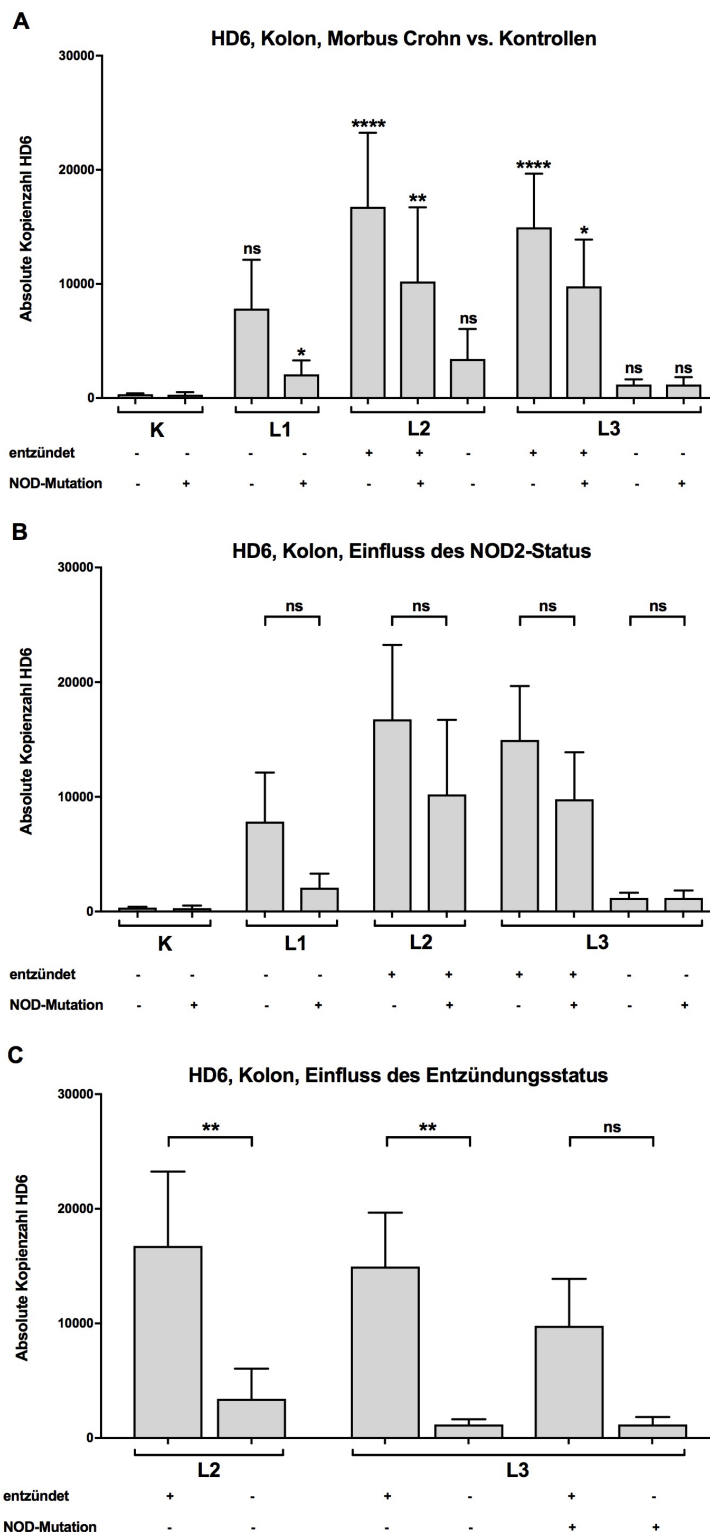
eine Tendenz zu höheren Expressionsleveln von HD5. Gegenüber Patienten mit Entzündung waren ihre Expressionslevel jedoch niedriger. Die gemessenen Unterschiede zwischen MC-Patienten ohne Entzündung und Kontrollen waren ausschließlich im Phänotyp L3 bei NOD2-Wildtyp statistisch signifikant (\*  $p = 0,0197$ ) (Abbildung 9A). Die absolute Kopienzahl von HD5 im Kolon von MC-Patienten war etwa um den Faktor 10 geringer als die gemessenen Expressionslevel von HD5 im Ileum (Abbildung 7). MC-Patienten der Befallstypen L1 bzw. L2 zeigten bei einer NOD2-Mutation gegenüber ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisierung sowie identischem Entzündungsstatus die Tendenz zu einer geringeren Expression von HD5. Im Phänotyp L3 hatte ein Unterschied im NOD2-Status bei identischem Entzündungsstatus keine Auswirkung auf die HD5-Expression (Abbildung 9B). MC-Patienten mit Kolonbefall (L2) bzw. Ileum-Kolonbefall (L3) wiesen bei Entzündung eine besonders hohe Expression von HD5 auf. Diese war gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe ohne Entzündung mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisierung signifikant erhöht (L2: \*\*  $p = 0,0012$ ; L3: \*\*  $p = 0,0027$ ). Bei L3 und NOD2-Mutation zeigte sich bei Entzündung gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Entzündung ebenfalls die Tendenz zu einer erhöhten Expression von HD5. Hierbei bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Abbildung 9C). Im Anhang sind die Einzelwerte der Probanden (Abbildung 22) und die Expression von HD5 normiert auf das „Housekeeping“ Gen (HG) HPRT1 dargestellt (Abbildung 25).



**Abbildung 9: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von HD5 in Kolonbiopsien**  
 Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5 im Kolon. Die Expression von HD5 in 10 ng/µl RNA von Kontrollen (K) (n=34) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=130) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

#### **3.1.2.2 Erhöhte Expression von HD6 im Kolon bei Morbus Crohn mit Entzündung, (Ileum-)Kolonbefall und NOD2-Wildtyp**

Die Expressionslevel von HD6 im Kolon von gesunden Probanden und MC-Patienten sind in Abbildung 10 dargestellt. Im Kolon der gesunden Kontrollen fand sich keine Expression von HD6. Dagegen zeigten Patienten mit MC aller Befallsgruppen (L1, L2, L3) eine erhöhte Expression von HD6 im Kolon. Die Unterschiede in den Expressionsleveln zwischen gesunden Kontrollen und Patienten der Befallstypen L2 bzw. L3 mit Entzündung waren jeweils signifikant (L2, NOD2-Wildtyp: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; L2, NOD2-Mutation: \*\*  $p = 0,0034$ ; L3, NOD2-Wildtyp: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; L3: NOD2-Mutation: \*  $p = 0,0119$ ). Bei L1 ließ sich bei einer NOD2-Mutation ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von HD6 beobachten (\*  $p = 0,0237$ ) (Abbildung 10A). Die absolute Kopienzahl von HD6 im Kolon der MC-Patienten war um den Faktor 10 geringer als die gemessene Expression von HD6 im Ileum (Abbildung 8). Im Vergleich zur Expression von HD5 im Kolon bei MC (Abbildung 9) war das Expressionslevel von HD6 etwa um das 10-Fache geringer. Bei einer NOD2-Mutation war das Expressionslevel von HD6 gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisation (L2 bzw. L3) sowie bei Entzündung tendenziell geringer. Die Befallsgruppe L1 ohne Entzündung zeigte bei einer NOD2-Mutation gegenüber der Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp ebenfalls eine Tendenz zu einer geringeren Expression von HD6. Diese Beobachtungen waren jeweils ohne statistische Signifikanz (Abbildung 10B). Bei identischer Befallslokalisation (L2 bzw. L3) und NOD2-Wildtyp war die Expression von HD6 bei Entzündung gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe ohne Entzündung signifikant erhöht (L2: \*\*  $p = 0,0055$ ; L3: \*\*  $p = 0,0035$ ). Bei L3 und NOD2-Mutation ließ sich bei Entzündung gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Entzündung ebenfalls eine tendenziell erhöhte Expression von HD6 beobachten. Hier bestand keine Signifikanz (Abbildung 10C). Im Anhang ist die Expression von HD6 unter Darstellung der Einzelwerte (Abbildung 23) sowie normiert auf HPRT1 gezeigt (Abbildung 26).



**Abbildung 10: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von HD6 in Kolonbiopsien**

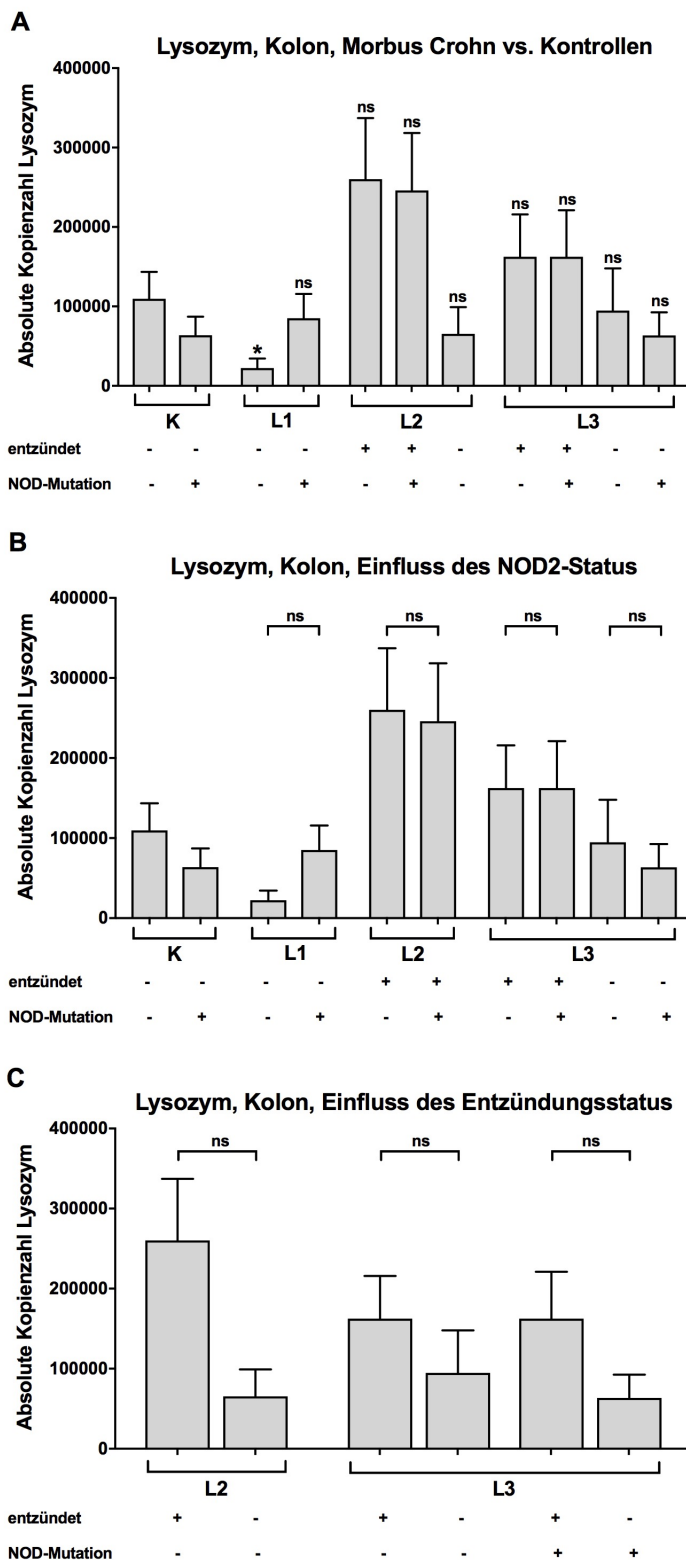
Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD6 in Kolon. Die Expression von HD6 in 10 ng/µl RNA von Kontrollen (K) (n=34) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=130) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

#### **3.1.2.3 Erhöhte Expression von Lysozym im Kolon bei Morbus Crohn mit Entzündung und (Ileum-)Kolonbefall unabhängig vom NOD2-Status**

Im gesunden Kolon ist die Lysozym-Expression normalerweise nicht erhöht (Elphick and Mahida, 2005). In einer Vorarbeit wurde in diesem Zusammenhang bereits eine erhöhte Lysozym-Expression im Kolon bei MC während der Entzündung gemessen. Der NOD2-Status hatte dabei keinen Einfluss auf diesen Effekt (Wehkamp et al., 2004). Aufgrund der erhöhten Expression der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 im Kolon von MC-Patienten (s. Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2) liegt nahe, dass metaplastische Paneth-Zellen in den hier untersuchten Kolonbiopsien vorkommen. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, inwiefern sich die Lysozym-Expression durch das Vorhandensein von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC verändert. Anhand der Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5 und HD6 (s. Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2) wurden hierzu Kolonproben ausgewählt, deren hohe Defensin-Expression auf das Vorkommen von metaplastischen Paneth-Zellen hindeutete und deren Expressionslevel möglichst nahe beieinander lagen.

In Abbildung 11 sind die absoluten Kopienzahlen von Lysozym im Kolon von gesunden Kontrollgruppen und Patienten mit MC aufgezeigt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten MC-Patienten der Befallstypen L2 und L3 bei Entzündung unabhängig von ihrem NOD2-Status jeweils die Tendenz zu einer höheren Expression von Lysozym im Kolon. Diese Unterschiede waren ohne statistische Signifikanz. Ohne Entzündung erschien die Lysozym-Expression bei MC gegenüber den Kontrollen tendenziell eher erniedrigt. Dieser Effekt war jedoch nur im Befallstyp L1 mit NOD2-Wildtyp signifikant (\*  $p = 0,0399$ ) (Abbildung 11A). Die Höhe des Expressionslevels von Lysozym im Kolon war etwa mit der Höhe der gemessenen Expression von HD5 im Kolon bei MC-Patienten vergleichbar (Abbildung 9). Im Verhältnis zu den gemessenen Expressionsleveln von HD6 im Kolon von MC-Patienten (Abbildung 10) wurde Lysozym etwa um den Faktor 10 höher exprimiert. Bei identischem Befallstyp (L1, L2, L3) und identischem Entzündungsstatus bestand zwischen Patienten mit NOD2-Wildtyp und ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Mutation

kein signifikanter oder tendenzieller Unterschied in der Lysozym-Expression (Abbildung 11B). Bei identischer Befallslokalisierung L2 bzw. L3 und identischem NOD2-Status wiesen MC-Patienten im Falle einer Entzündung jeweils die Tendenz zu erhöhten Lysozymleveln gegenüber ihrer Vergleichsgruppe ohne Entzündung auf. Dieser Effekt war bei dem Befallstypen L2 besonders deutlich, insgesamt jedoch nicht signifikant (Abbildung 11C). Die Einzelwerte von MC-Patienten und Kontrollen (Abbildung 24) und die relative Expression von Lysozym normiert auf HPRT1 (Abbildung 27) sind im Anhang dargestellt.



**Abbildung 11: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von Lysozym in Kolonbiopsien**  
 Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Lysozym im Kolon. Die Expression von Lysozym in 10 ng/μl RNA von gesunden Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Nicht-signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; *Unpaired t-test*).



#### **3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren**

MC-Patienten wiesen bei Ileumbefall (L1) und Entzündung signifikant niedrigere Expressionslevel von HD5 im Ileum auf als Gesunde. Ebenso zeigten sie eine deutliche Tendenz zu einer erniedrigten HD6-Expression im Ileum. Bei der NOD2-Mutation SNP13 war die Expression von HD5 bzw. HD6 im Ileum dieser MC-Patienten besonders niedrig. Bei MC-Patienten mit Ileumbefall und NOD2-Wildtyp nahm der Entzündungsstatus einen signifikanten Einfluss auf die Expression von HD5 und HD6 im Ileum. So war die Expression von HD5 und HD6 im Ileum bei Entzündung signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe ohne Entzündung.

Während HD5 und HD6 im Kolon der gesunden Kontrollen nicht exprimiert wurden, zeigten sich signifikant erhöhte Expressionslevel von HD5 und HD6 im Kolon von MC-Patienten mit Kolonbefall (L2) und Ileum-Kolonbefall (L3) bei Entzündung. Dieser Effekt war bei Patienten mit NOD2-Wildtyp gegenüber Patienten mit einer NOD2-Mutation in ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe tendenziell verstärkt. MC-Patienten anderer Phänotypen wiesen tendenziell ebenfalls erhöhte Expressionslevel von HD5 und HD6 auf. Bei MC-Patienten mit (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3) und NOD2-Wildtyp nahm der Entzündungsstatus einen signifikanten Einfluss auf die Expression von HD5 und HD6 im Kolon. So war die Expression von HD5 bzw. HD6 bei MC mit Kolonbefall (L2) und Ileum-Kolonbefall (L3) bei NOD2-Wildtyp und Entzündung signifikant höher als in der jeweiligen Vergleichsgruppe ohne Entzündung. Darüber hinaus zeigten sich tendenziell höhere Expressionslevel bei L3 und NOD2-Mutation in der Entzündung. MC-Patienten mit (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3) zeigten bei Entzündung unabhängig vom NOD2-Status die Tendenz zu einer erhöhten Expression von Lysozym im Kolon.

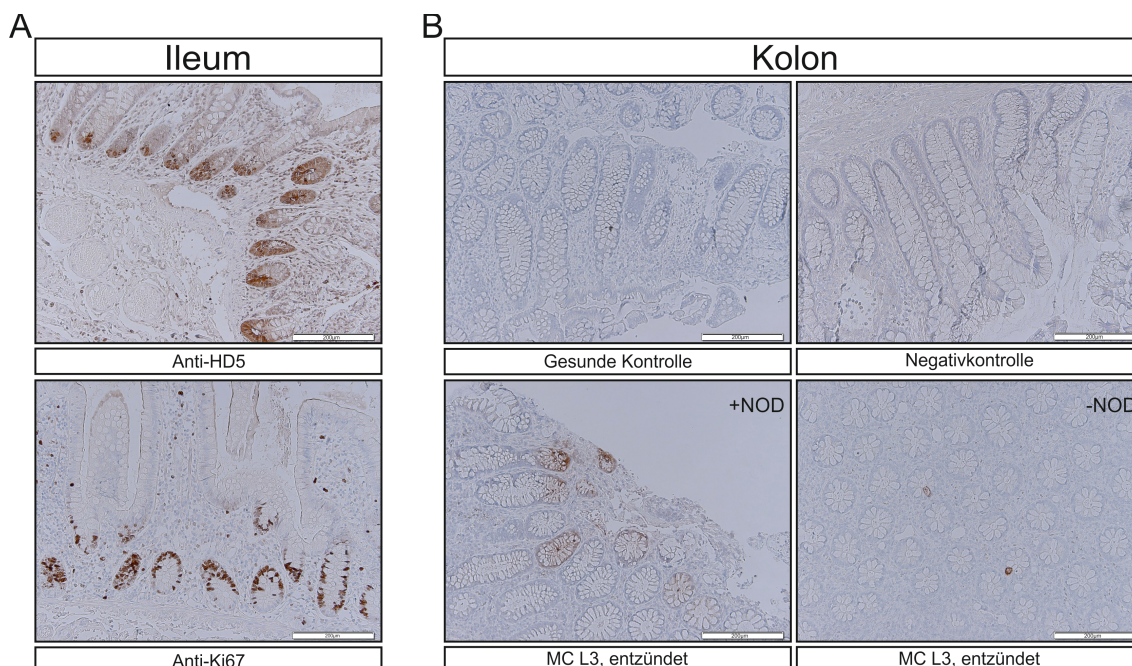
#### **3.2 Immunhistochemischer Nachweis von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei Patienten mit MC eine erhöhte Expression der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 im Kolon gemessen werden (Abbildung 9, Abbildung 10). Da Paneth-Zellen im gesunden Kolon normalerweise nicht vorkommen (vgl. Cunliffe et al., 2001), wurde im Folgenden eine immunhistochemische Detektion von HD5 und HD6 im Kolongewebe von MC-Patienten durchgeführt. Ziel war es, hierdurch die Herkunft der Defensine aus metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei Patienten mit MC zu beweisen. Zunächst wurden hierfür Kolonbiopsien von Patienten ausgewählt, bei denen eine besonders hohe absolute Kopienzahl von HD5 und HD6 gemessen werden konnte. Da die Defensin-Expression im Kolon bei MC-Patienten vor allem bei Entzündung und MC mit Kolonbefall (L2) sowie Ileum-Kolonbefall (L3) erhöht war (Abbildung 9, Abbildung 10), lassen sich bei diesen MC-Phänotypen die meisten metaplastischen Paneth-Zellen vermuten. Daher wurde die Biopsie eines MC-Patienten mit dem Phänotyp „L3, NOD2-Wildtyp, Entzündung“ für die Färbungen von HD5 und HD6 ausgewählt. Zudem wurden die Biopsie eines MC-Patienten mit dem Phänotyp „L3, NOD2-Mutation, Entzündung“ sowie die Biopsie einer gesunden Kontrollperson ohne MC zum Vergleich mitgefärbt. Als Negativkontrolle diente ein Kolonresektat. Zudem wurden zwei Ileumresektate als Positivkontrollen mitgefärbt.

##### **3.2.1 Immunhistochemische Detektion von HD5 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileum-Kolonbefall und Entzündung**

Wie in Abbildung 12 dargestellt ist, zeigte das Kolongewebe von MC-Patienten mit Ileum-Kolonbefall (L3) und Entzündung nach Inkubation mit Anti-HD5 braune Färbungen in der Kryptenregion. Dies ließ sich sowohl im Kolon des Patienten mit NOD2-Mutation (+NOD) als auch im Kolongewebe des Patienten mit NOD2-Wildtyp (-NOD) beobachten. Die gesunde Kontrolle ohne MC wies im Kolon keine Färbung durch Anti-HD5 auf. In der Negativkontrolle aus Kolongewebe ohne Antikörperbehandlung war ebenfalls keine Färbung zu

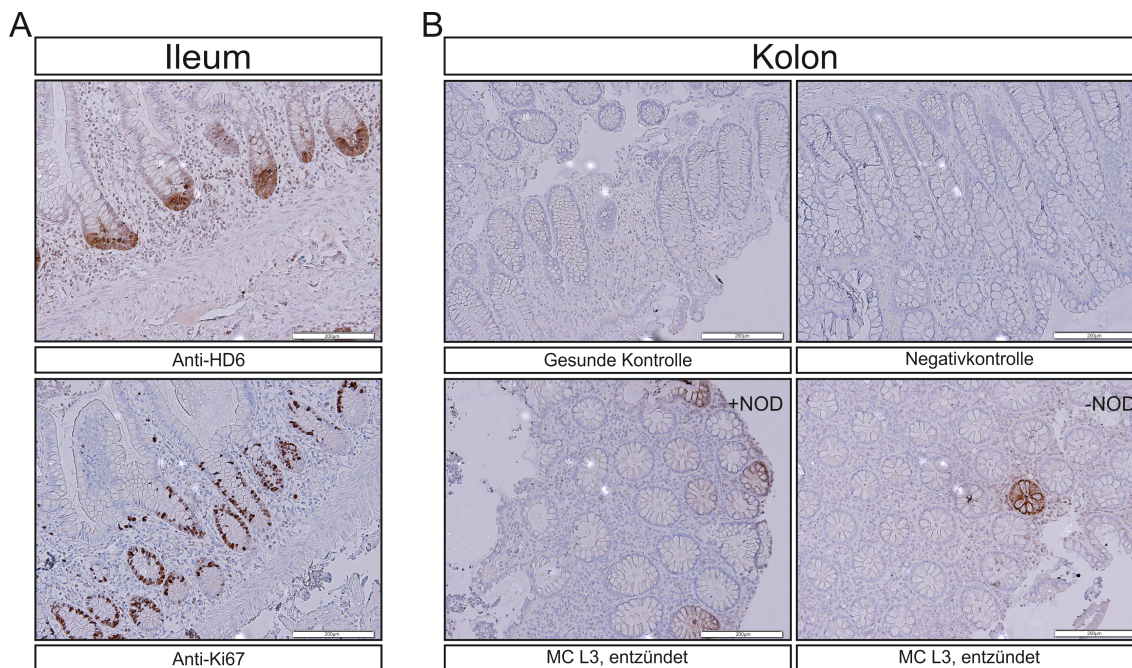
erkennen. In den Positivkontrollen aus dem Ileum ließen sich bei Behandlung mit Anti-HD5 und Ki-67 Zellen in der unteren Kryptenregion spezifisch anfärben.



