

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen

Abteilung Innere Medizin I  
Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,  
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie

**Charakterisierung von Monozyten im Blut bei  
Colitis ulcerosa**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Weber, geb. Giesen, Marie-Christine

2021

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Wehkamp

2. Berichterstatter:

Professorin Dr. J.-S. Frick

Tag der Disputation: 23.09.2020

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN .....	VI
1 EINLEITUNG .....	1
1.1. DIE EPITHELARRIEREN DES DARMS .....	1
1.1.1. Die physikalische Barriere: Epithelverband und Mucusproduktion	1
1.1.2. Die biologische Barriere: die AMPs der Panethzelle	2
1.2. DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEM IM DARM .....	3
1.2.1. Periphere mononukleäre Zellen des Blutes	4
1.2.2. Monozyten	4
1.2.3. Dendritische Zellen	5
1.2.4. Kommunikation des Immunsystems mit dem Intestinaltrakt	6
1.3. DIE ROLLE DES <i>WNT</i> -SIGNALWEGS IM DARM .....	7
1.3.1. Der <i>Wnt/β-Catenin</i> -Signalweg	7
1.3.2. <i>Wnt</i> bei der Panethzellendifferenzierung	9
1.3.3. <i>Wnt</i> bei Kolorektalem Karzinom	11
1.4. BARRIERESTÖRUNGEN: CHRONISCH-ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN.....	12
1.4.1. Colitis ulcerosa	13
1.4.2. Morbus Crohn	15
1.5. ZIEL DER ARBEIT .....	17
2 MATERIAL UND METHODEN .....	19
2.1. MATERIAL .....	19
2.1.1. Geräte	19
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3. Chemikalien, Antikörper, Kits und Enzyme	20
2.1.3.1. Chemikalien .....	20
2.1.3.2. Antikörper .....	20
2.1.3.3. Kits .....	21
2.1.3.4. Enzyme.....	21
2.1.4. Medien und Puffer	21
2.1.5. Primer und Sequenzen	22
2.1.6. Patienten	23
2.1.6.1. PBMC Kohorte für Zellanalyse .....	23
2.1.6.2. PBMC Kohorte für Zellsortierung und RNA-Isolierung.....	24
2.1.6.3. PBMC Kohorte für qualitative Real-time PCR .....	24
2.1.6.4. PBMC Kohorte für RNA-Sequenzierung .....	24
2.1.7. Software	25
2.2. METHODEN .....	25
2.2.1. Zellkulturmethoden	25
2.2.1.1. Isolation mononukleärer Zellen .....	25

2.2.1.2. Durchflusszytometrie .....	26
2.2.1.3. Stimulation der klassischen Monozyten .....	28
2.2.1.4. Lyse und RNA-Isolation.....	28
2.2.2. Nukleinsäuremethoden .....	29
2.2.2.1. RNA-Umschreibung in cDNA .....	29
2.2.2.2. <i>Real-time</i> PCR (RT-PCR).....	29
2.2.2.3. RNA-Sequenzierung.....	30
2.2.3. Statistische Methoden .....	31
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. FACS-ANALYSE DER MONOZYTEN UND DENDRITISCHEN ZELLEN AUS BLUT .....</b>	<b>33</b>
3.1.1. Verteilungsmuster der Monozytensubtypen .....	36
3.1.2. Verteilungsmuster der Dendritischen Zellen .....	37
<b>3.2. RT-PCR-ANALYSE DER KLASSISCHEN MONOZYTEN AUS BLUT .....</b>	<b>39</b>
3.2.1. <i>Wnt</i> -Liganden .....	40
3.2.2. Weitere Gene im <i>Wnt</i> -Signalweg .....	41
<b>3.3. ANALYSE DER RNA-SEQUENZIERUNG .....</b>	<b>43</b>
3.3.1. Genexpressionsanalyse im Rahmen des <i>Wnt</i> -Signalwegs .....	47
3.3.1.1. Zusammenfassung „ <i>Wnt</i> -Signalweg“ .....	50
3.3.2. Genexpressionsanalyse im Rahmen der Entzündung .....	50
3.3.2.1. Zusammenfassung „Entzündung“ .....	53
3.3.3. Genexpressionsanalyse im Rahmen der Kolon-Karzinogenese .....	54
3.3.3.1. Zusammenfassung „Kolon-Karzinogenese“ .....	56
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1. ANALYSE DES VERTEILUNGSMUSTERS BEI MONOZYTEN UND DENDRITISCHEN ZELLEN .....</b>	<b>57</b>
4.1.1. Klassische Monozyten bei MC stärker vertreten als bei CU .....	58
4.1.2. Intermediäre Monozyten bei CU und MC höher exprimiert als bei Kontrolle .....	59
4.1.3. Dendritische Zellen bei CU niedriger exprimiert als bei MC .....	60
<b>4.2. ANALYSE DER GENE DES <i>WNT</i>-SIGNALWEGS VIA QRT-PCR IN KLASSISCHEN MONOZYTEN .....</b>	<b>61</b>
4.2.1. Bedeutung des <i>Wnt</i> -Signalwegs in klassischen Monozyten bei CU-Patienten .....	62
4.2.2. Bedeutung des <i>Wnt</i> -Signalwegs in klassischen Monozyten bei MC-Patienten .....	63
<b>4.3. EINFLUSS DER KLASSISCHEN MONOZYTEN BEI PATIENTEN MIT CED – GENERIERUNG WEITERER HYPOTHESEN .....</b>	<b>65</b>
4.3.1. Bekannte Gene des <i>Wnt</i> -Signalwegs nicht erfasst oder unverändert .....	65
4.3.2. Aktivierter <i>Wnt</i> -Signalweg in CU-Patienten? .....	66
4.3.3. Eingeschränkter <i>Wnt</i> -Signalweg bei MC-Patienten trotz aktiven <i>Wnt</i> -Signalweg- Komponenten? .....	67
4.3.4. Ist <i>IRF-1</i> in CED-Patienten für TH1/TH2-Unterschied mitverantwortlich? .....	69
4.3.5. Monozyten des Blutes könnten zur Entstehung von CAC beitragen .....	70
<b>4.4. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....</b>	<b>72</b>