**Abbildung 12: Mikroskopische Bilder von Ileum- und Kolonmukosa nach Anti-HD5 Färbung**  
 Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von A: zwei Positivkontrollen für Paneth-Zellen (Ileum), eine inkubiert mit Anti-HD5 und eine mit Anti-Ki67. In B ist die mit Anti-HD5 behandelte Kolonmukosa eines gesunden Kontrollprobanden und zweier Patienten mit Morbus Crohn (MC) der Phänotypen L3 (Ileum-Kolonbefall), Entzündung und NOD2-Mutation (+NOD) sowie L3, Entzündung und NOD2-Wildtyp (-NOD) dargestellt. Ebenso ist die Negativkontrolle (Kolonresektat) ohne Antikörper zu sehen. Die Bilder sind in 10-facher Vergrößerung dargestellt, Maßstabsleiste 200 µm.

### 3.2.2 Immunhistochemische Detektion von HD6 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileum-Kolonbefall und Entzündung

In Abbildung 13 ist das Kolongewebe von MC-Patienten mit Ileum-Kolonbefall (L3) und Entzündung nach Färbung mit Anti-HD6 zu sehen. Wie zu erkennen ist, zeigten die MC-Patienten spezifische Färbungen von Krypten-Anschnitten im Kolon. Dies war sowohl im Gewebe eines Patienten mit NOD2-Mutation (+NOD) als auch im Gewebe eines Patienten mit NOD2-Wildtyp (-NOD) der Fall. Im Kolongewebe der gesunden Kontrolle fiel nach Behandlung mit Anti-HD6 keine Färbung auf. Die Negativkontrolle ohne Antikörperbehandlung zeigte ebenfalls keine Färbung. Die Positivkontrollen aus dem Ileum wiesen bei Behandlung mit Anti-HD6 und Ki-67 spezifische Färbungen in der unteren Kryptenregion auf.



**Abbildung 13: Mikroskopische Bilder von Ileum- und Kolonmukosa nach Anti-HD6 Färbung**

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Detektion von A: zwei Positivkontrollen für Paneth-Zellen (Ileum), eine inkubiert mit Anti-HD6 und eine mit Anti-Ki67. In B ist die mit Anti-HD6 behandelte Kolonmukosa eines gesunden Kontrollprobanden und zweier Patienten mit Morbus Crohn (MC) der Phänotypen L3 (Ileum-Kolonbefall), Entzündung und NOD2-Mutation (+NOD) sowie L3, Entzündung und NOD2-Wildtyp (-NOD) dargestellt. Ebenso ist die Negativkontrolle (Kolonresektat) ohne Antikörper zu sehen. Die Bilder sind in 10-facher Vergrößerung dargestellt, Maßstabsleiste 200 µm.

#### **3.3 Analyse der Auswirkung von metaplastischen Paneth-Zellen auf Bakterien im Kolon bei MC**

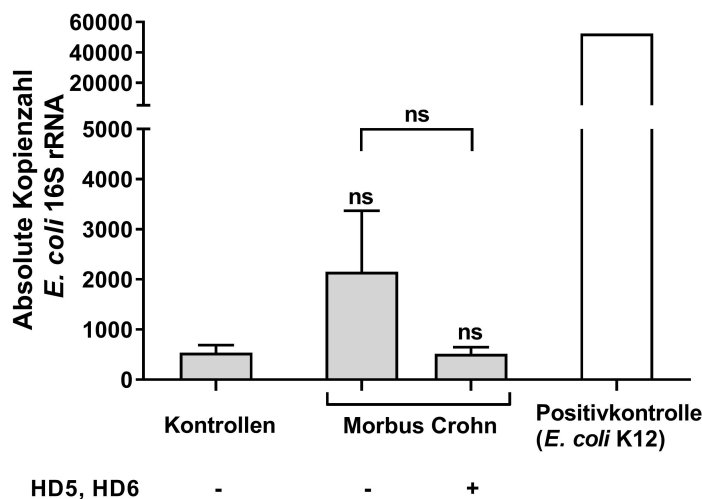
Durch Defekte in der intestinalen Barriere bei MC, wird Bakterien das Eindringen in das Darmgewebe erleichtert (Nuding et al., 2007; Wehkamp et al., 2005a). Die genaue Funktion von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC und ihr Einfluss auf ihre Umgebung waren noch unklar. Aufgrund ihrer Expression von antimikrobiellen Peptiden wie HD5, HD6 und Lysozym (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11) lässt sich vermuten, dass sie womöglich zur antimikrobiellen Verteidigung bei MC beitragen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde mit einer weiteren qRT-PCR-Analyse untersucht, ob metaplastische Paneth-Zellen im Kolon bei MC in der Lage sein könnten, die Bakterienmenge im geschädigten Gewebe zu verringern. Hierzu wurden die Expressionslevel des bakteriellen 16S rRNA Genes von *E. coli* MC4100 im Kolongewebe bei MC-Patienten mit niedriger HD5- und HD6-Expression im Kolon und Patienten mit hoher HD5- und HD6-Expression verglichen. Bei der Auswahl dieser Patienten wurde außerdem darauf geachtet, dass beide Patientengruppen ein vergleichbares Verhältnis in den verschiedenen MC-Phänotypen (Befallslokalisierung, NOD2-Status, Entzündungsstatus) aufwiesen. Als weitere Vergleichsgruppe wurden gesunde Kontrollpersonen ohne MC untersucht. Als Positivkontrolle diente, neben einem Standardplasmid aus cDNA von *E. coli* MC1000, die cDNA aus *E. coli* K12. Die absolute Kopienzahl wurde auf 10 ng/µl RNA bezogen.

##### **3.3.1 Niedrigere Expression der bakteriellen 16S rRNA im Kolon bei Morbus Crohn bei einer hohen HD5- und HD6-Expression**

In Abbildung 14 ist die absolute Kopienzahl des bakteriellen 16S rRNA Genes von *E. coli* MC4100 im Kolon von gesunden Kontrollen und MC-Patienten sowie in cDNA von *E. coli* K12 dargestellt. Im Kolongewebe der gesunden Kontrollen fand sich eine geringe absolute Kopienzahl des 16S rRNA Genes. Dagegen war die 16S rRNA-Expression bei MC-Patienten mit einer niedrigen HD5- und HD6-Expression im Kolon mit einer deutlichen Tendenz erhöht. Dieser Unterschied war ohne statistische Signifikanz. Patienten mit MC und hohen

Expressionsleveln von HD5 und HD6 zeigten gegenüber Patienten mit niedrigen Expressionsleveln von HD5 und HD6 eine deutlich geringere Expression des 16S rRNA Genes. Die Expression der 16S rRNA bei MC-Patienten mit hoher HD5- bzw. HD6-Expression im Kolon lag auf einem vergleichbar niedrigen Level wie die 16S-rRNA-Expression der Kontrollgruppe. Die als Positivkontrolle bezogene cDNA aus *E. coli* K12 wies im Vergleich zu den humanen Kolonbiopsien eine bis zu 100-fach höhere Expression des bakteriellen 16S rRNA Genes auf (Abbildung 14). Diese Erkenntnisse werden durch diese Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Im Anhang sind die Daten normiert auf HPRT1 (Abbildung 28A) und unter Darstellung der Einzelwerte (Abbildung 28B) veranschaulicht.

***E. coli* 16S rRNA Gen, Kontrollen vs. Morbus Crohn**



**Abbildung 14: Expression bakterieller 16S rRNA im Kolon bei Morbus Crohn-Patienten mit unterschiedlicher Defensin-Expression**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse des 16S rRNA Genes von *E. coli* MC4100 im Kolon bezogen auf 10 ng/µl RNA sind im Balkendiagramm mit SEM dargestellt. Abgebildet ist die 16S rRNA-Expression von Morbus Crohn (MC)-Patienten mit niedriger („-“) HD5- und HD6-Expression im Kolon (n=12) und hoher („+“) HD5- und HD6-Expression (n=22). Mitanalysiert wurden gesunde Kontrollen (n=10) und *E. coli* K12 (n=1, Positivkontrolle). Über den Balken sind Unterschiede ohne Signifikanz im Vergleich zu den Kontrollen durch ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). Die n-Zahl der Positivkontrolle (*E. coli* K12) war zu gering für eine statistische Auswertung (Balken: weiß gefärbt). Über der Klammer sind nicht-signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

#### **3.4 Analyse von Wnt-Liganden im Kolon mit metaplastischen Paneth-Zellen**

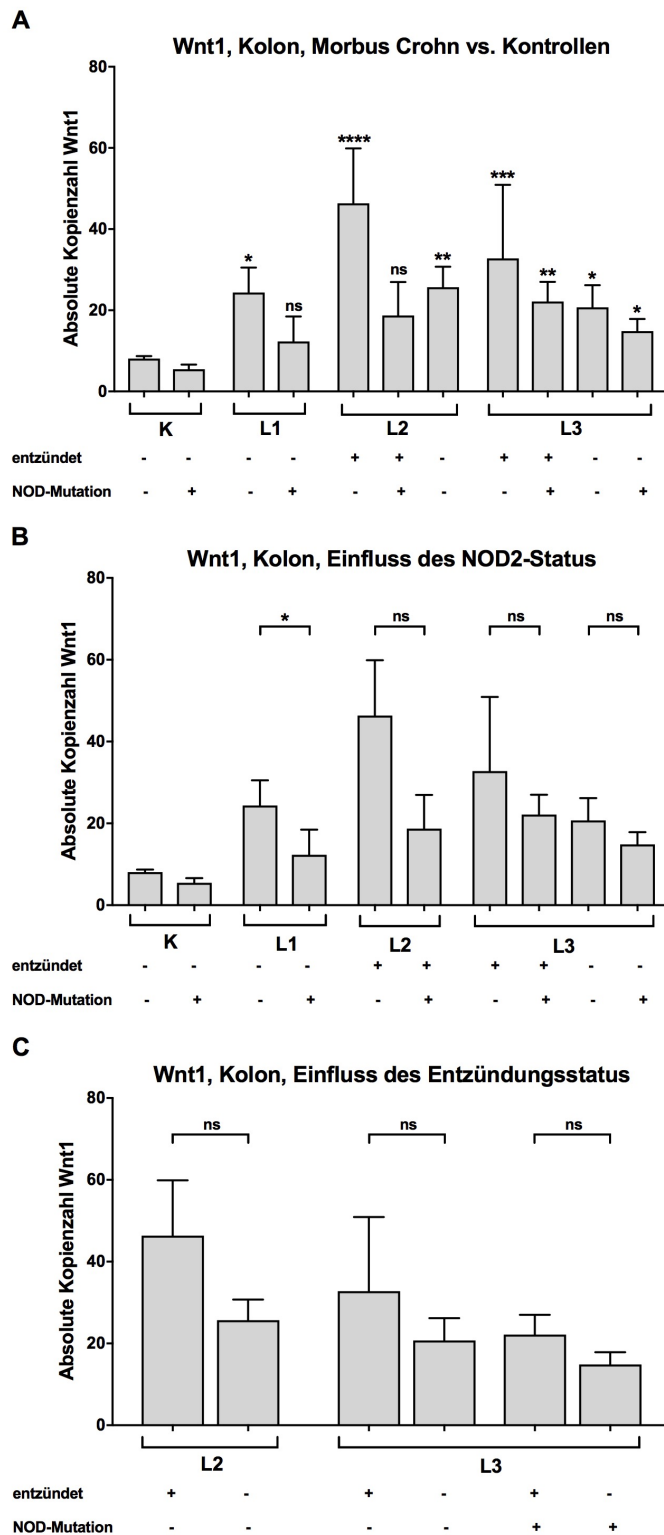
Erkenntnisse aus Studien im Ileum zeigten bereits, dass Paneth-Zellen durch Wnt-Signale zum einen die Regulation der intestinalen Stammzellen beeinflussen (vgl. Sato et al., 2011) und zum anderen Wnt-Signale für ihre Differenzierung benötigen (Es et al., 2005). Zudem beeinflussen Paneth-Zellen im Ileum über die Sekretion von Wnt-Liganden autokrin ihre Expression von  $\alpha$ -Defensinen (Armbruster et al., 2017; Es et al., 2005). Bisher gibt es noch keine Erkenntnisse über die Expression von Wnt-Liganden durch metaplastische Paneth-Zellen im Kolon beim MC. Daher wurden selektierte Kolonbiopsien nachfolgend auf die Expression der Wnt-Liganden Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a untersucht, um mehr über den Einfluss der metaplastischen Paneth-Zellen auf ihre Umgebung zu erfahren. Anhand der Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5 und HD6 wurden hierzu Kolonproben ausgewählt, deren hohe Defensin-Expression auf das Vorkommen von metaplastischen Paneth-Zellen hindeutete und deren Expressionslevel möglichst nahe beieinander lagen. Die Expression ist bezogen auf 10 ng/ $\mu$ l RNA gezeigt.

##### **3.4.1 Erhöhte Expression von Wnt1 im Kolon bei Morbus Crohn besonders bei NOD2-Wildtyp und Entzündung**

Die Expressionslevel von Wnt1 im Kolon von gesunden Kontrollen und MC-Patienten sind in Abbildung 15 dargestellt. Gegenüber den gesunden Kontrollen zeigten die MC-Patienten in allen Befallsgruppen (L1, L2, L3) eine höhere Expression von Wnt1 im Kolon. Bei MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) und Patienten mit Kolonbefall (L2) sowie NOD2-Wildtyp war dieser Unterschied zu den Kontrollen jeweils statistisch signifikant (L1: \*  $p = 0,0331$ ; L2, entzündet: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; L2, nicht-entzündet: \*\*  $p = 0,0010$ ). Im Falle einer NOD2-Mutation ließ sich bei Patienten dieser Befallsgruppen eine Tendenz zu einer erhöhten Expression von Wnt1 beobachten. Hierbei bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Patienten mit Ileum-Kolonbefall (L3) exprimierten Wnt1 unabhängig von ihrem NOD2-Status in signifikant höherer Konzentration als die Kontrollgruppen (L3, entzündet, NOD2-Wildtyp:

\*\*\*  $p = 0,0007$ ; L3, entzündet, NOD2-Mutation: \*\*  $p = 0,0010$ ; L3, nicht-entzündet, NOD2-Wildtyp: \*  $p = 0,0276$ ; L3, nicht-entzündet, NOD2-Mutation: \*  $p = 0,0263$ ). Die höchsten Expressionslevel von Wnt1 fanden sich bei Kolonbefall (L2) bzw. Ileum-Kolonbefall (L3) bei NOD2-Wildtyp und Entzündung (Abbildung 15A). Gegenüber Patienten mit NOD2-Wildtyp zeigten Patienten mit NOD2-Mutation in ihrer Vergleichsgruppe mit jeweils identischer Befallslokalisierung (L1, L2, L3) und identischem Entzündungsstatus die Tendenz zu einer geringeren Expression von Wnt1. Im Phänotyp L1 war dieser Effekt von statistischer Signifikanz (\*  $p = 0,0434$ ) (Abbildung 15B). Bei Entzündung war die Expression in der jeweiligen Befallsgruppe L2 bzw. L3 mit identischem NOD2-Status tendenziell höher als ohne Entzündung, jedoch nicht signifikant (Abbildung 15C). Diese Erkenntnisse werden durch diese Arbeit erstmals gezeigt. Im Anhang sind die Einzelwerte (Abbildung 29) und die Expressionslevel von Wnt1 normiert auf das HG HPRT1 (Abbildung 33A, B, C) aufgeführt.



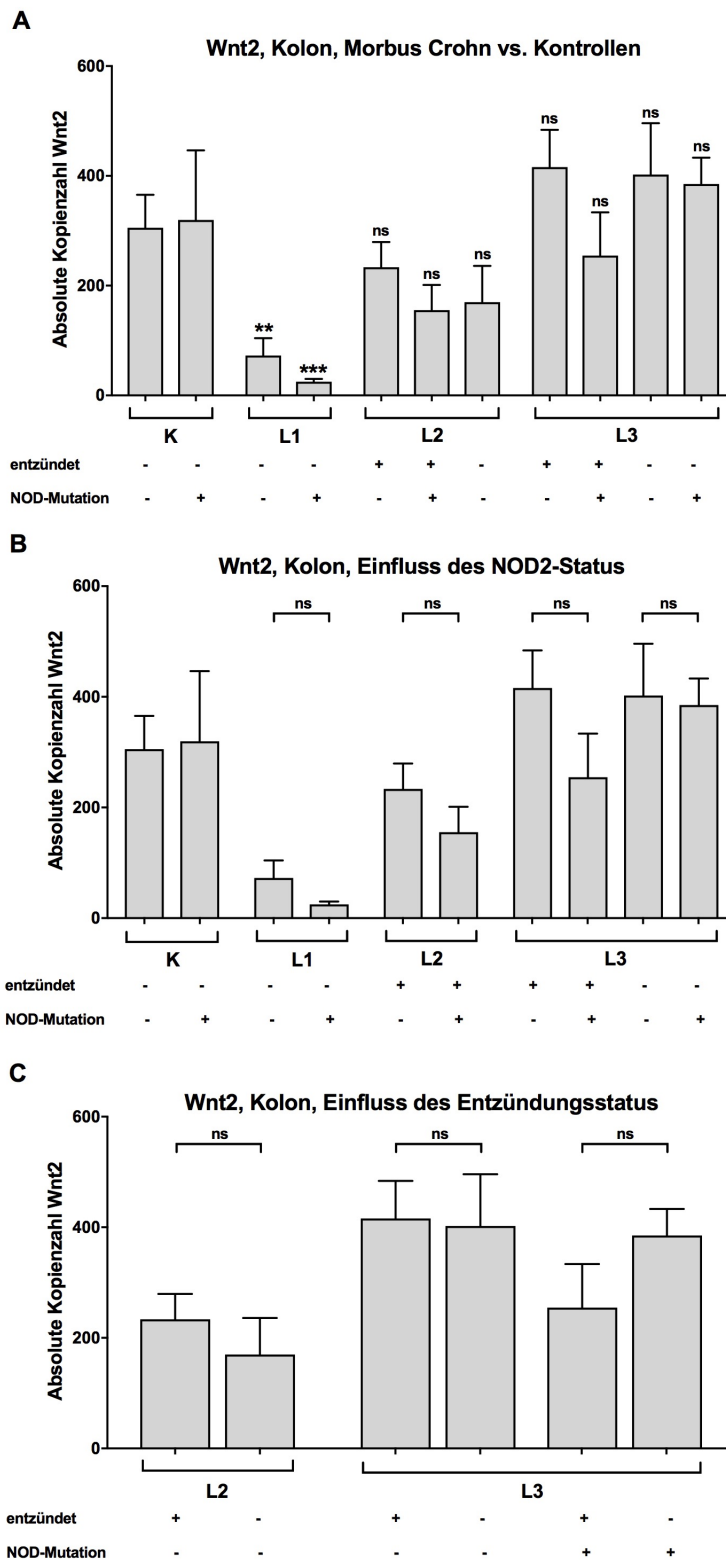


**Abbildung 15: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von Wnt1 in Kolonbiopsien**

Gezeigt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt1 im Kolon. Die Expression von Wnt1 in 10 ng/ $\mu$ l RNA von Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

#### **3.4.2 Niedrigere Expression von Wnt2 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und tendenziell höhere Expression bei Ileum-Kolonbefall**

Die absoluten Kopienzahlen von Wnt2 im Kolon von gesunden Kontrollen und MC-Patienten sind in Abbildung 16 abgebildet. Gegenüber den Kontrollen war die Expression von Wnt2 im Kolon bei MC mit Ileumbefall signifikant erniedrigt (L1, NOD2-Wildtyp: \*\*  $p = 0,0048$ ; L1, NOD2-Mutation: \*\*\*  $p = 0,0003$ ), wohingegen sie im Phänotyp L3 tendenziell erhöht war. MC-Patienten mit Kolonbefall (L2, L3) zeigten eine deutlich höhere Expression als MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) (Abbildung 16A). Im Falle einer NOD2-Mutation wiesen MC-Patienten gegenüber ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisation (L1, L2, L3) sowie identischem Entzündungsstatus die Tendenz zu einer geringeren Expression von Wnt2 auf. Der Effekt war ohne statistische Signifikanz (Abbildung 16B). Der Entzündungsstatus bewirkte in den Befallsgruppen L2 und L3 bei jeweils identischem NOD2-Status keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Wnt2 (Abbildung 16C). Diese Erkenntnisse werden durch die vorliegende Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Die Einzelwerte sind im Anhang (Abbildung 30) veranschaulicht. Zudem ist die Expression von Wnt2 im Anhang (Abbildung 34A, B, C) unter Normierung auf HPRT1 dargestellt.

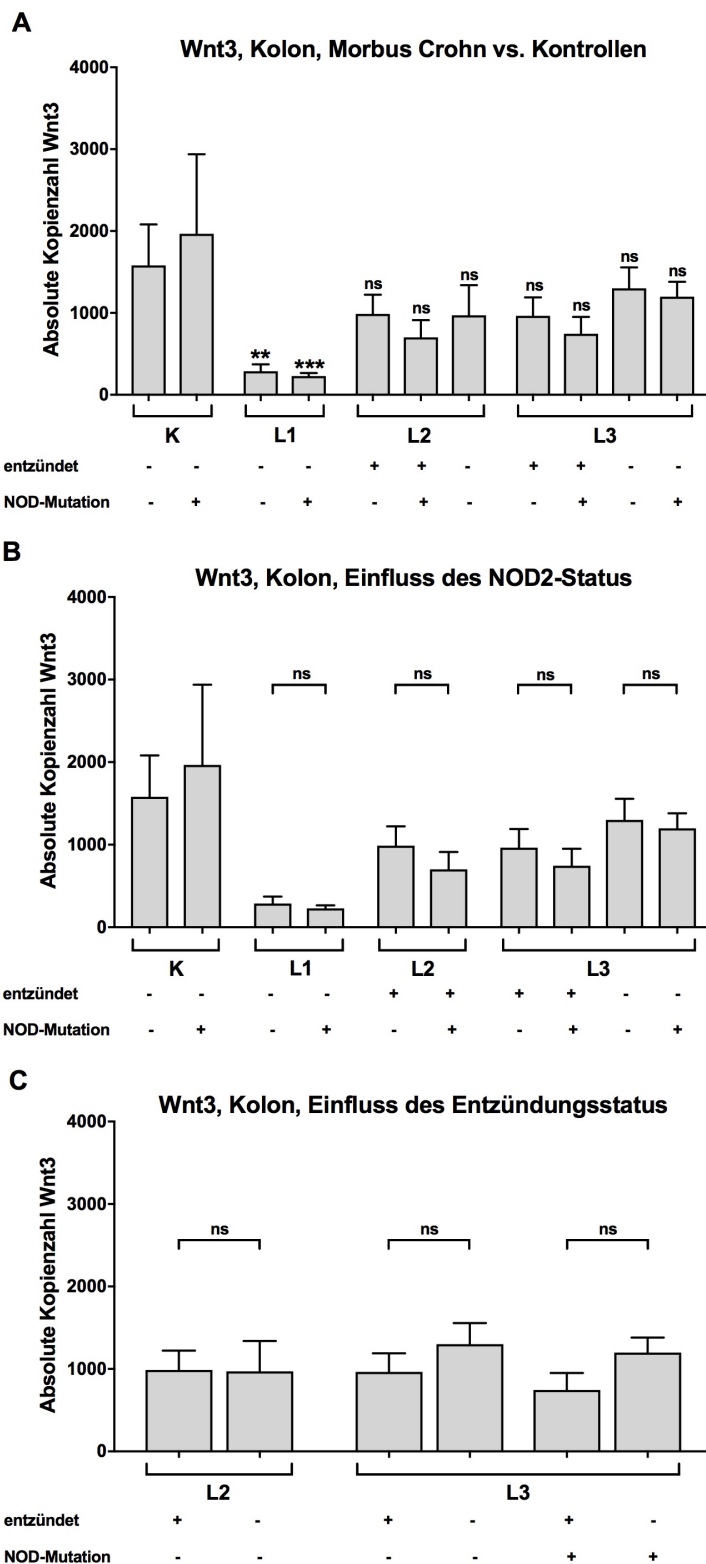


**Abbildung 16: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von Wnt2 in Kolonbiopsien**

Gezeigt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt2 im Kolon. Die Expression von Wnt2 in 10 ng/ $\mu$ l RNA von Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Nicht-signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; *Unpaired t-test*).

#### **3.4.3 Niedrigere Expression von Wnt3 im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und geringeres Wnt3-Defizit bei (Ileum-)Kolonbefall**

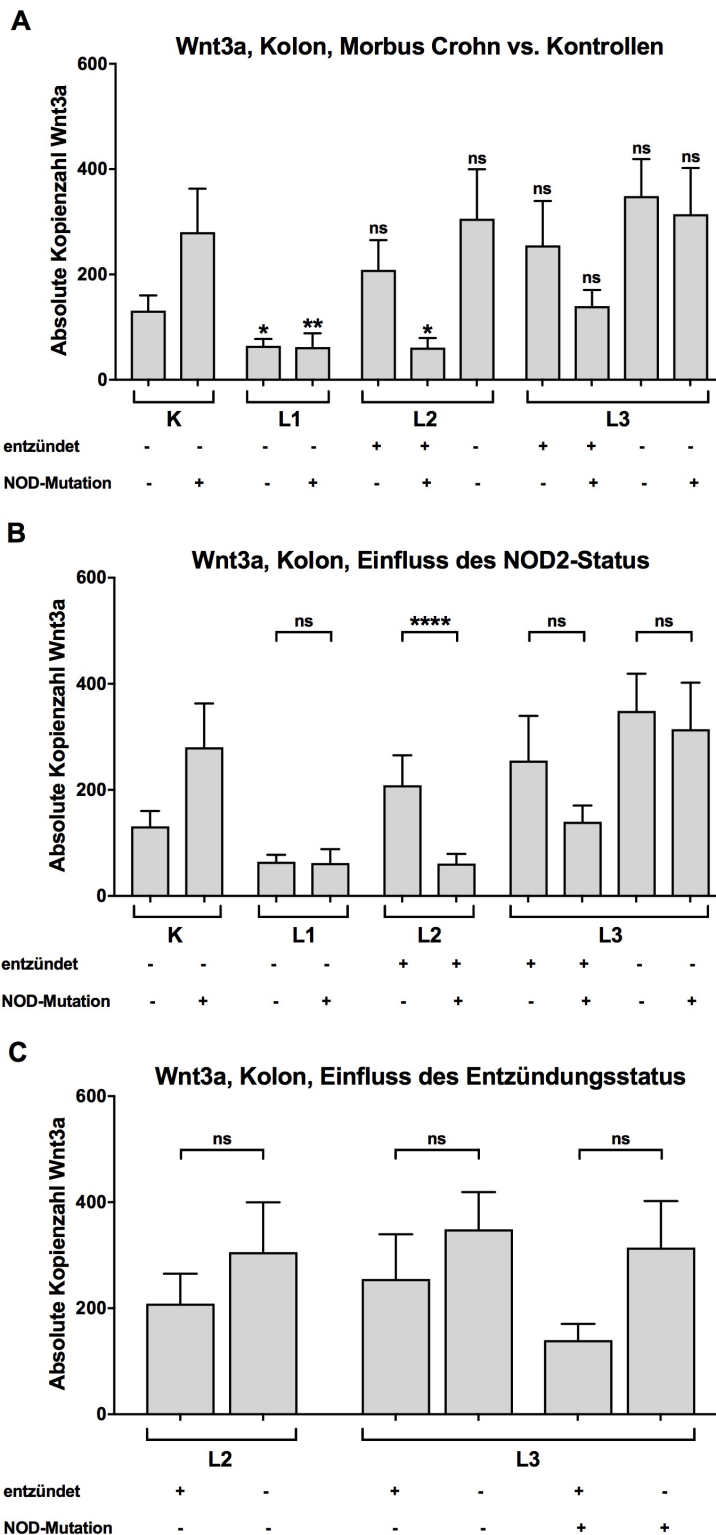
In Abbildung 17 sind die Expressionslevel von Wnt3 im Kolon von gesunden Kontrollgruppen und MC-Patienten aufgezeigt. Die Expression von Wnt3 war im Befallstyp L1 gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (L1, NOD2-Wildtyp: \*\*  $p = 0,0033$ ; L1, NOD2-Mutation: \*\*\*  $p = 0,0009$ ). Bei MC mit Kolonbefall (L2, L3) war die Expression tendenziell ebenfalls geringer als bei Kontrollen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Hier fiel auf, dass Patienten mit Kolonbefall (L2, L3) über deutlich höhere Expressionslevel von Wnt3 im Kolon verfügten als Patienten mit Ileumbefall (L1) (Abbildung 17A). Bei einer NOD2-Mutation zeigten MC-Patienten gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisation (L1, L2, L3) sowie identischem Entzündungsstatus die Tendenz zu einer geringeren Expression von Wnt3. Dieser Unterschied war ohne statistische Signifikanz (Abbildung 17B). Bei L3 fand sich bei jeweils identischem NOD2-Status eine tendenziell höhere Expression von Wnt3 im nicht entzündeten Kolon gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe mit Entzündung. Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 17C). Diese Erkenntnisse werden durch diese Arbeit erstmals gezeigt. Im Anhang (Abbildung 31) sind die Einzelwerte dargestellt. Zudem sind die Expressionslevel von Wnt3 unter Normierung auf HPRT1 aufgeführt (Abbildung 35A, B, C).



**Abbildung 17: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von Wnt3 in Kolonbiopsien**  
 Gezeigt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt3 im Kolon. Die Expression von Wnt3 in 10 ng/µl RNA von Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Nicht-signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; *Unpaired t-test*).

#### **3.4.4 Niedrigere Expression von Wnt3a im Kolon bei Morbus Crohn mit Ileumbefall und tendenziell höhere Expression bei (Ileum-)Kolonbefall**

Die Kopienzahl von Wnt3a im Kolon bei gesunden Kontrollen und MC-Patienten ist in Abbildung 18 dargestellt. Bei MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) ließen sich gegenüber den Kontrollen signifikant niedrigere Expressionslevel von Wnt3a beobachten (L1, NOD2-Wildtyp: \*  $p = 0,0134$ ; L1, NOD2-Mutation: \*\*  $p = 0,0081$ ). Der Befallstyp L2 zeigte bei einer NOD2-Mutation ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression von Wnt3a als die Kontrollen (\*  $p = 0,0190$ ). Dagegen hatten MC-Patienten mit Kolonbefall (L2, L3) und NOD2-Wildtyp deutlich höhere Expressionslevel von Wnt3a als MC-Patienten mit Ileumbefall (L1). Wenn auch nicht signifikant, wiesen die Befallstypen L2 bzw. L3 mit NOD2-Wildtyp gegenüber den Kontrollen tendenziell erhöhte Expressionslevel von Wnt3a auf (Abbildung 18A). Bei einer NOD2-Mutation fand sich bei MC mit Kolonbefall (L2, L3) gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisierung sowie identischem Entzündungsstatus eine geringere Expression von Wnt3a. Im Befallstyp L2 war dieser Effekt statistisch signifikant (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 18B). Bei L2 bzw. L3 mit jeweils identischem NOD2-Status ließ sich bei Entzündung eine Tendenz zu niedrigeren Kopienzahlen von Wnt3a beobachten (Abbildung 18C). Diese Erkenntnisse werden durch die vorliegende Arbeit erstmals gezeigt. Die Einzelwerte sind im Anhang (Abbildung 32) veranschaulicht. Außerdem ist die Expression von Wnt3a relativ zu dem HG HPRT1 aufgezeigt (Anhang, Abbildung 36A, B, C).



**Abbildung 18: Einfluss von Morbus Crohn auf die Expression von Wnt3a in Kolonbiopsien**  
 Gezeigt sind die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt3a im Kolon. Die Expression von Wnt3a in 10 ng/µl RNA von Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3) ist in den Balkendiagrammen mit SEM dargestellt. Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test; one-way ANOVA). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

#### **3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Analyse von Wnt-Liganden**

Bei MC-Patienten wurden im Kolon deutlich höhere Expressionslevel von Wnt1 gefunden als bei gesunden Kontrollen. Dieser Effekt war bei Patienten mit NOD2-Wildtyp besonders stark und ausschließlich in den Phänotypen L1 und L2 bei einer NOD2-Mutation ohne statistische Signifikanz.

MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) wiesen gegenüber gesunden Kontrollen eine signifikant geringere Expression der Wnt-Liganden Wnt2, Wnt3 und Wnt3a im Kolon auf. Dagegen zeigten MC-Patienten mit Kolonbefall (L2, L3) deutlich höhere Wnt-Level als Patienten mit Ileumbefall (L1). Bei MC mit Ileum-Kolonbefall (L3) waren die Expressionslevel der Wnt-Liganden auch im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, allerdings ohne signifikanten Unterschied.

MC-Patienten zeigten bei einer genetischen NOD2-Mutation gegenüber ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe mit NOD2-Wildtyp und identischer Befallslokalisierung (L1, L2, L3) sowie identischem Entzündungsstatus die Tendenz zu einer geringeren Expression von Wnt-Liganden.



## **3.5 Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Genen in Kolonkarzinomgewebe**

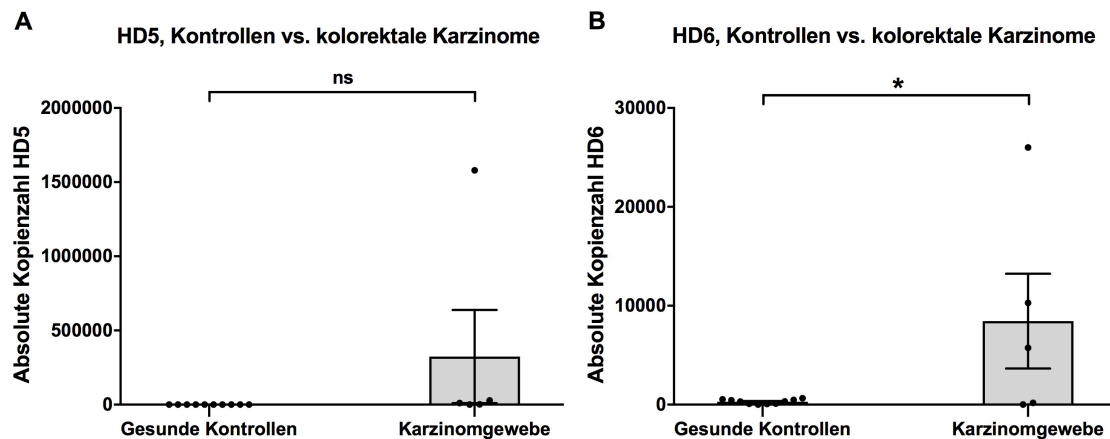
### **3.5.1 Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren in Kolonkarzinomen**

Bisher gibt es Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen metaplastischen Paneth-Zellen und der Entstehung von CRC. So wurden metaplastische Paneth-Zellen in CRCs gefunden (vgl. Wada et al., 1992) und es konnte bereits die Expression von HD6 in kolorektalen Adenomen und CRCs gemessen werden (Mothes et al., 2010). Ziel war es, diesen Hinweisen im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter nachzugehen. Zunächst wurden hierzu Proben aus CRCs von 5 Patienten mittels einer qRT-PCR-Analyse auf die Expression von Paneth-Zell-Defensinen untersucht. Als Vergleichsgruppe dienten Kolonbiopsien von gesunden Probanden. So sollte festgestellt werden, ob sich metaplastische Paneth-Zellen in den Karzinomgeweben befinden. Die Ergebnisse sind bezogen auf 10 ng/ $\mu$ l RNA dargestellt.

#### **3.5.1.1 Erhöhte Expression von HD5 und HD6 in Kolonkarzinomen**

In Abbildung 19 ist die absolute Kopienzahl von HD5 (Abbildung 19A) und HD6 (Abbildung 19B) im Kolon von gesunden Kontrollen und in CRCs gezeigt. Im Kolongewebe der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich keine Expression von HD5. Dagegen wurde im Karzinomgewebe eines CRC-Patienten (Patient 3) die Expression von HD5 gemessen (Abbildung 19A).

Bei der gesunden Kontrollgruppe war keine Expression von HD6 im Kolongewebe zu beobachten. Im Gegensatz hierzu exprimierten drei CRC-Patienten (Patient 3, 4 und 5) HD6, wobei das Expressionslevel bei Patient 3 am höchsten war. Im Vergleich zu dem Kolongewebe gesunder Kontrollen war das Expressionslevel von HD6 in den CRCs insgesamt signifikant erhöht (\*  $p = 0,0264$ ) (Abbildung 19B). Im Anhang (Abbildung 37A, B) ist die Expression von HD5 und HD6 jeweils normiert auf das HG  $\beta$ -Actin gezeigt.



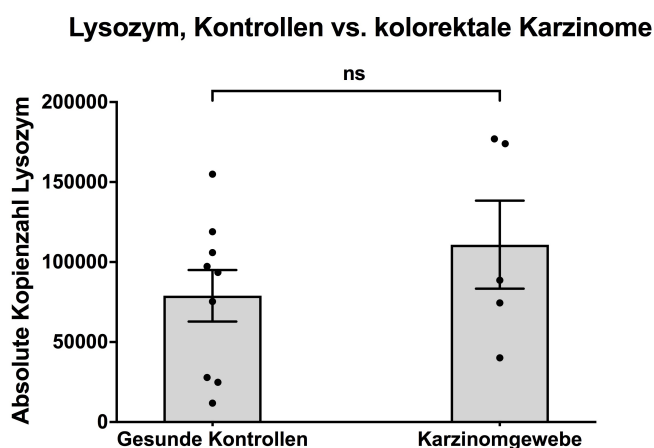
**Abbildung 19: Expression von HD5 und HD6 in Kolonkarzinomen vs. Kontrollen**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5 und HD6 sind in den Balkendiagrammen (+/- SEM) dargestellt. Abgebildet ist die absolute Kopienzahl von A: HD5 und B: HD6 in 10 ng/µl RNA im Kolonkarzinomgewebe von „Colorectal Cancer“ (CRC)-Patienten (n=5). Als Vergleichsgruppe diente das Kolongewebe von gesunden Kontrollen ohne CRC (n=10). A: Nicht-signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und CRC sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). B: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und CRC sind mit \* gekennzeichnet (Unpaired t-test).

### 3.5.1.2 Tendenziell erhöhte Expression von Lysozym in Kolonkarzinomen

Im gesunden Kolon kommt es normalerweise zu keiner erhöhten Lysozym-Expression (Elphick and Mahida, 2005). In einer Vorarbeit wurde jedoch eine erhöhte Lysozym-Expression im Kolon bei MC während der Entzündung beobachtet (vgl. Wehkamp et al., 2004). Dieser Unterschied zeigte sich in dieser Arbeit ebenfalls mit Tendenz (Abbildung 11). Da eine erhöhte Expression der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 in einem Teil des hier untersuchten CRC-Gewebes gemessen wurde (Abbildung 19A, B), lag nahe, dass metaplastische Paneth-Zellen in diesen CRC-Biopsien vorkommen. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich die Lysozym-Expression in CRCs mit metaplastischen Paneth-Zellen verhält.

Die absolute Kopienzahl von Lysozym im Kolon von gesunden Kontrollen und in CRCs ist in Abbildung 20 aufgezeigt. Hier ist zu sehen, dass die Expression von Lysozym in den Karzinomgeweben (vorwiegend bei Patient 2 und Patient 3) tendenziell höher war als im Kolongewebe der gesunden Vergleichsgruppe (Abbildung 20), wobei eine große Streuung zu erkennen ist. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Lysozym sind im Anhang unter Normierung auf das HG  $\beta$ -Actin zu sehen (Abbildung 37C).



**Abbildung 20: Expression von Lysozym in Kolonkarzinomen vs. Kontrollen**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Lysozym sind im Balkendiagramm (+/- SEM) dargestellt. Abgebildet ist die absolute Kopienzahl von Lysozym in 10 ng/ $\mu$ l RNA im Kolonkarzinomgewebe von „Colorectal Cancer“ (CRC)-Patienten (n=5). Als Vergleichsgruppe diente das Kolongewebe von gesunden Kontrollen ohne CRC (n=10). Nicht-signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und CRC sind mit ns gekennzeichnet (*Unpaired t-test*).

### 3.5.2 Analyse von Wnt-Liganden in Kolonkarzinomen mit metaplastischen Paneth-Zellen

In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Expression der antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren HD5, HD6 und Lysozym in CRCs gemessen (Abbildung 19A, B, Abbildung 20). Hiermit konnten bisherige Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon und der Entstehung von CRCs bestätigt werden (vgl. Mothes et al., 2010; Wada et al., 1992). Der Mechanismus einer möglichen Karzinogenese durch metaplastische Paneth-Zellen im Kolon war jedoch noch unklar.

Im nächsten Schritt wurde das CRC-Gewebe durch eine weitere qRT-PCR-Analyse auf die Expression von Wnt-Liganden untersucht. Als Vergleich diente wiederum die Kolonmukosa der gesunden Kontrollgruppe ohne CRCs. Das Ziel war es zu prüfen, ob metaplastische Paneth-Zellen durch die Sekretion von Wnt-Liganden im Kolon über eine konstitutive Aktivierung der Wnt-Signalkaskade die Entstehung von CRCs fördern könnten. Hierüber gab es bisher noch keine Erkenntnisse. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse sind in den nachfolgenden Balkendiagrammen bezogen auf 10 ng/ $\mu$ l RNA dargestellt (Abbildung 21A-D). Im Anhang (Abbildung 38A-D) sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a normiert auf das HG  $\beta$ -Actin aufgeführt.

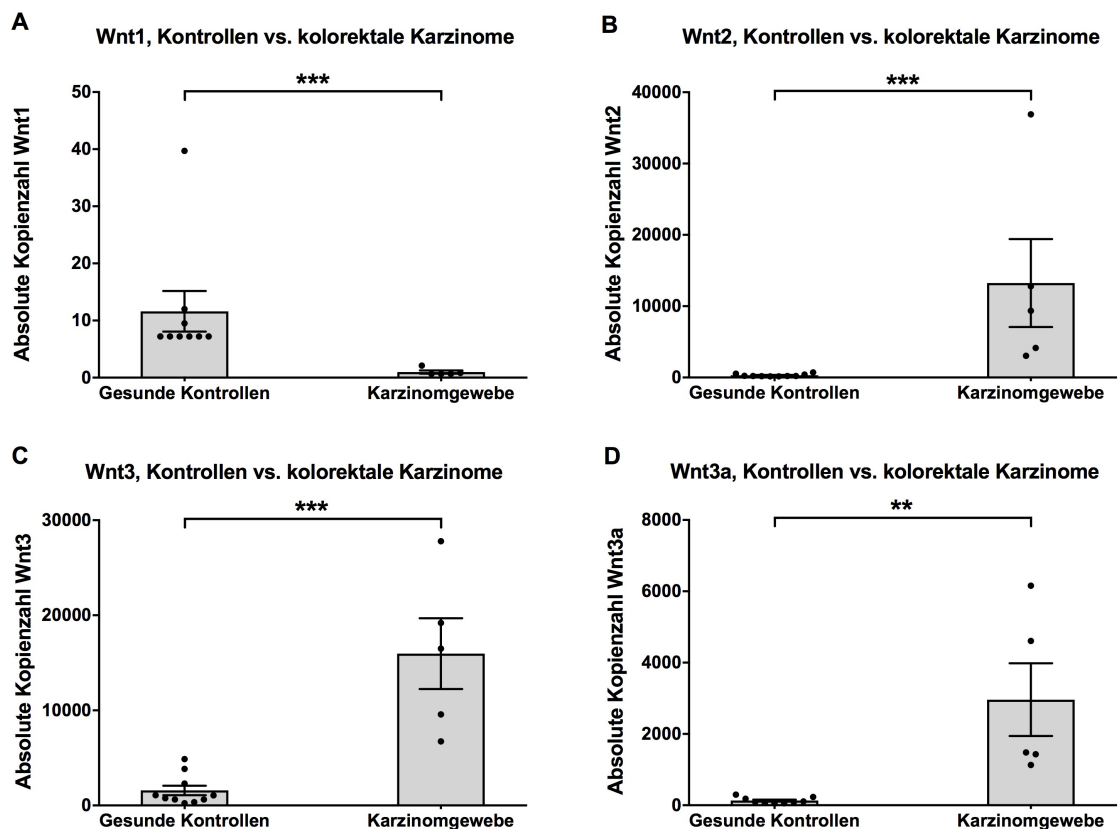
Bei der Expressionsanalyse von Wnt1 in CRCs und im Kolon von Kontrollen fiel auf, dass die gemessenen Kopienzahlen von Wnt1 generell sehr niedrig waren. In den Karzinomgeweben war die absolute Kopienzahl von Wnt1 signifikant niedriger als im Kolon der gesunden Kontrollgruppe (\*\* $p = 0,0005$ ) (Abbildung 21A).

Dagegen zeigten die CRCs gegenüber dem Kolongewebe der Kontrollen eine signifikant erhöhte Expression von Wnt2 (\*\* $p = 0,0007$ ). Dabei waren die Expressionslevel im Karzinomgewebe von Patient 1 und Patient 4 am höchsten (Abbildung 21B).

Auch ließ sich eine deutlich höhere Expression von Wnt3 in den CRCs (vorwiegend bei Patient 1, 3 und 4) beobachten als im Kolon der Vergleichskontrollen. Dieser Unterschied war von statistischer Signifikanz (\*\* $p = 0,0007$ ). Bei Patient 1 fand sich die höchste Expression von Wnt3 im Karzinomgewebe (Abbildung 21C).

Die CRCs wiesen im Vergleich zum Kolon der Kontrollgruppe zudem eine stark erhöhte Expression von Wnt3a auf, wobei der Unterschied statistisch signifikant war (\*\* $p = 0,0023$ ). Im Karzinomgewebe der Patienten 1 und 4 war die absolute Kopienzahl von Wnt3a am höchsten (Abbildung 21D).