5 ZUSAMMENFASSUNG.....	74
6 LITERATURVERZEICHNIS .....	76
7 ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL.....	96
8 DANKSAGUNG.....	97

# Abkürzungen

<i>AMP</i>	<i>Antimikrobielle Peptide</i>
<i>AK</i>	<i>Antikörper</i>
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovines Serumalbumin</i>
<i>CA</i>	<i>Karzinom</i>
<i>CAC</i>	<i>Colitis - assoziiertes Karzinom</i>
<i>CED</i>	<i>Chronisch - entzündliche Darmerkrankungen</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of differentiation</i>
<i>CRC</i>	<i>Kolorektales Karzinom</i>
<i>CU</i>	<i>Colitis ulcerosa</i>
<i>Cy5</i>	<i>Synthetischer Sulphoindocyanin - Farbstoff Cyanin - 5.18</i>
<i>DCs</i>	<i>Dendritische Zellen (dendric cells)</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)</i>
<i>FACS</i>	<i>Durchflusszytometrie (fluorescence- activated cell sorting)</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetales Kälber Serum (Fetal Calf Serum)</i>
<i>FITC</i>	<i>Flouresceinisothiocyanat</i>
<i>FZD</i>	<i>Frizzled</i>
<i>GSK3</i>	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
<i>HBD</i>	<i>Humanes <math>\beta</math> - Defensin</i>
<i>HD</i>	<i>Humanes <math>\alpha</math> - Defensin</i>
<i>IFIT</i>	<i>Interferon - induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
<i>IFN</i>	<i>Interferon</i>
<i>Ig</i>	<i>Immunglobulin</i>

<i>ISG</i>	<i>Interferon-stimulierende Gene</i>
<i>JAK</i>	<i>Januskinase</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharid (Oberflächenmolekül eines Bakteriums)</i>
<i>M.</i>	<i>Morbus</i>
<i>MC</i>	<i>Morbus Crohn</i>
<i>NEAA</i>	<i>Nicht - essentielle Aminosäuren</i>
<i>NLR</i>	<i>NOD-like-Rezeptoren</i>
<i>NOD</i>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
<i>PBMC</i>	<i>Periphere mononukleäre Zellen des Blutes</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PE</i>	<i>Phycoerythrin</i>
<i>Per-CP</i>	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
<i>PHA-L</i>	<i>Phytohaemagglutinin (Leucoagglutinin)</i>
<i>PRR</i>	<i>Pattern-recognition-receptor</i>
<i>RegIIIγ</i>	<i>regenerating islet-derived 3 gamma</i>
<i>rpm</i>	<i>Rounds per minute</i>
<i>RPMI</i>	<i>Akronym; Roswell Park Memorial Institute; Suspensionsmedium</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<i>TH</i>	<i>T-Helferzelle</i>
<i>TLR</i>	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
<i>TYK</i>	<i>Tyrosinkinase</i>
<i>Wnt</i>	<i>Wortneuschöpfung; zusammengesetzt aus Wg (wingless) und Int-Gen</i>
<i>ZNS</i>	<i>Zentrales Nervensystem</i>