Diese Erkenntnisse werden durch diese Arbeit zum ersten Mal gezeigt.



**Abbildung 21: Expression von Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a in Kolonkarzinomen vs. Kontrollen**  
 Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt-Liganden sind in den Balkendiagrammen (+/- SEM) dargestellt. Abgebildet ist die absolute Kopienzahl von A: Wnt1, B: Wnt2, C: Wnt3 und D: Wnt3a in 10 ng/ $\mu$ l RNA im Kolonkarzinomgewebe von CRC-Patienten (n=5). Als Vergleichsgruppe diente das Kolongewebe von gesunden Kontrollen ohne CRC (n=10). A, B, C: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und CRC sind mit \* gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). D: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und CRC sind mit \* gekennzeichnet (*Unpaired t-test*).

### 3.5.3 Zusammenfassung der Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Faktoren in Kolonkarzinomen

Die Expression der antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren HD5, HD6 und Lysozym war in den untersuchten Proben aus Kolonkarzinomen gegenüber Kolongewebe von gesunden Kontrollen erhöht. Hierbei war der Unterschied im Expressionslevel von HD6 statistisch signifikant.

Gegenüber Gesunden zeigten sich signifikant erhöhte Expressionslevel der Wnt-Liganden Wnt2, Wnt3 und Wnt3a im untersuchten Karzinomgewebe. Die Expression von Wnt1 war im Karzinomgewebe signifikant geringer als im Kolon der Kontrollgruppe.

### **4. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit vermittelt neue Erkenntnisse zu den Pathomechanismen bei Morbus Crohn mit Kolonbefall hinsichtlich der Rolle von metaplastischen Paneth-Zellen. Mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse wurde näher dargelegt, dass die Expression von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren bei MC im Kolon abhängig von Entzündungsstatus und NOD2-Status variiert. Es folgte eine quantitative Analyse von bakterieller 16S rRNA im Kolon. Hierdurch konnte erstmals aufgezeigt werden, dass die Bakterienmenge im Kolongewebe bei MC-Patienten möglicherweise durch die Defensin-Expression von metaplastischen Paneth-Zellen beeinflusst werden kann. Außerdem wurden erste Kenntnisse über die Expressionslevel von Wnt-Liganden im Kolon bei MC-Patienten mit metaplastischen Paneth-Zellen erlangt. Darüber hinaus konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC und CRC bestätigt werden. Der genaue Mechanismus einer möglichen Karzinogenese aus metaplastischen Paneth-Zellen ist bisher noch unklar. In diesem Kontext wurde zum ersten Mal aufgedeckt, wie sich die Expression der Stammzellen-induzierenden Wnt-Liganden in Karzinomgewebe mit metaplastischen Paneth-Zellen tendenziell verhält. Somit konnte neues Wissen darüber gewonnen werden, wie metaplastische Paneth-Zellen im Kolon auf ihre Umgebung einwirken. Im Folgenden werden einige Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit erörtert.

#### **4.1 Reproduzierbarkeit von Erkenntnissen zu Paneth-Zell-Defensinen im Ileum**

Paneth-Zellen kommen normalerweise im Dünndarm vor, wo sie vorwiegend im Ileum lokalisiert sind. Durch die Sekretion von AMPs bilden sie einen wichtigen Bestandteil der mukosalen Barriere des Wirtsorganismus gegenüber pathogenen Mikroorganismen (Jones and Bevins, 1992; Peterson and Artis, 2014). Daher ist es nicht verwunderlich, dass in der Pathogenese von MC mit Ileumbefall verschiedene Defekte der Paneth-Zellen gefunden wurden (Cadwell et al., 2008; Courth et al., 2015; Koslowski et al., 2009; Lala et al., 2003; Wehkamp et al., 2004). Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die bisher

unbekannte Rolle von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC zu gewinnen. In einem ersten Schritt wurde die Expression der  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 im Ileum mittels qRT-PCR gemessen. Hierbei konnten die Kenntnisse aus Arbeiten von Courth *et al* (2015), Lala *et al* (2003) und Wehkamp *et al* (2004) erfolgreich reproduziert werden, indem eine geringere Kopienzahl der  $\alpha$ -Defensine HD5 und HD6 im Ileum bei MC mit Ileumbefall und MC mit Ileum-Kolonbefall gegenüber der gesunden Kontrollgruppe bestätigt wurde (Abbildung 7A, Abbildung 8A). Bei der NOD2-Mutation SNP13 war der Effekt besonders bei MC mit Ileumbefall noch deutlicher ausgeprägt (Abbildung 7B, Abbildung 8B), wie auch in einer Vorarbeit von Wehkamp *et al* (2005b) dargelegt werden konnte. Damit konnte bestätigt werden, dass die gestörte Bakterienerkennung bei einer NOD2-Mutation zu einer Verstärkung des Defizits in der Defensin-Expression im Ileum bei MC-Patienten führt. Somit stützen die in dieser Arbeit erhobenen Daten die bisherigen Erkenntnisse über eine verminderte Defensin-Expression bei MC mit Ileumbefall. Bei MC-Patienten mit Ileumbefall und NOD2-Wildtyp konnte in der vorliegenden Arbeit außerdem eine Assoziation zwischen einer verminderten Defensin-Expression im Ileum und Entzündung gefunden werden (Abbildung 7C, Abbildung 8C). Über diesen Effekt gibt es bisher nur wenige vergleichbare Erkenntnisse (Simms *et al.*, 2008). Eine Limitation bei der Datenerhebung war allerdings, dass die Anzahl an zu Verfügung stehenden Ileumbiopsien gering war, insbesondere bei Patienten mit einer SNP13-Mutation. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Entzündungsstatus und der Defensin-Expression im Ileum bei MC-Patienten mit Ileumbefall näher zu beurteilen.

## 4.2 Expression von Paneth-Zell-Faktoren im Kolon bei MC

### 4.2.1 Repräsentativität des Kolonkollektivs für metaplastische Paneth-Zellen

Cunliffe *et al* (2001) konnten zeigen, dass bei MC im Kolon metaplastische Paneth-Zellen auftreten und dass diese humane  $\alpha$ -Defensine exprimieren können. Unklar blieb jedoch, weshalb es zu deren Entstehung bei CEDs im Kolon kommt und in welcher Art und Weise sie auf ihre Umgebung einwirken. Um metaplastische Paneth-Zellen im Rahmen dieser Arbeit genauer zu untersuchen, wurden die Expressionslevel der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 in Kolonbiopsien von MC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen. Für den Vergleich zwischen verschiedenen Individuen wurden die absoluten Kopienzahlen der Target-Gene zum einen auf die pro Probe eingesetzte Menge RNA bezogen. Zum anderen wurden sie auf das „Housekeeping“ Gen (HG) HPRT1 normiert (Daten siehe Anhang), welches gegenüber dem HG  $\beta$ -Actin eine höhere Stabilität im Kolongewebe aufwies. Da Studien zeigen konnten, dass HGs für das Überleben der Zelle benötigt werden (Xia *et al.*, 2017), kann anhand der Höhe ihres Expressionslevels auf die Probenqualität geschlossen werden. Jedoch kann sich ihre Expression in Abhängigkeit verschiedener Parameter verändern, wie z.B. dem Krankheitszustand oder der Medikation eines Patienten (Bustin, 2000; Radonić *et al.*, 2004). Um eine mögliche Beeinflussung der Daten durch Schwankungen in den HG-Leveln zu verhindern, erfolgte die Deutung der Ergebnisse orientiert an der Normalisierung auf 10 ng/ $\mu$ l RNA.

Bei den Kontrollen fand sich keine Expression von HD5 und HD6 im Kolon (Abbildung 9A, Abbildung 10A). Auch zeigte sich keine relative Expression von HD5/HPRT1 und HD6/HPRT1 im Kolon der Kontrollen (siehe Anhang, Abbildung 25A, Abbildung 26A). Da Paneth-Zellen bei Gesunden im Kolon normalerweise nicht vorkommen (Cunliffe *et al.*, 2001), kann die Kontrollgruppe daher als geeignete Negativkontrolle für metaplastische Paneth-Zellen angesehen werden. Bei MC-Patienten fiel dagegen in allen Befallsgruppen (L1: Ileum, L2: Kolon, L3: Ileum und Kolon) eine deutlich erhöhte absolute



Kopienzahl von HD5 und HD6 auf (Abbildung 9A, Abbildung 10A). Dieser Effekt blieb auch bei Angabe der Expression von HD5 und HD6 relativ zu dem HG HPRT1 erhalten (siehe Anhang, Abbildung 25A, Abbildung 26A). Da HD5 und HD6 von Paneth-Zellen gebildet werden, zeigen diese Ergebnisse, dass metaplastische Paneth-Zellen in den hier untersuchten Kolonbiopsien von MC-Patienten vorkommen. Da weder in den Negativkontrollen (LC-Wasser) noch in der Kolonmukosa der gesunden Kontrollprobanden eine Expression von HD5 und HD6 gefunden werden konnte, sind falsch positive Ergebnisse unwahrscheinlich. Darüber hinaus konnte die epitheliale Herkunft von HD5 und HD6 in der Kolonmukosa von Patienten mit MC durch die immunhistochemische Detektion von HD5 und HD6 bestätigt werden. Hier zeigten MC-Patienten mit Ileum-Kolonbefall und Entzündung unabhängig vom NOD2-Status spezifische Antikörperfärbungen von Zellbestandteilen in der Kryptenregion des Kolons (Abbildung 12, Abbildung 13). Anschließend wurde die Expression von Lysozym bestimmt, welches normalerweise vorwiegend von Paneth-Zellen im Dünndarm exprimiert wird (Clevers and Bevins, 2013). MC-Patienten mit Kolonbefall und Patienten mit Ileum-Kolonbefall wiesen bei Entzündung höhere Expressionslevel im Kolon auf als gesunde Kontrollen. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei Angabe der absoluten Kopienzahl von Lysozym beobachten (Abbildung 11A) als auch bei Normierung von Lysozym auf HPRT1 (siehe Anhang, Abbildung 27A). Laut Literatur kommt es bei Gesunden normalerweise nicht zu einer erhöhten Lysozym-Expression im Kolon (Elphick and Mahida, 2005). Neben der höchsten Expression von Lysozym zeigten MC-Patienten mit Kolonbefall und Patienten mit Ileum-Kolonbefall bei Entzündung auch die höchste Expression der Paneth-Zell-spezifischen AMPs HD5 und HD6 (Abbildung 9, Abbildung 10). Daher liegt nahe, dass die gemessene erhöhte Expression von Lysozym im Kolon bei diesen MC-Phänotypen durch metaplastische Paneth-Zellen bedingt wird. Zusammenfassend spiegeln die Daten der Expressionsanalyse von HD5, HD6 und Lysozym im Kolon den aktuellen Kenntnisstand der Wissenschaft wider.

### **4.2.2 Einfluss des genetischen NOD2-Status auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden durch metaplastische Paneth-Zellen**

Im Ileum verfügen Paneth-Zellen bei Gesunden über PRRs wie NOD2. Mit diesen erkennen sie Bakterien, die bereits in das Gewebe eingedrungen sind (Lala et al., 2003; Philpott and Girardin, 2004). Wie in mehreren Studien beschrieben wurde, sind NOD2-Mutationen eher mit der Ausbildung eines MC mit Ileumbefall als eines MC mit Kolonbefall assoziiert (Ahmad et al., 2002; Cuthbert et al., 2002; Lesage et al., 2002; Wehkamp et al., 2004). Im terminalen Ileum kommen auch die meisten Paneth-Zellen vor (Elphick and Mahida, 2005). Vermutlich beeinflusst die Funktion von NOD2 die Expression der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6. So konnte auch in dieser Arbeit (vgl. Kapitel 4.1) reproduziert werden, dass die Expression von Paneth-Zell-Defensinen bei einer NOD2-Mutation im Ileum vermindert ist (vgl. Wehkamp et al., 2004). Wie in Kapitel 4.2.1 erläutert, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass im Kolon von MC-Patienten dagegen erhöhte HD5- und HD6-Level vorkommen. Bei Gesunden werden dort keine  $\alpha$ -Defensine exprimiert (vgl. Cunliffe et al., 2001). Hierbei fiel auf, dass MC-Patienten bei einer NOD2-Mutation tendenziell geringere Expressionslevel von HD5 und HD6 im Kolon aufwiesen als Patienten mit NOD2-Wildtyp bei identischem Befallstyp und Entzündungsstatus (Abbildung 9B, Abbildung 10B). Dies war sowohl bei MC-Patienten mit einer SNP8-Mutation als auch bei einer SNP12- oder SNP13-Mutation im NOD2-Gen der Fall. Wehkamp *et al* (2004) konnten bereits einen solchen Effekt feststellen. Anders als bei HD5 und HD6, zeigten sowohl MC-Patienten mit NOD2-Wildtyp als auch Patienten mit einer NOD2-Mutation bei Kolonbefall und bei Ileum-Kolonbefall in der Entzündung eine erhöhte Expression von Lysozym (Abbildung 11B). Der NOD2-Status scheint somit keinen direkten Einfluss auf die Lysozym-Expression im Kolon zu nehmen, wie ebenfalls durch Wehkamp *et al* (2004) beobachtet werden konnte. Die Datenlage lässt vermuten, dass die Expression von Paneth-Zell-Defensinen in Antwort auf Bakterien nicht adäquat induziert werden kann, wenn die Erkennung bakterieller Bestandteile bei einer Mutation im NOD2-Gen gestört ist. Eine Assoziation zwischen NOD2-Mutationen und der Anfälligkeit für CEDs wurde bereits mehrfach beobachtet

(Economou et al., 2004; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001a). Auch konnten Tan *et al* (2015) in einer weiteren Arbeit feststellen, dass es nach Aktivierung von NOD2 zur Hochregulation von HD5 und HD6 im Darmepithel kam, während dieser Effekt bei einer NOD2-Mutation geringer war. Neben den Paneth-Zellen des Dünndarms scheinen auch die metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei einer NOD2-Mutation von einer derartigen Störung im intrazellulären Pathogen-Erkennungs-System betroffen zu sein. Dagegen wird die Lysozym-Expression dieser Zellen vermutlich nicht durch den genetischen NOD2-Status beeinflusst. Die Vergleichbarkeit mit den Daten von Tan *et al* (2015) und Wehkamp *et al* (2004) zur Rolle des NOD2-Status in der Expression von AMPs bekräftigt diese Annahmen.

### **4.2.3 Einfluss des Entzündungsstatus auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden durch metaplastische Paneth-Zellen**

Bei MC-Patienten mit Kolonbefall und Ileum-Kolonbefall mit NOD2-Wildtyp war die Expression von HD5 und HD6 im Kolon bei Entzündung signifikant höher als in der Vergleichsgruppe ohne Entzündung. Bei Ileum-Kolonbefall und NOD2-Mutation zeigte sich dieser Effekt ebenso mit Tendenz (Abbildung 9C, Abbildung 10C). In der Expressionsanalyse von Lysozym im Kolon fiel ebenfalls auf, dass bei Entzündung tendenziell höhere Expressionslevel vorkamen (Abbildung 11C). Die hier gewonnenen Daten korrelieren sehr gut mit den Daten von Cunliffe *et al* (2001) und Wehkamp *et al* (2004), die schon eine Erhöhung der Defensin-Expression im Kolon bei Entzündung sehen konnten. In Anbetracht dessen, nimmt der Entzündungsstatus vermutlich direkten Einfluss auf die Defensin-Expression durch metaplastische Paneth-Zellen im Kolon. Eine höhere Expression von AMPs bei Entzündung im Kolon legt nahe, dass metaplastische Paneth-Zellen als Reaktion des Immunsystems entstehen könnten, um die beeinträchtigte mukosale Barriere bei MC zu stärken.

### 4.3 Antimikrobielle Funktion der metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC

In einer Studie von metaplastischen Paneth-Zellen im Magen wurde festgestellt, dass diese bei einer *Helicobacter pylori*-Infektion auftreten und die Besiedelung des Bakteriums verringern können (Tanabe et al., 2008). Ein möglicher Einfluss von metaplastischen Paneth-Zellen auf die Bakterien im geschädigten Kolongewebe bei MC war jedoch noch nicht bekannt. In diesem Zusammenhang war es interessant zu erfahren, ob die Höhe der Expressionslevel von Paneth-Zell-Defensinen im Kolon bei MC-Patienten Einfluss auf die Bakterienmenge nehmen könnte. Um auf die bakterielle Beladung im Gewebe zu schließen, wurde das bakterielle 16S rRNA Gen von *E.coli* MC4100 in humanen Kolonbiopsien von MC-Patienten und gesunden Vergleichskontrollen analysiert. Nach Bestimmung der Defensin-Expression im Kolon (siehe Kapitel 3.1.2) war es möglich, MC-Patienten mit metaplastischen Paneth-Zellen und MC-Patienten ohne metaplastische Paneth-Zellen hinsichtlich ihrer 16S rRNA-Expression im Kolongewebe zu vergleichen: Eine hohe HD5- und HD6-Expression im Kolon von MC-Patienten deutet auf metaplastische Paneth-Zellen hin. Dagegen kann bei Patienten ohne nennenswerte Defensinlevel davon ausgegangen werden, dass diese nicht über solche Zellen verfügen (vgl. Kapitel 4.2.1). MC-Patienten ohne metaplastische Paneth-Zellen wiesen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe eine in etwa 4-fach erhöhte Expression der 16S rRNA auf. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl in Bezug auf 10ng/µl RNA (siehe Abbildung 14) als auch normiert auf HPRT1 (siehe Anhang, Abbildung 28A). Die gegenüber Gesunden deutlich höhere Bakterienmenge im Kolongewebe dieser MC-Patienten, lässt auf eine defekte mukosale Barriere schließen. MC-Patienten mit metaplastischen Paneth-Zellen zeigten gegenüber den Patienten ohne metaplastische Paneth-Zellen eine deutlich geringere absolute Kopienzahl der 16S rRNA (Abbildung 14). Dieser Unterschied war bei Normierung auf das HG HPRT1 statistisch signifikant (Abbildung 28A). Somit könnten metaplastische Paneth-Zellen bei MC für den Wirtsorganismus von Vorteil sein, indem sie durch die Expression von AMPs wie HD5 und HD6 die Bakterienmenge in der

geschädigten Kolonmukosa verringern. Diese Erkenntnisse werden durch die vorliegende Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Wie in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben ist, ist eine solche Korrelation zwischen der Höhe der Expressionslevel von Paneth-Zell-Defensinen und der Bakteriendichte im Dünndarm durchaus bekannt: Dort, wo Paneth-Zellen normalerweise vorkommen, wurde eine deutlich geringere Bakterienmenge beobachtet als im Dickdarm (Darmoul and Ouellette, 1996; Elphick and Mahida, 2005). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass sich metaplastische Paneth-Zellen im Dickdarm bei Gesunden nicht finden und dort bei MC vorzugsweise bei Entzündung auftreten (siehe Kapitel 4.2.3). Dies unterstreicht die Hypothese, dass sie möglicherweise ein Kompensationsversuch des Körpers darstellen: Wenn andere antimikrobielle Mechanismen versagen, könnten sie auftreten, um den fatalen Auswirkungen einer geschädigten mukosalen Barriere bei MC im Kolon entgegenzuwirken. Da diese Arbeit erste Hinweise auf die Auswirkung von metaplastischen Paneth-Zellen bei MC auf die Bakteriendichte im Kolon liefert, sind weitere Untersuchungen nötig, um die Datenlage zu bekräftigen. Darüber hinaus wäre es ein sinnvolles Ziel in zukünftigen Studien zu prüfen, inwiefern sich der gezeigte Effekt von Paneth-Zell-Defensinen auf *E. coli* im Kolon auch auf andere Bakterienstämme übertragen lässt. Für die Aussagekraft der hier gewonnenen Daten spricht, dass die eingesetzte 16S rRNA-Sequenz auch in der Lage war, das Bakterium *E. coli* K12 (Positivkontrolle) zu detektieren (Abbildung 14). Dies deutet darauf hin, dass sie nicht nur auf die Detektion des *E. coli*-Stammes MC4100 limitiert ist, sondern ein breiteres Spektrum an Bakterien der Spezies *E. coli* entdecken konnte.

### **4.4 Expression von Wnt-Liganden im Kolon mit metaplastischen Paneth-Zellen**

Im Ileum weiß man bereits mehr darüber, wie Paneth-Zellen durch die Sekretion von Wnt-Liganden ihr umliegendes Mikromilieu beeinflussen, wie in den Kapiteln 1.3.1 und 1.4.2 näher erläutert ist. Demgegenüber ist die Hauptquelle für Wnt-Signale im Kolon noch nicht bekannt, da hier normalerweise keine Paneth-Zellen vorkommen (Barker, 2013). Auch gab es bisher keine Erkenntnisse darüber, in welchem Verhältnis metaplastische Paneth-Zellen im Kolon Wnt-Liganden exprimieren.

#### **4.4.1 Mögliche Verknüpfung von NOD2-Status und Wnt-Liganden-Expression**

Im Kolon von MC-Patienten mit Ileum-Kolonbefall konnte gegenüber gesunden Kontrollen eine erhöhte Expression von Wnt1 gefunden werden. Dieser Effekt ließ sich tendenziell auch bei Wnt2 und Wnt3a beobachten (Abbildung 15A, Abbildung 16A, Abbildung 18A). Somit führen metaplastische Paneth-Zellen bei MC womöglich zu höheren Wnt-Leveln im Kolon, was in dieser Arbeit erstmals gezeigt wird. Insbesondere Wnt1 wurde im Kolon von MC-Patienten signifikant höher exprimiert als im Kolon der Kontrollen (Abbildung 15A). Hierbei fiel auf, dass vor allem Patienten mit NOD2-Wildtyp hohe Expressionslevel aufwiesen. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass auch bei Analyse der anderen Wnt-Liganden festgestellt werden konnte, dass MC-Patienten mit einer NOD2-Mutation tendenziell niedrigere Expressionslevel im Kolon zeigten als Patienten mit NOD2-Wildtyp (Abbildung 15B, Abbildung 16B, Abbildung 17A, Abbildung 18A). Der Effekt blieb auch bei Normierung von Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a auf das HG HPRT1 konstant (s. Anhang, Abbildung 33B, Abbildung 34B, Abbildung 35B, Abbildung 36B). Die Paneth-Zellen des Ileums benötigen Wnt-Signale für die Expression von  $\alpha$ -Defensinen (Armbruster et al., 2017; Es et al., 2005). So können sie sich über Wnt-Signale selbst regulieren und werden zum anderen von weiteren Quellen für Wnt-Liganden, wie PBMCs, beeinflusst (Courth et al., 2015). Wie in Kapitel 4.2.2 ausgeführt ist, wiesen MC-Patienten mit einer NOD2-Mutation gegenüber MC-Patienten mit NOD2-Wildtyp eine

Tendenz zu geringeren Expressionsleveln der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 im Kolon auf (Abbildung 9B, Abbildung 10B). Abhängig vom NOD2-Status verhält sich die Expression von Wnt-Liganden und Defensinen im Kolon von MC-Patienten somit ähnlich. Daher wird eine verringerte HD5- und HD6-Expression von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC-Patienten mit einer NOD2-Mutation vermutlich nicht nur durch eine Störung im intrazellulären Pathogen-Erkennungs-System bedingt (vgl. Kapitel 4.2.2). Auf Grund der geringeren Expression von Wnt-Liganden durch die metaplastischen Paneth-Zellen könnte bei diesen Patienten zusätzlich ein gestörter autokriner Regulationsmechanismus in der Defensin-Expression vorliegen. Diese Erkenntnisse werden durch diese Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um dieser Beobachtung nachzugehen. In Studien aus dem Ileum konnte allerdings festgestellt werden, dass Defekte im Wnt-Signalweg mit MC mit Ileumbefall assoziiert sind (Beisner et al., 2014; Koslowski et al., 2009; Wehkamp et al., 2007). Somit ist es durchaus wahrscheinlich, dass neben den Paneth-Zellen des Dünndarms auch metaplastische Paneth-Zellen von solchen Defekten betroffen sein könnten. Ein sinnvolles Ziel für weitere Studien wäre es, den Mechanismus einer möglichen Verbindung zwischen dem genetischen NOD2-Status und der Expression von Wnt-Liganden genauer zu untersuchen. Darüber hinaus ist es zumindest denkbar, dass geringere Expressionslevel von HD5 und HD6 im Kolon bei einer NOD2-Mutation darauf hindeuten könnten, dass hier weniger metaplastische Paneth-Zellen vorkommen als bei NOD2-Wildtyp (Abbildung 9B, Abbildung 10B). In diesem Fall könnte die geringere Wnt-Liganden-Expression im Kolon bei einer NOD2-Mutation auch auf geringere Paneth-Zell-Zahlen zurückzuführen sein. Dagegen spricht, dass die Expression von Lysozym im Kolon bei MC-Patienten mit Kolonbefall und Entzündung sowohl bei NOD2-Wildtyp als auch bei einer NOD2-Mutation erhöht war (Abbildung 11B). Im Ileum ist bekannt, dass die Lysozym-Expression hauptsächlich durch Paneth-Zellen bedingt wird (Clevers and Bevins, 2013). Daher deutet die gemessene Lysozym-Expression im Kolon darauf hin, dass metaplastische Paneth-Zellen bei MC-Patienten unabhängig vom genetischen NOD2-Status vorkommen (vgl.

Kapitel 4.2.2). Somit ließe sich die niedrigere Expression von Wnt-Liganden und Defensinen im Kolon bei MC-Patienten mit NOD2-Mutation viel mehr durch einen gestörten Mechanismus in den metaplastischen Paneth-Zellen erklären als durch eine geringere Zellzahl.

### **4.4.2 Wnt-Liganden und die Entstehung der metaplastischen Paneth-Zellen bei MC**

Im Ileum bewirken Wnt-Liganden die Paneth-Zell-Differenzierung (Es et al., 2005). Wie genau es zur Entstehung der Paneth-Zell-Metaplasie im Kolon kommt, ist bisher noch unklar. Okubo and Hogan (2004) konnten allerdings feststellen, dass hyperaktive Wnt-Signale die Festlegung der Stammzelllinie von Lungen-Vorläuferzellen verändern können. In einem *in-vivo* Modell der Maus führten lang andauernde und erhöhte Wnt-Signale in einem zum „Switch“ von Lungen-Vorläuferzellen zu intestinalen Vorläuferzellen. Daher könnten Wnt-Signale als treibende Kraft die Bildung der Paneth-Zell-Metaplasie verursachen. In einer weiteren Studie mit organoiden Kulturen wurde außerdem gezeigt, dass eine erhöhte Wnt3-Expression in Vorläuferzellen möglicherweise deren Differenzierung zu Paneth-Zellen fördert (Farin et al., 2012). Abhängig vom zellulären Kontext können Veränderungen im Wnt-Signalweg jedoch auch zur Ausbildung von anderen, nicht-intestinalen Metaplasien führen. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass es bei der kontinuierlichen Aktivität von  $\beta$ -Catenin in sekretorischen Epithelzellen der Brustdrüse (Miyoshi et al., 2002) und Prostata (Bierie et al., 2003) zu einer Plattenepithelzell-Metaplasie kam. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Prozess der „Transdifferenzierung“ durch zwei Komponenten bedingt wird: Zuerst werden Stammzellen durch wiederholte Schädigungen oder Entzündungen induziert zu proliferieren. Des Weiteren kann sich das Schicksal der Stammzellen verändern, wenn vermehrt Wnt-Signale vorhanden sind oder Wnt-Antagonisten herunterreguliert werden (Okubo and Hogan, 2004).

Die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expressionslevel der Wnt-Liganden Wnt2, Wnt3 und Wnt3a bei MC-Patienten mit Ileumbefall deutlich niedriger waren als bei gesunden Kontrollen und MC-Patienten mit Kolonbefall



und mit Ileum-Kolonbefall (Abbildung 16A, Abbildung 17A, Abbildung 18A). Anhand der Höhe der gemessenen HD5- und HD6-Expression sowie der Expression von Lysozym lässt sich zudem vermuten, dass bei MC mit Kolonbefall und MC mit Ileum-Kolonbefall mehr metaplastische Paneth-Zellen im Kolon vorkommen als bei MC mit Ileumbefall (Abbildung 9A, Abbildung 10A, Abbildung 11A). Somit könnten Wnt-Signale im Kolon von MC-Patienten tatsächlich an der Entstehung der metaplastischen Paneth-Zellen beteiligt sein. Bei MC-Patienten mit hohen HD5- und HD6-Leveln fiel auch gegenüber den gesunden Kontrollen eine signifikant höhere Expression von Wnt1 auf (Abbildung 15A). Bei Ileum-Kolonbefall konnte außerdem eine Tendenz zu höheren Leveln an Wnt2 und Wnt3a beobachtet werden (Abbildung 16A, Abbildung 18A). Als zusätzliche Wnt-Quellen im Kolon könnten metaplastische Paneth-Zellen somit selbst durch autologe Regulation die Entstehung weiterer Paneth-Zell-Metaplasien fördern. Allerdings muss es darüber hinaus noch andere Quellen für Wnt-Liganden im Kolon geben, um die Entstehung der Paneth-Zell-Metaplasie zu initiieren. Neben den Paneth-Zellen sind zirkulierende Entzündungszellen, wie PBMCs, eine zusätzliche Sekretionsquelle von Wnt-Liganden im Darmlumen (Courth et al., 2015). So ist es denkbar, dass zirkulierende Entzündungszellen im Kontext von CEDs wie MC durch ihre Sekretion von Wnt-Liganden zur Entstehung von Paneth-Zellen außerhalb des Dünndarms führen könnten. Dass Wnt-Liganden im Kolon bei Gesunden in konstanten Leveln exprimiert werden, lässt sich aus der Beobachtung schließen, dass bei der gesunden Kontrollgruppe ebenfalls Wnt-Liganden im Kolon gemessen werden konnten (Abbildung 16A, Abbildung 17A, Abbildung 18A). Eine Erhöhung dieser Wnt-Spiegel über das Normalniveau könnte hierbei zur Entstehung der metaplastischen Paneth-Zellen führen, die sich dann wiederum autolog regulieren. Ob und inwiefern PBMCs im Zuge chronischer Entzündungen eine Rolle in der Entstehung von metaplastischen Paneth-Zellen spielen, bleibt eine interessante Theorie, die in weiteren Experimenten untersucht werden muss.

### **4.5 Zusammenhang zwischen metaplastischen Paneth-Zellen und Kolonkarzinomen**

Neben ihren möglichen Vorteilen für den Wirtsorganismus bei MC (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.3) gibt es die Vermutung, dass metaplastische Paneth-Zellen im Kolon mit der Entstehung von CRC in Verbindung stehen. So konnten Wada *et al* (1992) metaplastische Paneth-Zellen in tubulären Adenomen und CRCs finden. Außerdem wiesen Mothes *et al* (2010) die Expression von HD6 in kolorektalen Adenomen und Karzinomen nach. Der genaue Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von metaplastischen Paneth-Zellen und CRC blieb jedoch bislang ungeklärt. Im Zuge der experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden erste Hinweise zu einem möglichen Mechanismus der Karzinogenese gefunden.

#### **4.5.1 Nachweis von Paneth-Zell-Faktoren in Kolonkarzinomen**

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von metaplastischen Paneth-Zellen in CRCs mittels Expressionsanalyse der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 (siehe Kapitel 3.5.1). Bei gesunden Kontrollen konnte keine HD5- und HD6-Expression im Kolon detektiert werden. Wie in Kapitel 3.5.1 (Abbildung 19A, B) dargestellt ist, wies ein CRC-Patient dagegen erhöhte Expressionslevel von HD5 und HD6 auf. Zwei weitere Patienten zeigten eine erhöhte HD6-Expression. Die Daten wurden zudem auf das HG  $\beta$ -Actin normiert (siehe Anhang), welches gegenüber HPRT1 im untersuchten Kolonkarzinomgewebe stabiler war. Hier zeigte sich der gleiche Effekt (Abbildung 37A, B). Da HD5 und HD6 ausschließlich von Paneth-Zellen exprimiert werden, ist davon auszugehen, dass metaplastische Paneth-Zellen in den verwendeten Karzinomgeweben vorkommen. Die Expression von zwei unterschiedlichen Paneth-Zell-Defensinen in den CRCs spricht, neben der Konstanz der Ergebnisse unter verschiedenen Normierungsweisen, für die Aussagekraft der Daten. Damit können bisherige Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon und CRCs bestärkt werden.

Im gesunden Kolon ist normalerweise keine hohe Lysozym-Expression zu messen (Elphick and Mahida, 2005). Jedoch ist diese bei MC in der Entzündung erhöht (vgl. Wehkamp et al., 2004), wie in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abbildung 11A). In den CRCs fiel ebenso eine Erhöhung von Lysozym im Vergleich zu Kontrollen auf (Abbildung 20). Der CRC-Patient (Patient 3) mit der höchsten absoluten Kopienzahl von HD5 und HD6 zeigte auch eine besonders hohe Expression von Lysozym im Karzinomgewebe. Somit trat eine erhöhte Lysozym-Expression in den CRCs zusammen mit hohen Leveln der Paneth-Zell-spezifischen Defensine HD5 und HD6 auf. Deshalb liegt nahe, dass metaplastische Paneth-Zellen zu erhöhten Expressionsleveln von Lysozym in CRCs führen. Allerdings war die Lysozym-Expression auch in CRCs ohne starker HD5- und HD6-Expression höher als im Kolon der gesunden Kontrollen. Daher sind metaplastische Paneth-Zellen wohl nicht ausschließlich für eine gesteigerte Lysozym-Expression in CRCs verantwortlich. Dies ist durchaus plausibel, da Lysozym im Gegensatz zu HD5 und HD6 nicht spezifisch von Paneth-Zellen exprimiert wird (Peters et al., 1989; Rubio, 2011). Schon in frühen Studien wurde Lysozym bereits als möglicher Biomarker in der Diagnostik von CRCs diskutiert (Dubrow et al., 1992; Tichý et al., 1990). Falls metaplastische Paneth-Zellen tatsächlich an der Karzinogenese im Kolon beteiligt sind, wäre es ein denkbarer Ansatz, in Zukunft auch HD5 und HD6 als mögliche Biomarker in der Diagnostik einzusetzen. Nach erfolgter Detektion von metaplastischen Paneth-Zellen, wäre es sinnvoll die betroffenen MC-Patienten enghmaschiger zu kontrollieren. Somit könnte eine mögliche Progression der Metaplasien zu CRCs überwacht werden.

### **4.5.2 Karzinogenese im Kolon: Metaplastische Paneth-Zellen und ihr möglicher Einfluss auf den Wnt-Signalweg**

Da intestinale Stammzellen aus einer einzigen Zelle große Mengen von Epithelzellen bilden können, liegt es nahe, dass sie bei Störungen in ihrer strengen Kontrolle zu Tumorzellen werden können (Barker et al., 2009; Schuijers and Clevers, 2012). Für den Erhalt der Stammzellen im proliferativen Teilungsstatus werden Wnt-Signale benötigt (Pinto et al., 2003). Eine verstärkte

Aktivierung der Wnt-Signalkaskade führt allerdings zur Entstehung von Karzinomen (siehe Kapitel 1.4.3). So kommt es beispielsweise bei einem Defizit des Wnt-Antagonisten APC zu einer ständigen Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-TCF4-Wegs. In der Folge erlangen auch herkömmliche Zellen typische „Stammzell-Charakteristika“ wie Langlebigkeit und andauernde Proliferation (Korinek et al., 1998).

Im Gegensatz zum Dünndarm weiß man weniger über die Komponenten der Stammzellnische im Dickdarm und mögliche Quellen von Wnt-Liganden im Kolon konnten bisher nicht entdeckt werden (Barker, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass MC-Patienten mit metaplastischen Paneth-Zellen tendenziell erhöhte Expressionslevel von Wnt-Liganden aufwiesen (vgl. Kapitel 4.4). Daraus ergab sich die Hypothese, dass metaplastische Paneth-Zellen bei MC im Kolon zu einer übermäßigen Aktivierung der Wnt-Signalkaskade führen könnten. So wäre es möglich, dass sie pro-proliferativ auf Zellen einwirken, die sich differenzieren sollten. Schließlich könnten sie so die Entstehung von CRCs fördern. Um dieser Vermutung auf den Grund zu gehen, wurden die Expressionslevel von Wnt-Liganden in CRCs bestimmt, die bereits positiv für Paneth-Zell-spezifische Faktoren waren (vgl. Kapitel 4.5.1). Dabei zeigten sich signifikant erhöhte Expressionslevel der Wnt-Liganden Wnt2, Wnt3 und Wnt3a in CRCs gegenüber Kontrollen im Kolon (Abbildung 21B-D). Am höchsten war die Expression von Wnt2, Wnt3 und Wnt3a bei einem CRC-Patienten, der auch eine besonders hohe HD6-Expression aufwies. Im CRC-Gewebe eines zweiten Patienten mit deutlich erhöhter HD5- und HD6-Expression fand sich ebenfalls eine Erhöhung von Wnt3 (Abbildung 21B-D). Die Expression von Wnt-Liganden zusammen mit Paneth-Zell-spezifischen Defensinen weist auf metaplastische Paneth-Zellen hin. Somit könnten diese Zellen tatsächlich über die Sekretion von Stammzellen-induzierenden Wnt-Signalen an der Entstehung von CRC beteiligt sein. Dabei stellt sich die Frage, weshalb Paneth-Zellen im Dünndarm Wnt-Signale sezernieren und es dort nicht zur Karzinomentstehung durch eine übermäßige Stimulation von Stammzellen kommt. Auch entstehen Kolonkarzinome generell häufiger als Dünndarmkarzinome (Koo et al., 2012).

Tatsache ist, dass das Paneth-Zell-Stammzell-Kompartiment im Dünndarm strengen Kontrollmechanismen unterliegt. So gibt es dort nur begrenzte Paneth-Zell-Flächen (Sato et al., 2011), wodurch eine übermäßige Proliferation verhindert werden kann. Außerdem exprimieren intestinale Stammzellen im Dünndarm Gene, die über den Abbau von Transmembran-Wnt-Rezeptoren einen negativen Feedback-Mechanismus in der Wnt-Signalkaskade vermitteln (Hao et al., 2012). Darüber hinaus ist die Teilungsrate der Stammzellen im Dünndarm geringer als im Dickdarm (Tomasetti and Vogelstein, 2015). Die Datenlage dieser Arbeit lässt vermuten, dass metaplastische Paneth-Zellen im Kolon kompensatorisch im Zuge von entzündlichen Erkrankungen entstehen. Anders als im Dünndarm fehlen hierbei womöglich Kontrollen der Stammzellinduktion, wodurch die Karzinomentstehung erleichtert sein könnte. Aus dieser Annahme ergibt sich für die Zukunft die Idee, an dieser Stelle therapeutisch einzugreifen.

Neben dem Wnt-Signalweg könnte auch ein anderer Mechanismus zur Entstehung der untersuchten CRCs mit metaplastischen Paneth-Zellen geführt haben. So konnten Wada *et al* (2005) in Kolonmukosa mit metaplastischen Paneth-Zellen vermehrt genetische Varianten, wie K-Ras-Mutationen und „*loss-of-heterozygoty of microsatellitemarkers*“ (LOH-MS), finden. Damit wies die Kolonmukosa mit metaplastischen Paneth-Zellen genetische Varianten auf, die mit der Entwicklung von CRCs im Zusammenhang stehen (siehe Kapitel 1.5). Gemeinsam mit den Daten dieser Arbeit unterstützt dies die Theorie, dass metaplastische Paneth-Zellen eine mögliche Vorstufe von CRCs darstellen. Darüber hinaus gelten Metaplasien generell als Präkanzerose. So haben Patienten mit einer intestinalen Metaplasie bei *Helicobacter pylori*-Infektion im Magen beispielsweise ein erhöhtes Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln (Spence et al., 2017; Stemmermann, 1994). Bei metaplastischen Paneth-Zellen im Magen ist die DNA-Syntheserate gegenüber Paneth-Zellen des Dünndarms erhöht (Stemmermann, 1994). Die Daten der vorliegenden Arbeit zu metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon lassen vermuten, dass eine Erhöhung der Wnt-Signale durch metaplastische Paneth-Zellen ebenso zu einer gesteigerten DNA-Syntheserate führen könnte (siehe Kapitel 3.5.2). Diese

Arbeit liefert erste Hinweise zu diesem möglichen Mechanismus der Karzinogenese im Kolon, jedoch sollte für weitere Aussagen die Anzahl an Kolonkarzinombiopsien erhöht werden. Ausgehend von dieser Grundlage sind letztlich weitere Untersuchungen nötig, um die Erkenntnisse bestärken zu können.

### **4.6 Schlussfolgerung und Ausblick**

In dieser Arbeit konnte der funktionelle Einfluss von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon bei MC erstmalig dargelegt werden. Es fiel auf, dass die Paneth-Zell-spezifischen Defensine HD5 und HD6 im Kolon von MC-Patienten vor allem bei Entzündung erhöht waren. Daher entstehen diese Zellen vermutlich als Versuch des Immunsystems, die geschädigte Darmbarriere bei MC zu stärken. Dafür spricht auch, dass bei MC-Patienten mit hoher Expression von HD5 und HD6 eine deutlich geringere Bakteriendichte im Kolongewebe detektiert wurde als bei MC-Patienten mit niedrigen HD5- und HD6-Expressionsleveln. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Expression von Paneth-Zell-Defensinen und Wnt-Liganden im Kolon von MC-Patienten mit NOD2-Mutation geringer war als bei Patienten ohne NOD2-Mutation. Dies lässt auf eine Störung in der autokrinen Regulation der Defensin-Expression durch Wnt-Signale bei einer NOD2-Mutation schließen. Darüber hinaus wurden im Kolon von MC-Patienten mit starker HD5- und HD6-Expression höhere Expressionslevel von Wnt-Liganden gefunden als bei Gesunden. Daher lässt sich vermuten, dass metaplastische Paneth-Zellen als zusätzliche Wnt-Quellen im Kolon die Entstehung weiterer Paneth-Zell-Metaplasien fördern. Die Entstehung der Paneth-Zell-Metaplasie könnte durch andere Wnt-Quellen, wie beispielsweise PBMCs, initiiert werden. Dieser Theorie ist in Zukunft weiter nachzugehen.

Das Wissen über einen protektiven Effekt der metaplastischen Paneth-Zellen eröffnet neue Perspektiven für zukünftige Therapieverfahren bei CEDs: Paneth-Zell-Defensine könnten möglicherweise als Therapeutika eingesetzt werden, um die beeinträchtigte mukosale Barriere bei MC zu stärken. MC-Patienten mit

NOD2-Mutation könnten besonders durch eine zukünftige therapeutische Anwendung von Paneth-Zell-Defensinen bei MC profitieren.

Über die Detektion von HD5 und HD6 in CRCs konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass metaplastische Paneth-Zellen im Zusammenhang mit CRC stehen. Wenn HD5 und HD6 über den Dünndarm hinaus an anderen Orten exprimiert werden, könnten sie so zukünftig in Form von Biomarkern auf metaplastische Paneth-Zellen als Krebsvorstufen hinweisen. Auch konnte in diesem Kontext erstmals ein möglicher Mechanismus der Karzinogenese aufgedeckt werden: Durch die Erhöhung von Wnt-Leveln über das Normalniveau hinaus führen metaplastische Paneth-Zellen möglicherweise zur Induktion von Stammzellen im Kolon. Da es multiple Entstehungsmechanismen von CRC gibt, ist auch eine vielseitige Krebstherapie sinnvoll. Diese sollte möglichst zielgerichtet sein und abhängig von den individuellen Tumoreigenschaften gestaltet werden. In Anbetracht der hier gezeigten Daten wäre es ein sinnvoller Ansatz, Stammzellen-stimulierende Wnt-Signale von metaplastischen Paneth-Zellen im Kolon durch therapeutische Intervention zu kontrollieren. Somit könnte verhindert werden, dass diese überhand nehmen und zur Krebsentstehung führen können.

### 5. Zusammenfassung

Paneth-Zellen gehören zu den sekretorischen Zellen im Dünndarm. Dort spielen sie eine große Rolle in der antimikrobiellen Verteidigung und der Stammzellregulation, indem sie  $\alpha$ -Defensine und Wnt-Liganden sezernieren. Im gesunden Kolon kommen dagegen keine Paneth-Zellen vor. Es konnte jedoch belegt werden, dass Paneth-Zellen bei chronischen Entzündungen wie Morbus Crohn (MC) auch an anderen Orten auftreten können. Die genaue Funktion dieser metaplastischen Paneth-Zellen bei MC im Kolon und ihr Einfluss auf ihre Umgebung blieben bislang ungeklärt. Anhand der qRT-PCR-Analyse von Paneth-Zell-spezifischen Faktoren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass metaplastische Paneth-Zellen im Kolon vor allem bei MC mit Kolonbefall und MC mit Ileum-Kolonbefall und Entzündung vorkommen. Durch die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden und Wnt-Liganden nehmen sie dort direkten Einfluss auf ihre Umgebung. So konnte hier gezeigt werden, dass MC-Patienten mit hohen Expressionsleveln der Paneth-Zell-Defensine HD5 und HD6 im Kolongewebe eine geringere Bakteriendichte aufwiesen als Patienten mit niedrigen HD5- und HD6-Leveln. Metaplastische Paneth-Zellen könnten demnach die Darmbarriere bei MC durch die Sekretion antimikrobieller Substanzen günstig beeinflussen, indem sie die Bakteriendichte im geschädigten Kolongewebe verringern. Der therapeutische Einsatz von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren könnte eine zukünftige Therapieoption bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen darstellen, um die mukosale Barriere zu stärken.

Bei MC mit Ileumbefall wurden niedrigere Wnt-Level im Kolon gemessen als bei Gesunden. Dagegen zeigte sich bei Kolonbefall und bei Ileum-Kolonbefall die Tendenz zu einer erhöhten Wnt-Liganden-Expression. Da metaplastische Paneth-Zellen auch vor allem bei Kolonbefall und bei Ileum-Kolonbefall detektiert wurden liegt nahe, dass sie über eine Erhöhung von Wnt-Leveln ihre Defensin-Expression selbst regulieren. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass MC-Patienten mit einer NOD2-Mutation gegenüber MC-Patienten ohne NOD2-Mutation sowohl niedrigere Wnt-Level als auch niedrigere Defensinlevel im Kolon aufwiesen. Daher liegt bei einer NOD2-Mutation vermutlich nicht nur eine



Störung der Bakterienerkennung durch die metaplastischen Paneth-Zellen vor, sondern auch ein Defekt in der autokrinen Regulation der Defensin-Expression durch Wnt-Liganden. Aufgrund der erhöhten Wnt-Spiegel bei MC mit metaplastischen Paneth-Zellen lässt sich zudem vermuten, dass diese über Wnt-Liganden die Differenzierung von Vorläuferzellen zu weiteren Paneth-Zell-Metaplasien fördern. Auch ist es denkbar, dass ihre Entstehung bei MC durch die verstärkte Sekretion von Wnt-Signalen im Kolon über andere Quellen initiiert wird.