# 1 Einleitung

## 1.1. Die Epithelbarrieren des Darms

Neben der Aufnahme von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen im Rahmen der Verdauung übernimmt der Darm wichtige Aufgaben in der Immunabwehr. Der Darm des Menschen wird kurz nach der Geburt dauerhaft von einer großen Anzahl an Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien oder Pilze besiedelt, welche als Mikrobiota des Darms bezeichnet werden (Bezirtzoglou, 1997; Nicholson et al., 2012). Um eine kontrollierte Aufnahme im Rahmen der Verdauung zu ermöglichen, den Menschen gleichzeitig jedoch vor einer Invasion von Mikroorganismen zu schützen, gibt es im Darm sowohl physikalische als auch biologische Barrieren. Diese sind Teil der angeborenen Immunabwehr und entscheidend für die intestinale Homöostase zwischen Wirt und Mikrobiota.

### 1.1.1. Die physikalische Barriere: Epithelverband und Mucusproduktion

Die physikalische Barriere nimmt eine sehr wichtige Rolle im Rahmen der Abwehr von Bakterien und anderen Mikroorganismen ein, da sie die erste Hürde für sie darstellt. *Tight junctions* und *Adherens junctions* sorgen apikal, Desmosomen basal, für eine Versiegelung der epithelialen Zellen untereinander und gewährleisten damit eine geschlossene Barriere gegen das Mikrobiota (Groschwitz and Hogan, 2009). Neben der dichten Epithelschicht ist zudem die Mucusschicht für eine effektive erste Immunabwehr verantwortlich. Hauptbestandteil des Mucus ist Wasser (98%), zudem produzieren Becherzellen im Darm u.a. das wichtige *Mucin 2 (MUC2)*, welches durch Trimerverknüpfungen und glykosylierte Seitenketten eine netzartige Gelstruktur mit Mucindomänen bildet, in denen sich Bakterien verfangen (Gum et al., 1994; Johansson et al., 2011a). Wird *MUC2* wenig bis gar nicht exprimiert, fällt die Gelstruktur zusammen und Bakterien können das Epithel erreichen und dort eine Entzündung auslösen (Johansson et al., 2008).

Die Mucinschicht im Dünndarm und Kolon ist unterschiedlich organisiert (Pelaseyed et al., 2014). Das Dünndarmepithel wird von einer einzelnen, locker aufliegenden Mucusschicht bedeckt. Bakterien haben Zugang zu dieser Schicht, gelangen jedoch im gesunden Darm nur selten bis ans Epithel. Selbstreinigungsmechanismen wie die Peristaltik des Darms und regelmäßige Erneuerungen der Epithelzellen tragen ihren Anteil dazu bei (Atuma et al., 2001; Deloose et al., 2012; Schade et al., 1994). Das Kolon besitzt dagegen zwei Mucusschichten, die deutlich voneinander getrennt sind. Während die äußere, luminale Schicht ähnlich dem Dünndarm leicht entfernt werden kann und hier das natürliche Habitat der kommensalen Bakterien darstellt, ist die innere Schicht fest an das Epithel haftend. Zudem ist sie nahezu bakterienfrei (Johansson et al., 2008). Wie diese Grenze aufrechterhalten werden kann, ist noch nicht bekannt. Sie geht jedoch mit einer Veränderung des Volumens einher, vermutlich durch ein Ausweiten der *MUC2*-Netzstruktur (Johansson et al., 2011b).

### **1.1.2. Die biologische Barriere: die AMPs der Panethzelle**

Neben der physiologischen Barriere hat der Mensch im Darm auch biologische Strategien entwickelt, sich gegen die Mikrobiota zu schützen. Zu den wichtigen Vertretern gehören unter anderem die antimikrobiellen Peptide (AMPs). Antimikrobielle Peptide sind meist kationisch geladen und besitzen eine amphiphatische Struktur. Dadurch ist es den AMPs möglich, sich in der Mucusschicht aufzuhalten und negativ geladene Bakterien abzufangen (Cederlund et al., 2011). Ihre Vielfalt an Abwehrstrategien macht es möglich, dass der Mensch eine effektive Immunantwort auf eine Vielzahl an Organismen aufweisen kann.