Des Weiteren liefert diese Arbeit erste Hinweise zu einem möglichen Mechanismus der Karzinogenese aus metaplastischen Paneth-Zellen bei MC. So konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expressionslevel von Wnt-Liganden in kolorektalen Karzinomen mit metaplastischen Paneth-Zellen gegenüber Kontrollen signifikant erhöht waren. Somit erfüllen metaplastische Paneth-Zellen bei MC vermutlich nicht nur günstige Funktionen, indem sie etwa zur antimikrobiellen Verteidigung beitragen. Über die Induktion benachbarter Stammzellen durch Wnt-Liganden könnten sie außerdem bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen mitwirken.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmad, T., Armuzzi, A., Bunce, M., Mulcahy-Hawes, K., Marshall, S.E., Orchard, T.R., Crawshaw, J., Large, O., de Silva, A., Cook, J.T., Barnardo, M., Cullen, S., Welsh, K.I., Jewell, D.P., 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122, 854–866.
- Al Nabhani, Z., Lepage, P., Mauny, P., Montcuquet, N., Roy, M., Le Roux, K., Dussailant, M., Berrebi, D., Hugot, J.-P., Barreau, F., 2016. Nod2 Deficiency Leads to a Specific and Transmissible Mucosa-associated Microbial Dysbiosis Which Is Independent of the Mucosal Barrier Defect. *J. Crohns Colitis* 10, 1428–1436. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw095>
- Armbruster, N.S., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2017. In the Wnt of Paneth Cells: Immune-Epithelial Crosstalk in Small Intestinal Crohn's Disease. *Front. Immunol.* 8, 1204. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01204>
- Autschbach, F., 2004. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: das CED-Handbuch für Klinik und Praxis ; 66 Tabellen. Georg Thieme Verlag.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* 1, 113–118. <https://doi.org/10.1038/77783>
- Backhed, F., 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 307, 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bammann, L.L., Clark, W.B., Gibbons, R.J., 1978. Impaired colonization of gnotobiotic and conventional rats by streptomycin-resistant strains of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 22, 721–726.
- Bansal, P., Sonnenberg, A., 1996. Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 91, 44–48.
- Barker, N., 2013. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., Clevers, H., 2009. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611. <https://doi.org/10.1038/nature07602>
- Be, G., 1981. The physiological importance of the colonic microflora. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 77, 117–131.
- Beaugerie, L., Svrcek, M., Seksik, P., Bouvier, A.-M., Simon, T., Allez, M., Brix, H., Gornet, J.-M., Altwegg, R., Beau, P., Duclos, B., Bourreille, A., Faivre, J., Peyrin-Biroulet, L., Fléjou, J.-F., Carrat, F., CESAME Study Group, 2013. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 145, 166–175.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.044>
- Beisner, J., Teltschik, Z., Ostaff, M.J., Tiemessen, M.M., Staal, F.J.T., Wang, G., Gersemann, 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. *Am. J. Physiol.*

- Gastrointest. Liver Physiol. 307, G487-498.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00347.2013>
- Bernard, P., Fleming, A., Lacombe, A., Harley, V.R., Vilain, E., 2008. Wnt4 inhibits beta-catenin/TCF signalling by redirecting beta-catenin to the cell membrane. *Biol. Cell* 100, 167–177. <https://doi.org/10.1042/BC20070072>
- Bevins, C.L., Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Bierie, B., Nozawa, M., Renou, J.-P., Shillingford, J.M., Morgan, F., Oka, T., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Miyoshi, K., Wagner, K.-U., Robinson, G.W., Hennighausen, L., 2003. Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene* 22, 3875–3887.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206426>
- Bonen, D.K., Ogura, Y., Nicolae, D.L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F.F., Foster, S.J., Duerr, R.H., Brant, S.R., Cho, J.H., Nuñez, G., 2003. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124, 140–146.  
<https://doi.org/10.1053/gast.2003.50019>
- Boyle, J.P., Parkhouse, R., Monie, T.P., 2014. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.* 4. <https://doi.org/10.1098/rsob.140178>
- Bustin, S., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.  
<https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Cadigan, K.M., Nusse, R., 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286–3305.
- Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., Stone, C.D., Brunt, E.M., Xavier, R.J., Sleckman, B.P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T.S., Virgin, H.W., 4th, 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature07416>
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E., 1988. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8790–8794.
- 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>
- Chen, S., Huang, E.H., 2014. The colon cancer stem cell microenvironment holds keys to future cancer therapy. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 18, 1040–1048. <https://doi.org/10.1007/s11605-014-2497-1>
- Chen, X., Cho, D.-B., Yang, P.-C., 2010. Double staining immunohistochemistry. *North Am. J. Med. Sci.* 2, 241–245. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2241>
- 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., Bäuml, A.J., Bevins, C.L., 2012. Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled

- peptide nanonets. *Science* 337, 477–481.  
<https://doi.org/10.1126/science.1218831>
- Clevers, H.C., Bevins, C.L., 2013. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 289–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>
- Coretti, L., Natale, A., Cuomo, M., Florio, E., Keller, S., Lembo, F., Chiariotti, L., Pero, R., 2017. The Interplay between Defensins and Microbiota in Crohn's Disease. *Mediators Inflamm.* 2017, 8392523. <https://doi.org/10.1155/2017/8392523>
- 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>
- Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., Huot, L., Grandjean, T., Bressenot, A., Delanoye-Crespin, A., Gaillot, O., Schreiber, S., Lemoine, Y., Ryffel, B., Hot, D., Núñez, G., Chen, G., Rosenstiel, P., Chamaillard, M., 2013. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 700–711.  
<https://doi.org/10.1172/JCI62236>
- Cunliffe, R.N., Rose, F., Keyte, J., Abberley, L., Chan, W.C., Mahida, Y.R., 2001. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 48, 176–185.
- Cuthbert, A.P., Fisher, S.A., Mirza, M.M., King, K., Hampe, J., Croucher, P.J.P., Mascheretti, S., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J., Schreiber, S., Lewis, C.M., Mathew, C.G., 2002. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 867–874. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32415>
- Darmoul, D., Ouellette, A.J., 1996. Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.* 271, G68-74.
- Deckx, R.J., Vantrappen, G.R., Parein, M.M., 1967. Localization of lysozyme activity in a Paneth cell granule fraction. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* 139, 204–207. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(67\)90136-2](https://doi.org/10.1016/0005-2744(67)90136-2)
- Dipankar Ghosh, Edith Porter, Bo Shen, Sarah K. Lee, Dennis Wilk, Judith Drazba, Satya P. Yadav, John W. Crabb, Tomas Ganz, Charles L. Bevins, 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.1038/ni797>
- Dubrow, R., Kim, C.S., Eldred, A.K., 1992. Fecal lysozyme: an unreliable marker for colorectal cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 87, 617–621.
- Duchmann, R., May, E., Heike, M., Knolle, P., Neurath, M., Meyer zum Büschenfelde, K.H., 1999. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 44, 812–818.
- Dupont, A., Heinbockel, L., Brandenburg, K., Hornef, M.W., 2014. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal

- mucosa. *Gut Microbes* 5, 761–765.  
<https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972238>
- Eaden, J.A., Abrams, K.R., Mayberry, J.F., 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.
- 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>
- Elphick, D.A., Mahida, Y.R., 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54, 1802–1809.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2005.068601>
- Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Hansson, G.C., 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G341–G347. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2013>
- Es, J.H., van, Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M.M., Clevers, H., 2005. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* 7, 381–386. <https://doi.org/10.1038/ncb1240>
- Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, A., Hammarström, M.-L., 2003. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 90–101.
- Farin, H.F., Van Es, J.H., Clevers, H., 2012. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143, 1518–1529.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.031>
- Gassler, N., 2017. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 8, 150–160. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150>
- Giles, R.H., van Es, J.H., Clevers, H., 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1653, 1–24.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A.M., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.-K., Labigne, A., Zähringer, U., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J., Philpott, D.J., 2003a. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584–1587.  
<https://doi.org/10.1126/science.1084677>
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003b. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J. Biol. Chem.* 278, 8869–8872.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
- Gordon, M.D., Nusse, R., 2006. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* 281, 22429–22433.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R600015200>
- 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>
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., Schreiber, S., 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 39, 207–211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>
- Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P.M., Kirschner, M.W., Porter, J.A., Serluca, F.C., Cong, F., 2012. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature11019>
- 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>
- Haubrich, W.S., 2003. Lieberkühn of the crypts of Lieberkühn. *Gastroenterology* 124, 7. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.1240007>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 10, 413–417.
- Hill, D.A., Artis, D., 2010. Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 623–667. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101330>
- Hooper, L.V., 2001. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* 292, 1115–1118. <https://doi.org/10.1126/science.1058709>
- Hu, G., 1993. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* 12, 763–770. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.763>
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603. <https://doi.org/10.1038/35079107>
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y., Núñez, G., 2000. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 27823–27831. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003415200>
- Jaeger, S.U., Schroeder, B.O., Meyer-Hoffert, U., Courth, L., Fehr, S.N., Gersemann, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Cell-mediated reduction of human  $\beta$ -defensin 1: a major role for mucosal thioredoxin. *Mucosal Immunol.* 6, 1179–1190. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.17>
- Jeejeebhoy, K.N., 2002. Short bowel syndrome: a nutritional and medical approach. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 166, 1297–1302.

- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., Hansson, G.C., 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 352–361. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Jones, D.E., Bevins, C.L., 1992. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* 267, 23216–23225.
- Junginger, T., Hermanek, P., Klimpfing, M., 2002. Sporadische Karzinome und Karzinome im Rahmen hereditärer Syndrome, in: Junginger, T., Hermanek, P., Klimpfing, M. (Eds.), *Klassifikation Maligner Tumoren Des Gastrointestinaltrakts I*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 239–246. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55948-8\\_41](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55948-8_41)
- Justesen, T., Nielsen, O.H., Jacobsen, I.E., Lave, J., Rasmussen, S.N., 1984. The normal cultivable microflora in upper jejunal fluid in healthy adults. *Scand. J. Gastroenterol.* 19, 279–282.
- 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>
- Klöppel, G., Stolte, M., Rüschoff, J., 2013. *Pathologie: Verdauungstrakt und Peritoneum*. Springer-Verlag.
- Koenen, M., Rütger, U., Müller-Hill, B., 1982. Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the lac Z gene of *E. coli*. *EMBO J.* 1, 509–512.
- Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., Clevers, H., 2012. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488, 665–669. <https://doi.org/10.1038/nature11308>
- Koop, I., 2013. *Gastroenterologie compact: Alles für Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., Clevers, H., 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 19, 379–383.
- Koslowski, M.J., Kübler, I., Chamailard, 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, e4496. <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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002523>

- Krenacs, L., Krenacs, T., Raffeld, M., 1999. Antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 115, 85–93. <https://doi.org/10.1385/1-59259-213-9:85>
- 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.
- Langlands, A.J., Almet, A.A., Appleton, P.L., Newton, I.P., Osborne, J.M., Näthke, I.S., 2016. Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biol.* 14, e1002491. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002491>
- Lehrer, R.I., Ganz, T., 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 96–102.
- Lesage, S., Zouali, H., Cézard, J.-P., Colombel, J.-F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Modigliani, R., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Merlin, F., Chamaillard, M., Jannot, A.-S., Thomas, G., Hugot, J.-P., 2002. CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 845–857. <https://doi.org/10.1086/339432>
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Boardman, L.A., Qian, C., Christensen, E., Schmidt, S.S., Roche, P.C., Smith, D.I., Thibodeau, S.N., 2000. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat. Genet.* 26, 146–147. <https://doi.org/10.1038/79859>
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F., 2012. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag.
- Lupp, C., Robertson, M.L., Wickham, M.E., Sekirov, I., Champion, O.L., Gaynor, E.C., Finlay, B.B., 2007. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>
- Marshman, E., Booth, C., Potten, C.S., 2002. The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24, 91–98. <https://doi.org/10.1002/bies.10028>
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., Garcia-Gil, L.J., 2006. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 1136–1145. <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c>



- Medzhitov, R., Janeway, C., 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338–344. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300. <https://doi.org/10.1126/science.1068883>
- Miyoshi, K., Shillingford, J.M., Le Provost, F., Gounari, F., Bronson, R., von Boehmer, H., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Hennighausen, L., Khazaie, K., 2002. Activation of beta-catenin signaling in differentiated mammary secretory cells induces transdifferentiation into epidermis and squamous metaplasias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 219–224. <https://doi.org/10.1073/pnas.012414099>
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.
- Mothes, H., Radeva, M., Jahns, F., Settmacher, U., 2010. Hohe Expression von enterischem  $\alpha$ -Defensin (HD-6) in kolorektalen Adenomen und Karzinomen, in: *Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010*, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 21–22. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-12192-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-12192-0_8)
- Mülhardt, C., 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, 6. Auflage 2009. ed. Springer-Verlag.
- Mushin, R., Dubos, R., 1965. Colonization of the mouse intestine with *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 122, 745–757.
- Niehrs, C., 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2007. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* 56, 1240–1247. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.118646>
- Nusse, R., 2001. An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet.* TIG 17, 443.
- 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., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.-P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H., 2001a. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606. <https://doi.org/10.1038/35079114>
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., Núñez, G., 2001b. Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 276, 4812–4818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008072200>
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., Greenson, J.K., Keshav, S., Nuñez, G., 2003. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52, 1591–1597. <https://doi.org/10.1136/gut.52.11.1591>
- O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>

- Okubo, T., Hogan, B.L.M., 2004. Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J. Biol.* 3, 11.  
<https://doi.org/10.1186/jbiol3>
- Ostaff, M.J., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med.* 5, 1465–1483.  
<https://doi.org/10.1002/emmm.201201773>
- Ouellette, A.J., 2011. Paneth cell  $\alpha$ -defensins in enteric innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 2215–2229. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0714-6>
- 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.
- Paneth, J., 1988. Ueber die secernirenden Zellen des Dünndarm-Epithels. *Arch Mikrosk Anat* 31113-91.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002. Gastrointestinal Carcinoid Tumors Treatment (PDQ®): Patient Version, in: PDQ Cancer Information Summaries. National Cancer Institute (US), Bethesda (MD).
- Peters, C.W., Kruse, U., Pollwein, R., Grzeschik, K.H., Sippel, A.E., 1989. The human lysozyme gene. Sequence organization and chromosomal localization. *Eur. J. Biochem.* 182, 507–516.
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153.  
<https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2004. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.* 41, 1099–1108.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.012>
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., Clevers, H., 2003. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709–1713. <https://doi.org/10.1101/gad.267103>
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Puiman, P.J., Burger-Van Paassen, N., Schaart, M.W., De Bruijn, A.C.J.M., De Krijger, R.R., Tibboel, D., Van Goudoever, J.B., Renes, I.B., 2011. Paneth cell hyperplasia and metaplasia in necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Res.* 69, 217–223.  
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182092a9a>
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856–862.
- Ramanan, D., Cadwell, K., 2016. Intrinsic Defense Mechanisms of the Intestinal Epithelium. *Cell Host Microbe* 19, 434–441.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.003>
- Razumilava, N., Gores, G.J., Lindor, K.D., 2011. Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatol. Baltim. Md* 54, 1842–1852.  
<https://doi.org/10.1002/hep.24570>
- Rehman, A., Sina, C., Gavrilova, O., Häslner, R., Ott, S., Baines, J.F., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2011. Nod2 is essential for temporal development of intestinal

- microbial communities. *Gut* 60, 1354–1362.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>
- Reid, G., Howard, J., Gan, B.S., 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.* 9, 424–428. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02132-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02132-1)
- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2012. Roche Applied Science, Quantifizierungsstrategien mit dem LightCycler 480 PCR-Analysesystem.
- Roon, A.C., von, Reese, G., Teare, J., Constantinides, V., Darzi, A.W., Tekkis, P.P., 2007. The risk of cancer in patients with Crohn’s disease. *Dis. Colon Rectum* 50, 839–855. <https://doi.org/10.1007/s10350-006-0848-z>
- Round, J., Mazmanian, S., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–336. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Rubio, C.A., 2011. Lysozyme expression in microscopic colitis. *J. Clin. Pathol.* 64, 510–515. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.086850>
- Saleh, M., Trinchieri, G., 2011. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 9–20. <https://doi.org/10.1038/nri2891>
- Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Bevins, C.L., Williams, C.B., Bos, N.A., 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* 11, 76–83. <https://doi.org/10.1038/ni.1825>
- Sato, T., van Es, J., Snippert, H., Stange, D., Vries, R., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N., van de Wetering, M., Clevers, H., 2011. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–423. <https://doi.org/10.1038/nature09637>
- Schauber, J., Rieger, D., Weiler, F., Wehkamp, J., Eck, M., Fellermann, K., Scheppach, W., Gallo, R.L., Stange, E.F., 2006. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 615–621.
- Schroeder, B.O., Ehmann, D., Precht, J.C., Castillo, P.A., Küchler, R., Berger, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2014. Paneth cell  $\alpha$ -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/mi.2014.100>
- Schuijers, J., Clevers, H., 2012. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J.* 31, 2685–2696.
- Schwalbe, G., 1872. Beiträge zur Kenntniss der Drüsen in den Darmwandungen, in’s Besondere der Brunner’schen Drüsen. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* 8, 92–140. <https://doi.org/10.1007/BF02955835>
- Scott, E.L., Brann, D.W., 2013. Estrogen Regulation of Dkk1 and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Neurodegenerative Disease. *Brain Res.* 1514, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.12.015>
- Sekirov, I., Finlay, B.B., 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J. Physiol.* 587, 4159–4167. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172742>
- Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6, 551–557. <https://doi.org/10.1038/ni1206>

- Senba, S., Konishi, F., Okamoto, T., Kashiwagi, H., Kanazawa, K., Miyaki, M., Konishi, M., Tsukamoto, T., 1998. Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer* 82, 279–285.
- Shen, B., Porter, E.M., Reynoso, E., Shen, C., Ghosh, D., Connor, J.T., Drazba, J., Rho, H.K., Gramlich, T.L., Li, R., Ormsby, A.H., Sy, M.-S., Ganz, T., Bevins, C.L., 2005. Human defensin 5 expression in intestinal metaplasia of the upper gastrointestinal tract. *J. Clin. Pathol.* 58, 687–694.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.2004.022426>
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 39, 741–748. <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>
- Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D.R., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.-F., Gasche, C., Geboes, K., Jewell, D.P., Karban, A., Loftus, E.V., Peña, A.S., Riddell, R.H., Sachar, D.B., Schreiber, S., Steinhart, A.H., Targan, S.R., Vermeire, S., Warren, B.F., 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 19 Suppl A, 5A–36A.
- Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., Radford-Smith, G.L., 2008. Reduced  $\alpha$ -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57, 903–910.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2007.142588>
- Sina, C., Kemper, C., Derer, S., 2018. The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping intestinal barrier function. *Semin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.008>
- Spence, A.D., Cardwell, C.R., McMenamin, Ú.C., Hicks, B.M., Johnston, B.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., 2017. Adenocarcinoma risk in gastric atrophy and intestinal metaplasia: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 17, 157.  
<https://doi.org/10.1186/s12876-017-0708-4>
- Sprunt, K., Leidy, G., 1988. The use of bacterial interference to prevent infection. *Can. J. Microbiol.* 34, 332–338. <https://doi.org/10.1139/m88-061>
- Stange, 2015. *Entzündliche Darmerkrankungen: Klinik, Diagnostik und Therapie.* Schattauer Verlag.
- Stemmermann, G.N., 1994. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 74, 556–564.
- Sun, X., He, Y., Huang, C., Ma, T.-T., Li, J., 2013. Distinctive microRNA signature associated of neoplasms with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Cell. Signal.* 25, 2805–2811. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.006>
- Tan, G., Zeng, B., Zhi, F.-C., 2015. Regulation of human enteric  $\alpha$ -defensins by NOD2 in the Paneth cell lineage. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 60–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.10.007>
- Tanabe, H., Sato, T., Watari, J., Maemoto, A., Fujiya, M., Fujiya, M., Kono, T., Ashida, T., Ayabe, T., Kohgo, Y., 2008. Functional role of metaplastic paneth cell defensins

- in *Helicobacter pylori*-infected stomach. *Helicobacter* 13, 370–379.  
<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2008.00621.x>
- Thibodeau, S.N., Bren, G., Schaid, D., 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816–819.
- Thompson, C.A., DeLaForest, A., Battle, M.A., 2018. Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Dev. Biol.*  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.006>
- Tichý, M., Bures, J., Jandík, P., 1990. Importance of determining lysozyme in colorectal cancer. *Sb. Vedeckých Pr. Lek. Fak. Karlovy Univ. V Hradci Kralove* 33, 345–349.
- Tomasetti, C., Vogelstein, B., 2015. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347, 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>
- Torres, J., Pineton de Chambrun, G., Itzkowitz, S., Sachar, D.B., Colombel, J.-F., 2011. Review article: colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 497–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04753.x>
- Tyagi, S., Kramer, F.R., 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14, 303–308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>
- Valle, L., 2014. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 9828–9849.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9828>
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- Vollaard, E.J., Clasener, H.A., Janssen, A.J., 1992. Co-trimoxazole impairs colonization resistance in healthy volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 30, 685–691.
- Wada, R., Miwa, H., Abe, H., Santo, R.M., Kitamura, S., Kuwabara, N., Suda, K., Kondo, K., Yamada, S., Hamada, T., 1992. Incidence of Paneth cells in minute tubular adenomas and adenocarcinomas of the large bowel. *Acta Pathol. Jpn.* 42, 579–584.
- Wada, R., Yamaguchi, T., Tadokoro, K., 2005. Colonic Paneth cell metaplasia is pre-neoplastic condition of colonic cancer or not? *J. Carcinog.* 4, 5.  
<https://doi.org/10.1186/1477-3163-4-5>
- Watanabe, T., Kitani, A., Strober, W., 2005. NOD2 regulation of Toll-like receptor responses and the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 54, 1515–1518.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2005.071795>
- Wehkamp, J., Schwind, B., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., Stange, E.F., Fellermann, K., 2002. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1349–1355.
- 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

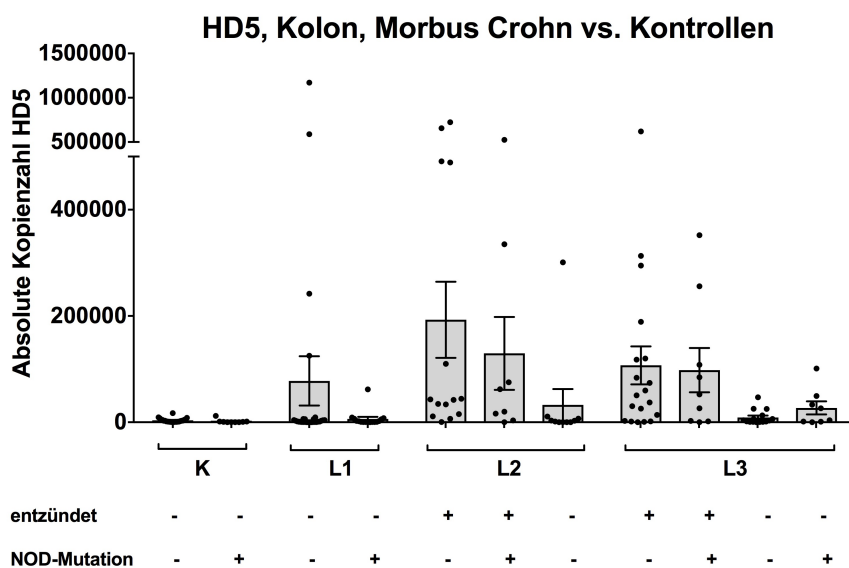
- are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 9, 215–223.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, 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., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Bevins, C.L., Stange, E.F., 2005a. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 406–415. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0265>
- 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., Jr, Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., Bevins, C.L., 2005b. 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>
- Wehkamp, J., Chu, H., Shen, B., Feathers, R.W., Kays, R.J., Lee, S.K., Bevins, C.L., 2006. Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.* 580, 5344–5350. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.083>
- Wehkamp, J., Wang, G., Kübler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R.J., Fellermann, K., Burk, O., Schwab, M., Clevers, H., Bevins, C.L., Stange, E.F., 2007. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 3109–3118.
- Wehkamp, J., Stange, E.F., 2010. Paneth's disease. *J. Crohns Colitis* 4, 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2010.05.010>
- White, S.H., Wimley, W.C., Selsted, M.E., 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 521–527.
- Xia, X., Huo, W., Wan, R., Xia, X., Du, Q., Chang, Z., 2017. Identification of housekeeping genes as references for quantitative real-time RT-PCR analysis in *Misgurnus anguillicaudatus*. *J. Genet.* 96, 895–904.
- Zaslloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhang, Y., Lu, W., Hong, M., 2010. The membrane-bound structure and topology of a human  $\alpha$ -defensin indicate a dimer pore mechanism for membrane disruption. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 9770–9782. <https://doi.org/10.1021/bi101512j>

## 7. Anhang

Nachfolgend sind die Daten der qRT-PCR-Analyse von antimikrobiellen Paneth-Zell-Faktoren (Kapitel 3.1.2), dem 16S rRNA Gen von *E. coli* MC4100 (Kapitel 3.3) und Wnt-Liganden (Kapitel 3.4) im Kolon unter Darstellung der Einzelwerte aufgeführt, um die Streuung der Daten zu veranschaulichen. Zudem sind die Kopienzahlen der gemessenen Zielgene in Kolonbiopsien normiert auf das HG HPRT1 dargestellt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Faktoren in CRCs (Kapitel 3.5) sind normiert auf das HG  $\beta$ -Actin gezeigt.

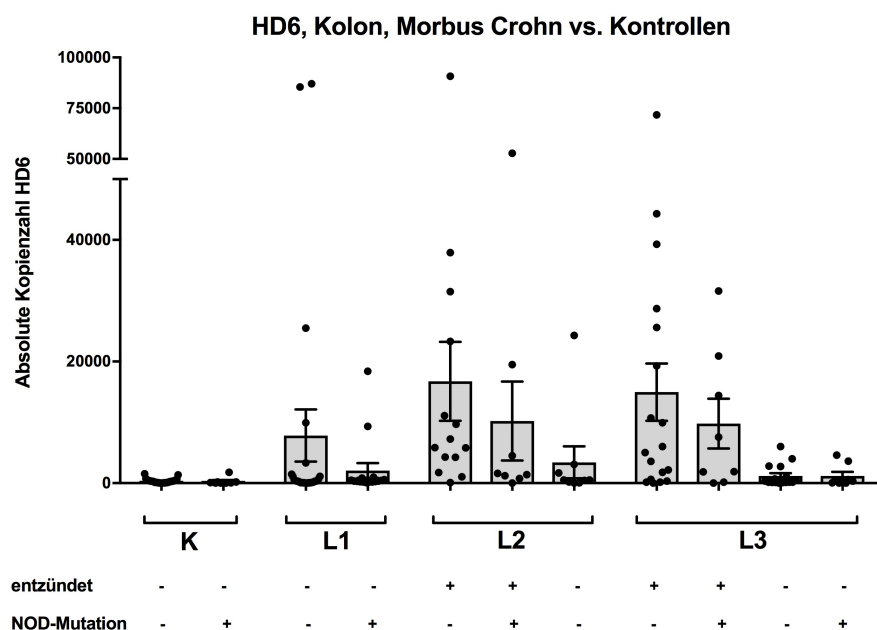
### 7.1 Expression von antimikrobiellen Paneth-Zell-Genen im Kolon

#### 7.1.1 Expression von HD5, HD6 und Lysozym im Kolon mit Streuung



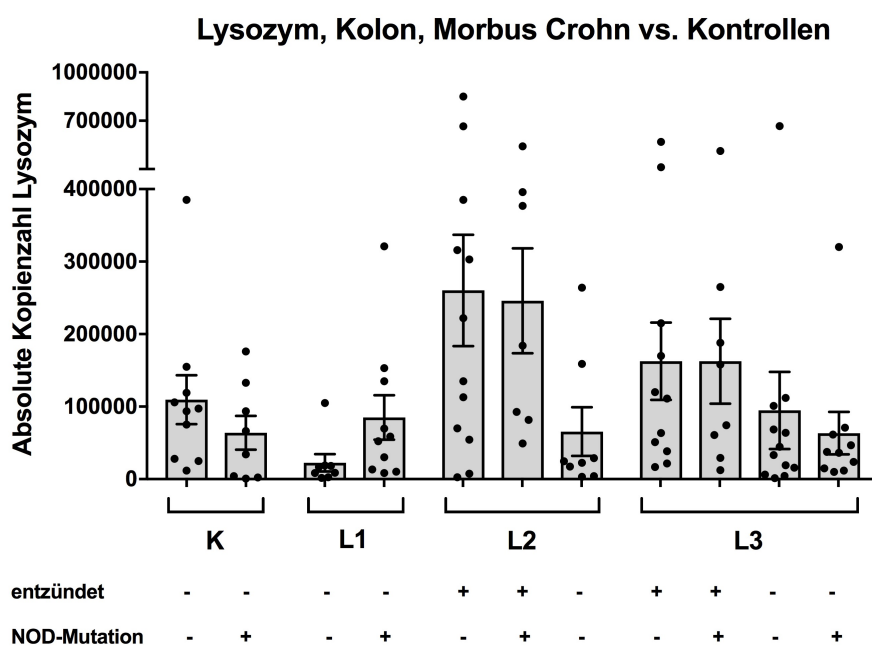
**Abbildung 22: Expression von HD5 im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von HD5 im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von HD5 in 10ng/ $\mu$ l RNA bei Kontrollen (K) (n=34) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=130) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.



**Abbildung 23: Expression von HD6 im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von HD6 im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von HD6 in 10ng/ $\mu$ l RNA bei Kontrollen (K) (n=34) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=130) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.



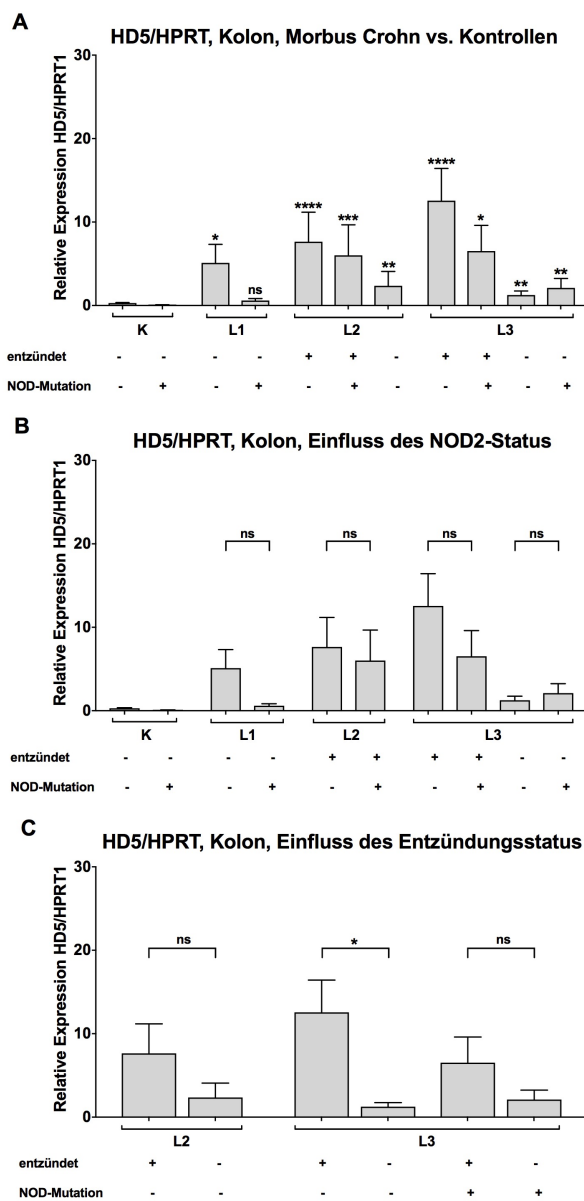
**Abbildung 24: Expression von Lysozym im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Lysozym im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von Lysozym in 10ng/ $\mu$ l RNA bei Kontrollen (K) (n=19) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.



### 7.1.2 Expression von HD5 im Kolon normiert auf HPRT1

MC-Patienten exprimierten bei (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3) signifikant mehr HD5/HPRT1 im Kolon als Kontrollen, tendenziell verstärkt bei NOD2-Wildtyp und Entzündung (Abbildung 25A, B, C).

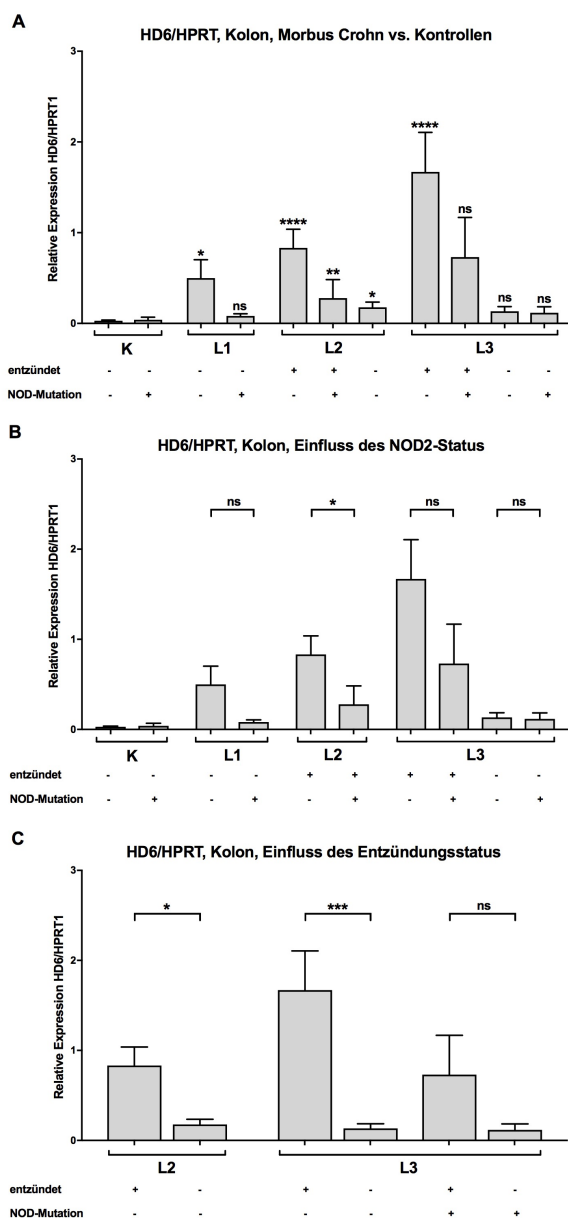


**Abbildung 25: Relative Expression von HD5/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5 im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von HD5/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=34) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=130) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

### 7.1.3 Expression von HD6 im Kolon normiert auf HPRT1

Die Expression von HD6/HPRT1 war bei MC mit (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3), NOD2-Wildtyp und Entzündung signifikant höher als im Kolon der Kontrollen (Abbildung 26A). Bei MC mit (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3) und NOD2-Wildtyp nahm der Entzündungsstatus signifikanten Einfluss auf die Expression von HD6/HPRT1 im Kolon (Abbildung 26C).



**Abbildung 26: Relative Expression von HD6/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD6 im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von HD6/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=34) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=130) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC

abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

### 7.1.4 Expression von Lysozym im Kolon normiert auf HPRT1

MC-Patienten mit (Ileum-)Kolonbefall (L2, L3) zeigten bei Entzündung unabhängig vom NOD2-Status tendenziell erhöhte Expressionslevel von Lysozym/HPRT1 im Kolon (Abbildung 27A). Im Phänotyp L3 nahm der Entzündungsstatus signifikanten Einfluss auf die Expression von Lysozym/HPRT1 (Abbildung 27C).

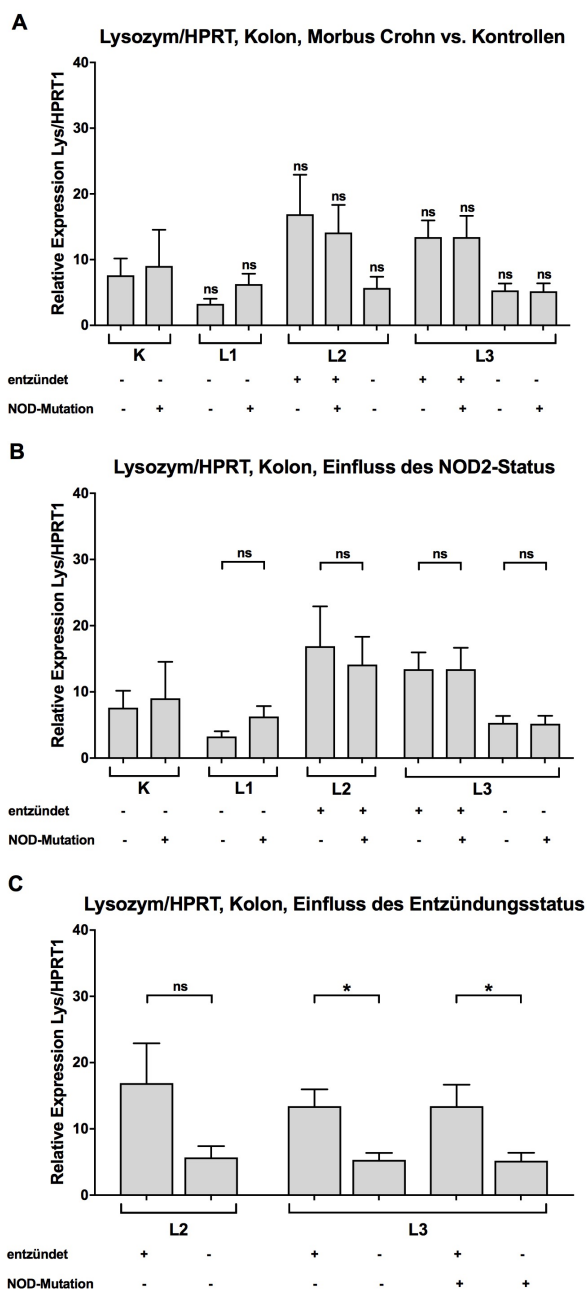
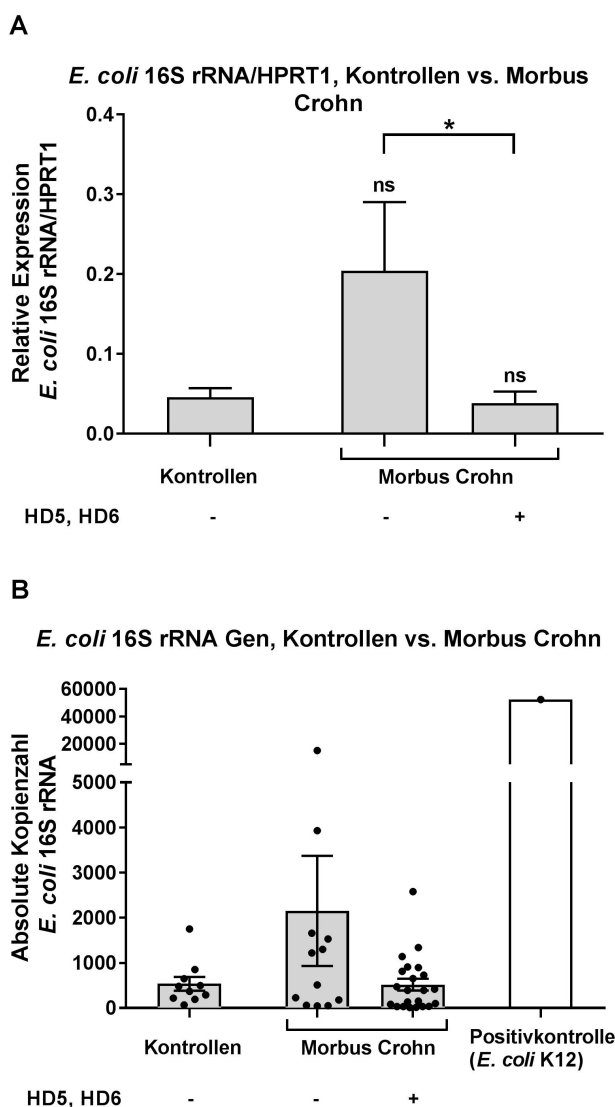


Abbildung 27: Relative Expression von Lysozym/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Lysozym im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von Lysozym/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Nicht-signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

## 7.2 Analyse der Auswirkung von metaplastischen Paneth-Zellen auf Bakterien im Kolon bei MC

Die relative Expression der bakteriellen 16S rRNA/HPRT1 war im Kolongewebe von MC-Patienten mit starker HD5- und HD6-Expression im Kolon signifikant geringer als bei MC-Patienten mit einer niedrigen HD5- und HD6-Expression im Kolon (Abbildung 28A).

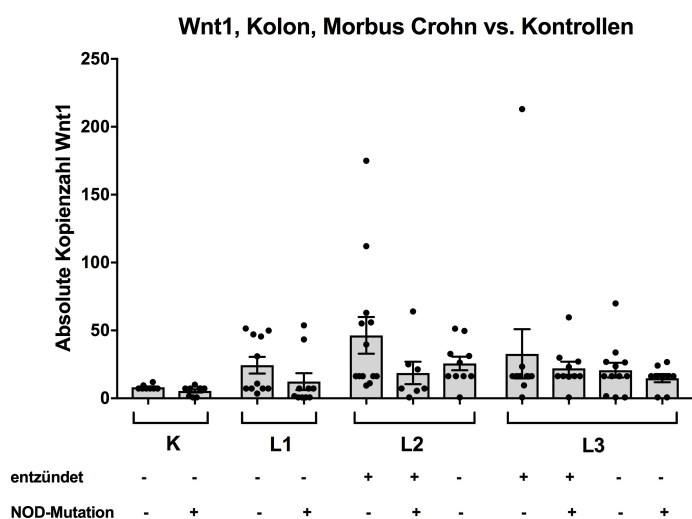


**Abbildung 28: A: *E. coli* 16S rRNA/HPRT1 im Kolon, B: 16S rRNA absolute Kopienzahl (Streuung)**  
Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse des bakteriellen 16S rRNA Genes von *E. coli* MC4100 im Kolon sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Dargestellt ist die 16S rRNA-Expression von Morbus Crohn (MC)-Patienten mit

niedriger („-“) HD5- und HD6-Expression im Kolon (n=12) und hoher („+“) HD5- und HD6-Expression (n=22). Mitanalysiert wurden gesunde Kontrollen (n=10) sowie in B: *E. coli* K12 (n=1, Positivkontrolle). A: Relative Expression des 16S rRNA Gens normiert auf HPRT1. Über den Balken sind Unterschiede ohne Signifikanz im Vergleich zu Kontrollen durch ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). Über der Klammer sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten mit \* gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). B: Absolute Kopienzahl des 16S rRNA Gens bezogen auf 10ng/μl RNA.

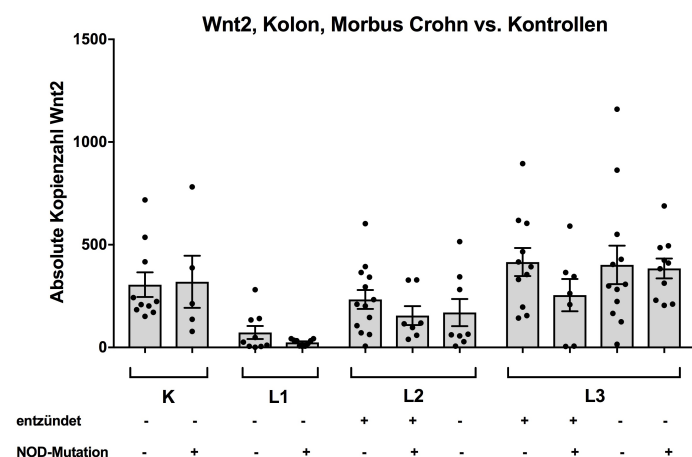
## 7.3 Expression von Wnt-Liganden im Kolon mit metaplastischen Paneth-Zellen

### 7.3.1 Expression von Wnt-Liganden im Kolon mit Streuung



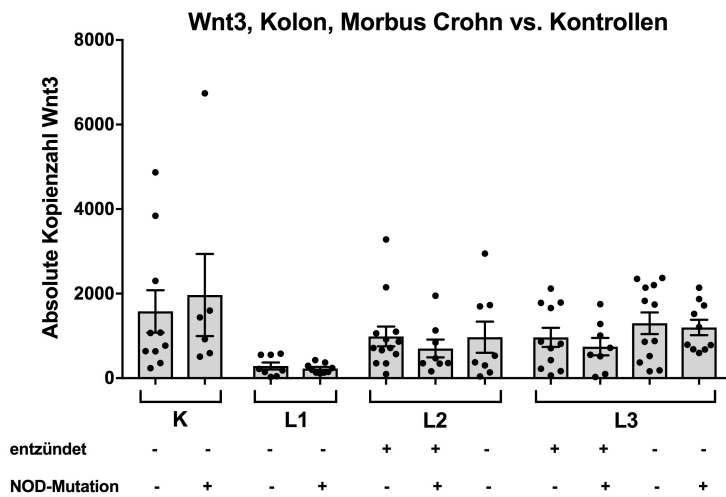
**Abbildung 29: Expression von Wnt1 im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Wnt1 im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von Wnt1 in 10ng/μl RNA bei Kontrollen (K) (n=19) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.



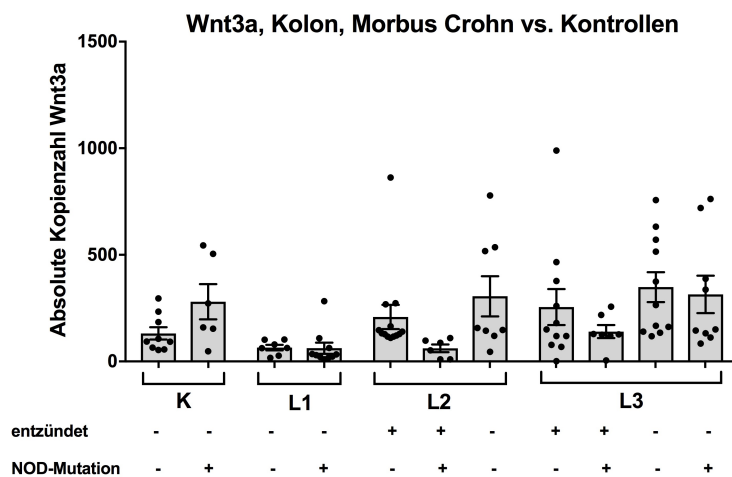
**Abbildung 30: Expression von Wnt2 im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Wnt2 im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von Wnt2 in 10ng/μl RNA bei Kontrollen (K) (n=19) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.



**Abbildung 31: Expression von Wnt3 im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Wnt3 im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von Wnt3 in 10ng/ $\mu$ l RNA bei Kontrollen (K) (n=19) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.

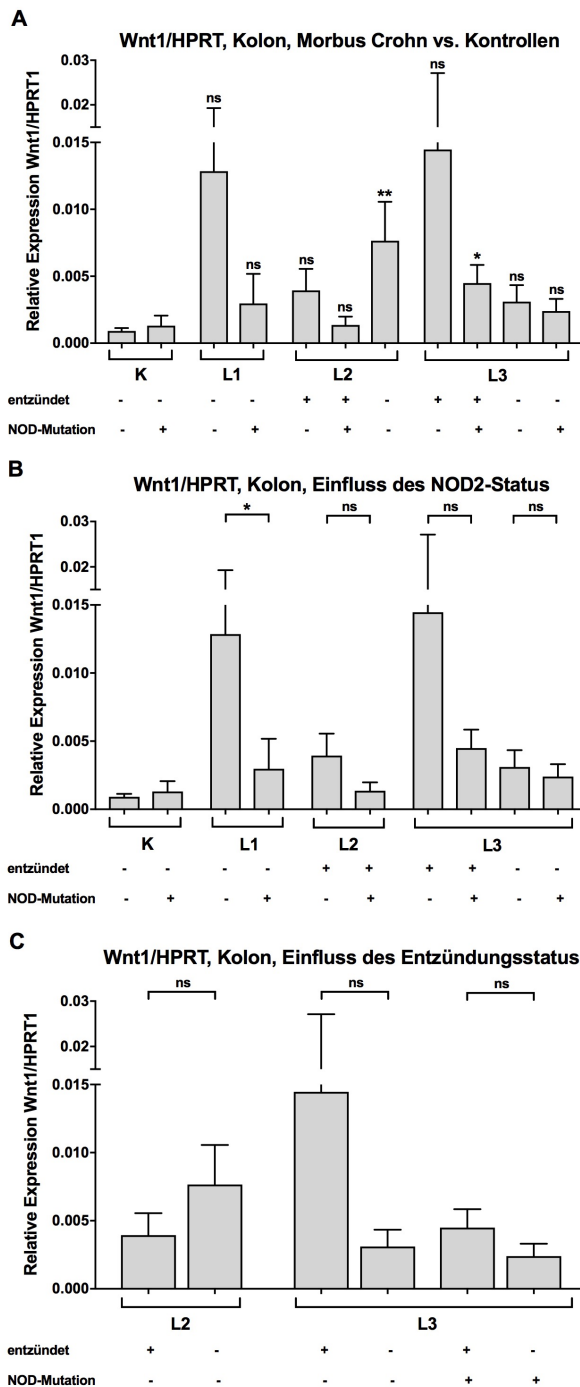


**Abbildung 32: Expression von Wnt3a im Kolon bei Morbus Crohn mit Darstellung der Streuung**

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Wnt3a im Kolon mittels qRT-PCR sind im Balkendiagramm (+/- SEM) gezeigt. Abgebildet ist die Kopienzahl von Wnt3a in 10ng/ $\mu$ l RNA bei Kontrollen (K) (n=19) und Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden.

### 7.3.2 Expression von Wnt1 im Kolon normiert auf HPRT1

MC-Patienten zeigten gegenüber den Kontrollen die Tendenz zu einer erhöhten Expression von Wnt1/HPRT1 im Kolon (Abbildung 33A). MC-Patienten wiesen bei einer NOD2-Mutation tendenziell geringere Expressionslevel von Wnt1/HPRT1 im Kolon auf als Patienten mit NOD2-Wildtyp (Abbildung 33B).



**Abbildung 33: Relative Expression von Wnt1/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn**

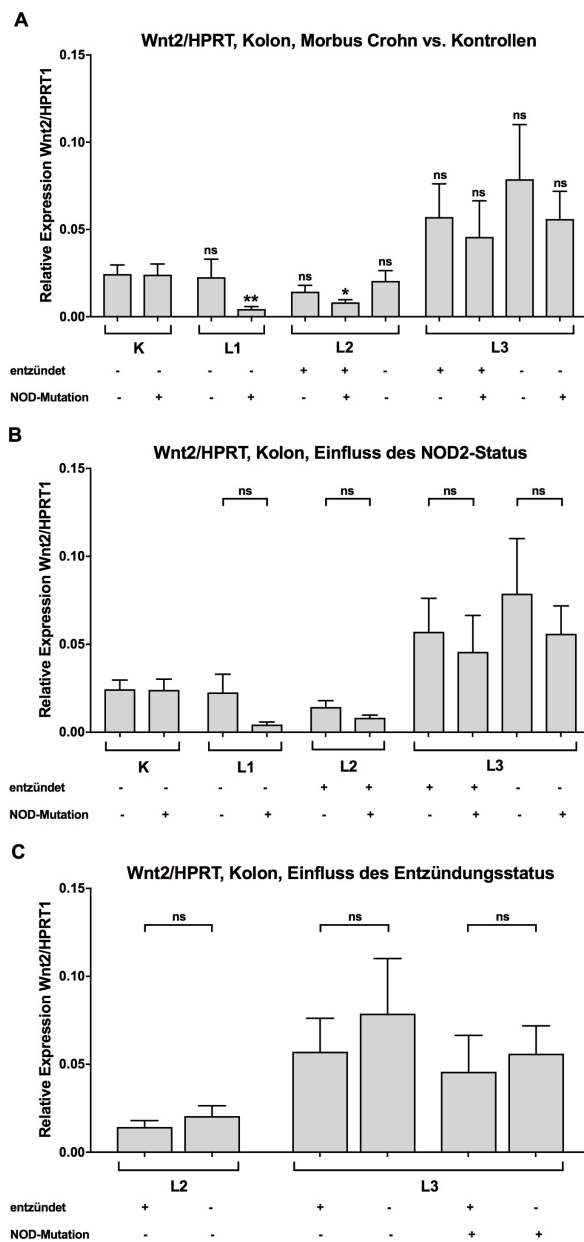
Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt1 im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von Wnt1/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn

Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).



### 7.3.3 Expression von Wnt2 im Kolon normiert auf HPRT1

Bei Ileum- (L1) und Kolonbefall (L2) mit NOD2-Mutation war die Expression von Wnt2/HPRT1 im Kolon bei MC signifikant geringer als bei Kontrollen. Dagegen zeigte sich bei Ileum-Kolonbefall (L3) gegenüber Kontrollen eine tendenziell höhere Expression von Wnt2/HPRT1 (Abbildung 34A). MC-Patienten mit NOD2-Mutation exprimierten tendenziell weniger Wnt2/HPRT1 als Patienten mit NOD2-Wildtyp (Abbildung 34B).



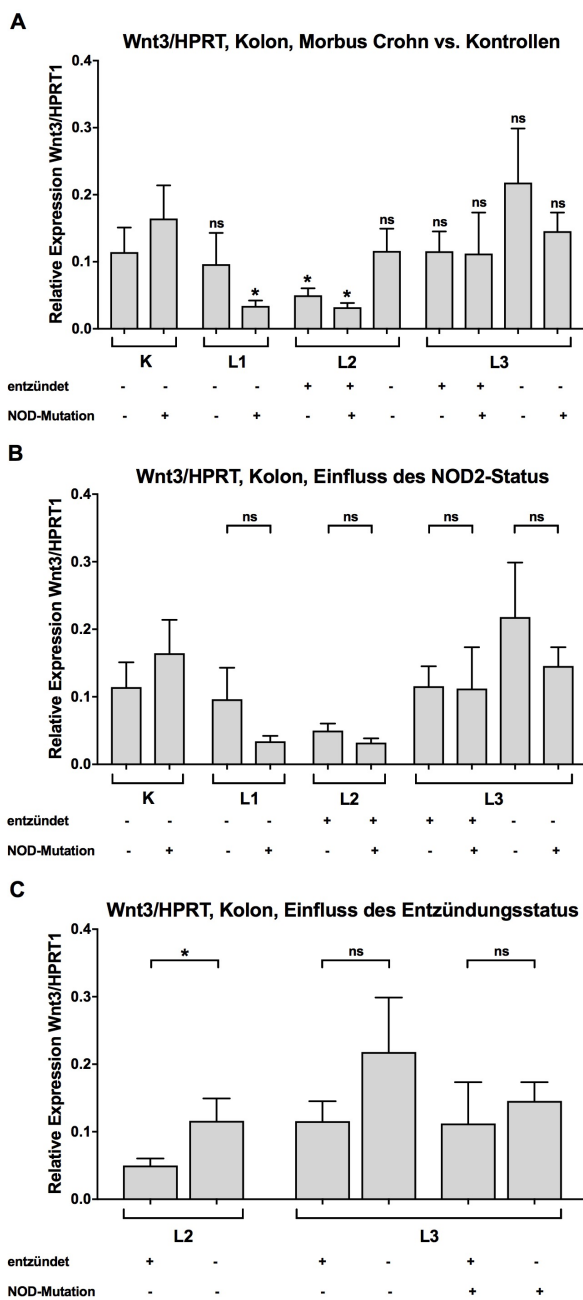
**Abbildung 34: Relative Expression von Wnt2/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt2 im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von Wnt2/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch

signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Nicht-signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; *Unpaired t-test*).

### 7.3.4 Expression von Wnt3 im Kolon normiert auf HPRT1

Im Kolon von MC-Patienten mit Ileumbefall (L1) mit NOD2-Mutation und MC-Patienten mit Kolonbefall (L2) fielen gegenüber gesunden Kontrollen signifikant geringere Expressionslevel von Wnt3/HPRT1 auf (Abbildung 35A).



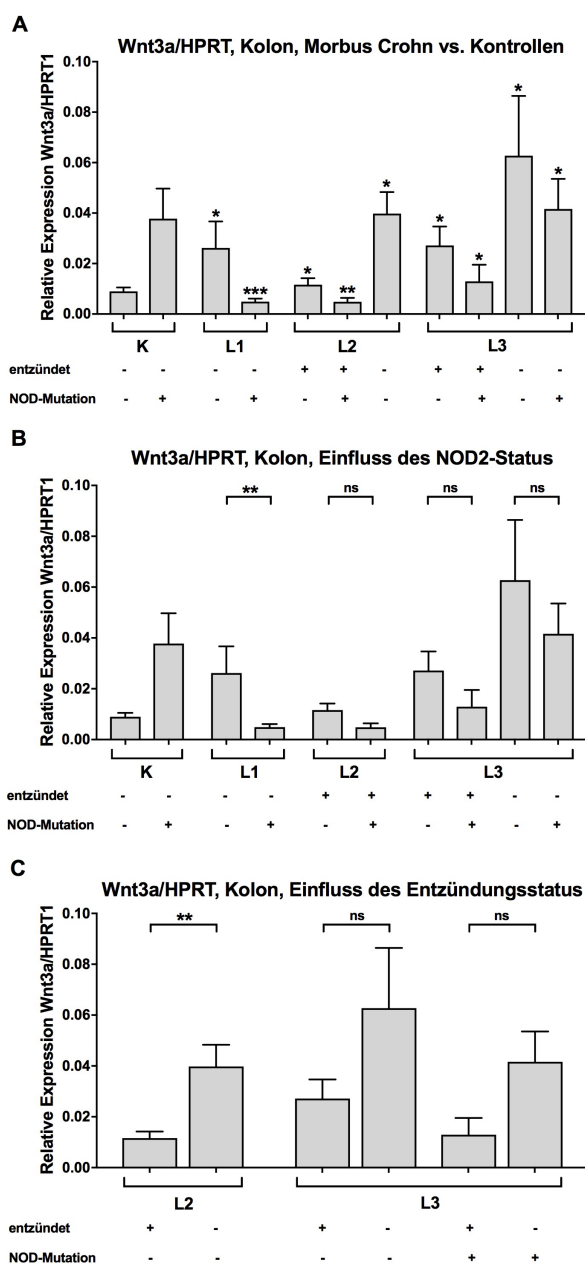
**Abbildung 35: Relative Expression von Wnt3/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt3 im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von Wnt3/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach Entzündungsstatus

(„+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind durch ns gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test; *Unpaired t-test*).

### 7.3.5 Expression von Wnt3a im Kolon normiert auf HPRT1

Bei MC mit Ileumbefall (L1) und MC mit Kolonbefall (L2) mit NOD2-Mutation zeigte sich gegenüber Kontrollen eine signifikant geringere Expression von Wnt3a/HPRT1 (Abbildung 36A). Patienten mit NOD2-Mutation wiesen tendenziell niedrigere Expressionslevel von Wnt3a/HPRT1 im Kolon auf als Patienten mit NOD2-Wildtyp. Im Phänotyp L1 war dieser Unterschied signifikant (Abbildung 36B).



**Abbildung 36: Relative Expression von Wnt3a/HPRT1 im Kolon bei Morbus Crohn**

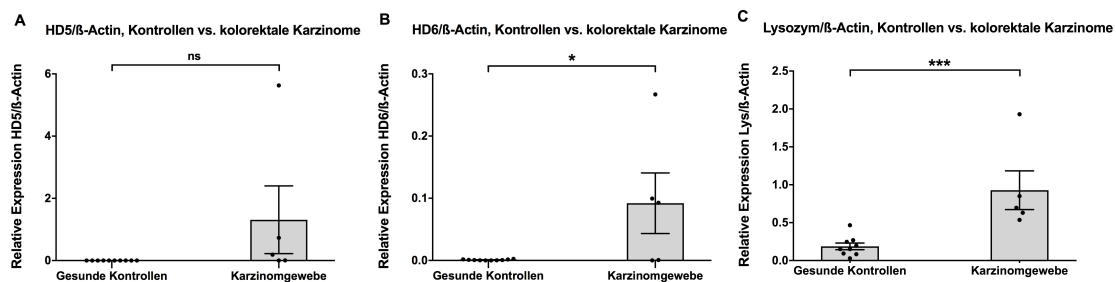
Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt3a im Kolon normiert auf HPRT1 sind in den Balkendiagrammen mit SEM gezeigt. Abgebildet ist die relative Expression von Wnt3a/HPRT1 bei Kontrollen (K) (n=19) und Patienten mit Morbus Crohn (MC) (n=95) mit Ileumbefall (L1)/Kolonbefall (L2)/Ileum-Kolonbefall (L3). Weiter wurde nach

Entzündungsstatus („+“: entzündet, „-“: nicht entzündet) und NOD2-Status („+“: Mutation, „-“: Wildtyp) unterschieden. A: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MC-Patienten und Kontrollen (gesamt) sind durch \* gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test; *one-way* ANOVA). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede bei MC abhängig von NOD2-Status (B) und Entzündungsstatus (C) sind mit \* und Unterschiede ohne Signifikanz sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test).

## 7.4 Expressionsanalyse von Paneth-Zell-Genen in Kolonkarzinomen

### 7.4.1 Expression von HD5, HD6 und Lysozym normiert auf $\beta$ -Actin

In den CRCs (vorwiegend bei den Patienten 3 und 5) ließ sich gegenüber dem Kolongewebe der gesunden Kontrollen eine tendenziell höhere relative Expression von HD5/ $\beta$ -Actin beobachten (Abbildung 37A). Zudem zeigte sich in den Kolonkarzinomen, vorwiegend bei Patient 3, 4 und 5, eine signifikant erhöhte Expression von HD6/ $\beta$ -Actin gegenüber den gesunden Kontrollen (Abbildung 37B). Die relative Expression von Lysozym/ $\beta$ -Actin war in CRCs, vorwiegend bei Patient 5, signifikant höher als im Kolon der gesunden Kontrollen (Abbildung 37C).

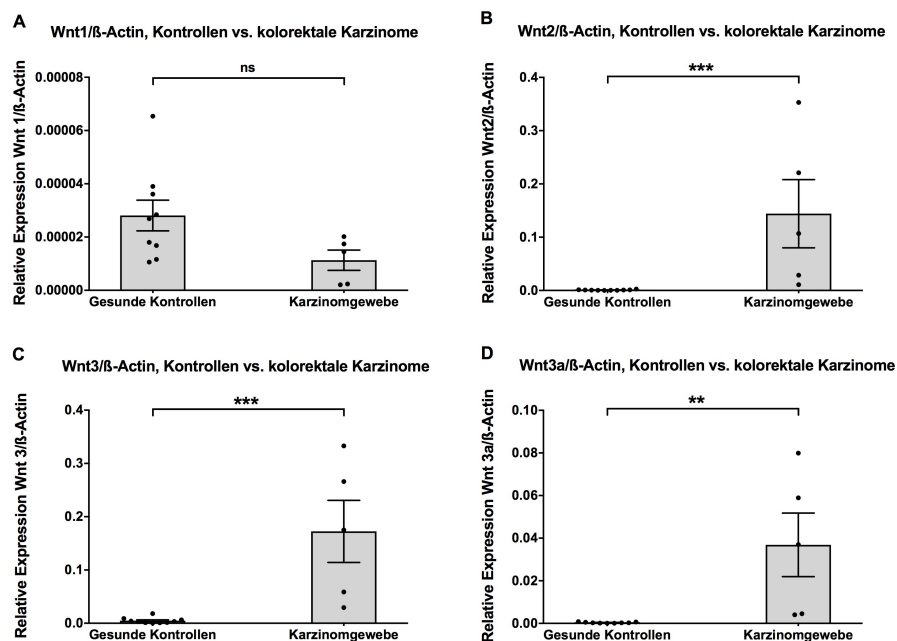


#### Abbildung 37: Expression von HD5, HD6 und Lysozym in Kolonkarzinomen normiert auf $\beta$ -Actin

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von HD5, HD6 und Lysozym normiert auf  $\beta$ -Actin sind in den Balkendiagrammen (+/- SEM) dargestellt. Abgebildet ist die relative Expression von A: HD5/ $\beta$ -Actin, B: HD6/ $\beta$ -Actin und C: Lysozym/ $\beta$ -Actin im Karzinomgewebe von „*Colorectal Cancer*“ (CRC)-Patienten (n=5) und im Kolongewebe von Kontrollen ohne CRC (n=10). A: Nicht-signifikante Unterschiede zwischen CRCs und Kontrollen sind mit ns gekennzeichnet (Mann-Whitney-Test). B, C: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CRCs und Kontrollen sind mit \* gekennzeichnet (B: *Unpaired t-test*), (C: Mann-Whitney-Test).

### 7.4.2 Expression von Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a normiert auf $\beta$ -Actin

In den CRCs zeigten sich tendenziell niedrigere Expressionslevel von Wnt1/ $\beta$ -Actin als im Kolon der Kontrollen (Abbildung 38A). Dagegen fiel in den CRCs eine signifikante Erhöhung der relativen Expression von Wnt2/ $\beta$ -Actin im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe auf. Dabei war die relative Expression von Wnt2/ $\beta$ -Actin vorwiegend bei drei CRC-Patienten (Patient 1, 4 und 5) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 38B). Die relative Expression von Wnt3/ $\beta$ -Actin war im Karzinomgewebe (vorwiegend bei Patient 1, 4 und 5) signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 38C). Im Kolonkarzinomgewebe (vorwiegend bei Patient 1, 4 und 5) fand sich gegenüber dem Kolon gesunder Kontrollen eine signifikant höhere relative Expression von Wnt3a/ $\beta$ -Actin (Abbildung 38D).



**Abbildung 38: Expression von Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a in Kolonkarzinomen normiert auf  $\beta$ -Actin**

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von Wnt1, Wnt2, Wnt3 und Wnt3a normiert auf  $\beta$ -Actin sind in den Balkendiagrammen (+/- SEM) dargestellt. Abgebildet ist die relative Expression von A: Wnt1/ $\beta$ -Actin, B: Wnt2/ $\beta$ -Actin, C: Wnt3/ $\beta$ -Actin und D: Wnt3a/ $\beta$ -Actin im Karzinomgewebe von „Colorectal Cancer“ (CRC)-Patienten (n=5) und in Kolongewebe von Kontrollen ohne CRC (n=10). A: Nicht-signifikante Unterschiede zwischen CRCs und Kontrollen sind mit ns gekennzeichnet (*Unpaired t-test*). B, C, D: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen CRCs und Kontrollen sind mit \* gekennzeichnet (B, C: Mann-Whitney-Test), (D: *Unpaired t-test*).

## **8. Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung Innere Medizin I - Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie der Medizinischen Klinik unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Jan Wehkamp durchgeführt.

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

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

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Jan Wehkamp und Frau Dr. rer. nat. Nicole Armbruster durch mich.

Die Abbildungen 1-6 wurden nach Erhalt der Urheberrechte durch die o. g. Quellen in das Manuskript miteinbezogen. Alle anderen Abbildungen wurden eigenständig durch mich erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die Dissertationsschrift wurde durch Frau Dr. rer. nat. Nicole Armbruster und Frau Dr. rer. nat. Judith Wendler korrigiert.

Tübingen, den 20.10.2018

Helen Hauk

### 9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in der Zeit als Doktorandin unterstützt und begleitet haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Jan Wehkamp für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die konstruktive Diskussion und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Auch bedanke ich mich für die großzügige Möglichkeit zur Teilnahme an unterschiedlichen Kongressen im Bereich Gastroenterologie. Diese ermöglichten mir einen regen wissenschaftlichen Austausch. Eine besondere Freude war es, meine Arbeit auf einer wissenschaftlichen Tagung präsentieren zu dürfen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Nicole Armbruster für ihre herausragende Unterstützung und gute fachliche Betreuung bei meiner Dissertation bedanken. Deine motivierenden Worte waren neben deinen vielen durchdachten Anregungen und Hilfestellungen sowie dem Korrekturlesen eine große Hilfe für mich.

Auch gilt mein ganz besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. Judith Wendler für die stetige Unterstützung und ihren fachlichen sowie auch menschlichen Beistand während meiner Zeit im Labor. Durch deine klaren Ratschläge beim Korrekturlesen gelang es mir, mich auf das Wesentliche zu fokussieren und die Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Bei Frau Jutta Bader und Frau Marion Strauß möchte ich mich herzlich für die detaillierte und geduldige Einarbeitung in die Methodik sowie die fortwährende Unterstützung bei neuen Fragen und Herausforderungen im Laboralltag bedanken. Ihr habt eine wundervolle Arbeitsatmosphäre geschaffen, in der mir die Zeit bei euch in der AG Wehkamp großen Spaß bereitet hat.



Mein Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Louis Königer und Herrn Dr. rer. nat. Dirk Ehmman, die mir ebenso mit Rat und Tat zur Seite standen. Eure humorvolle Art hat mir den Laboralltag zusätzlich erleichtert. Danke Louis, für die Bereitstellung deines Büroschlüssels, wodurch ich auch zu weniger menschlichen Uhrzeiten an der Verfassung meiner Dissertationsschrift arbeiten konnte.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für den liebevollen Beistand während meines Studiums und in meiner Zeit als Doktorandin. Euer Vertrauen in mich ist die größte Unterstützung für mich.