Defensine sind die größte Gruppe der antimikrobiellen Peptide. Sie lassen sich in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und in Menschen bisher noch nicht nachgewiesenen  $\delta$ -Defensine einteilen (Jäger et al., 2010; Selsted et al., 1993; Selsted and Ouellette, 2005; Tang et al., 1999). Neben Bakterien wirken sie auch gegen Pilze, Viren und Protozoen (DeGray et al., 2001; Selsted and Ouellette, 2005; Wilson et al., 2013; Zasloff, 2002). Im Menschen werden  $\alpha$ -Defensine, vor allem die humanen  $\alpha$ -Defensine 5 (*HD5*) und 6 (*HD6*), hauptsächlich durch Panethzellen des

Dünndarms produziert und sezerniert. Im Kolon kommen sie im gesunden Menschen nicht vor (Fahlgren et al., 2003). Sie wirken vermutlich durch Mikroporenbildung in der Zellwand (*HD5*) bzw. durch die Entfaltung von Netzstrukturen (*HD6*) (Brogden, 2005; Chu et al., 2012; Dipankar Ghosh et al., 2002; Ganz, 2003; Schroeder et al., 2015; Zhang et al., 2010).  $\beta$ -Defensine zeigen unterschiedliche Eigenschaften. Das humane  $\beta$ -Defensin 1 (*HBD1*) kommt ubiquitär vor, während das humane  $\beta$ -Defensin 2 (*HBD2*) wie  $\alpha$ -Defensine auf Stimuli hin exprimiert wird. Beide entstehen in Epithelzellen. Sie agieren durch Verletzung der Zellwandintegrität (Ostaff et al., 2013; Pazgier et al., 2006). Zudem wirken sie chemotaktisch auf Makrophagen und Mastzellen (Soruri et al., 2007).

## 1.2. Die Rolle des Immunsystem im Darm

Der Intestinaltrakt ist luminal dauerhaft mit einer großen Anzahl an Bakterien und anderen Lebewesen konfrontiert. Kommensale wie pathogene Bakterien interagieren mit ihrem Umfeld und üben Einfluss aus. Beispielsweise schaffen es kommensale Bakterien, durch Toleranzentwicklung, dass das Immunsystem sie zwar erkennt, jedoch nicht als Gegner ansieht (Cebula et al., 2013; Proietto et al., 2009). Um den Darm vor einer Infektion zu schützen, ist es entscheidend, die Kontrolle über die verschiedenen Mikroorganismen zu behalten. Dies geschieht durch eine gute Zusammenarbeit mit dem Immunsystem. Dabei ist das angeborene und das erworbene Immunsystem eng miteinander verwoben. Ein großes Netzwerk an Zellen ist daran beteiligt; die Paneth- und Epithelzellen der vordersten Front, sowie die Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs) und T- und B-Lymphozyten der darunter liegenden *Lamina propria* und des Gefäßsystems. Monozyten und Dendritische Zellen des Blutes stehen in dieser Arbeit verstärkt im Fokus, da sie die Hauptvertreter der angeborenen Immunzellen darstellen.

### 1.2.1. Periphere mononukleäre Zellen des Blutes

Periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMCs) sind einkernige Zellen des peripheren Blutes. Dazu gehören sowohl Monozyten, Dendritische Zellen als auch Lymphozyten, ausgenommen sind Granulozyten. Die Immunzellen halten sich im Blut auf, bevor sie ins Gewebe eintreten und dadurch aktiviert werden. Monozyten können sich weiter in Makrophagen und Dendritische Zellen differenzieren (Geissmann et al., 2010). Sie sezernieren Zytokine und wirken dabei chemotaktisch auf andere Immunzellen, wodurch diese an den Ort der Entzündung migrieren (Liebler et al., 1994). Dennoch können auch schon PBMCs wie Monozyten Effektorzellfunktionen wahrnehmen (Yang et al., 2014).

In vorangegangenen Studien wurde die Verteilung der einzelnen Zellen im gesamten PBMC von gesunden Kontrollen beschrieben. Neben den am stärksten vertretenen Lymphozyten nahmen Monozyten einen Anteil von 5-10 % ein, während Dendritische Zellen maximal 1 % der PBMCs ausmachten (Courth et al., 2015; De Groote et al., 1992; Gordon and Taylor, 2005; O’Keeffe et al., 2015).

### 1.2.2. Monozyten

Obwohl die Monozyten in den Immunzellen des Blutes nur einen geringen Teil ausmachen, spielen sie dennoch eine zentrale Rolle in der Immunabwehr (Lauvau et al., 2015). Für Monozyten werden drei Subtypen anhand ihrer Oberflächennmarker unterschieden: klassische ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediäre ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) und nicht-klassische Monozyten ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) (Gren and Grip, 2016; Ziegler-Heitbrock et al., 2010, p.). Lange Zeit wurde nur zwischen  $CD14^{+}CD16^{-}$  und  $CD14^{+}CD16^{+}$  Monozyten differenziert, bis 2010 eine neue Klassifikation veröffentlicht wurde (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Klassische Monozyten nehmen mit 80-95 % den größten Anteil an der Population ein (Yang et al., 2014). Zudem scheinen sich klassische Monozyten bei Zugabe von Wachstumsfaktoren wie *M-CSF* über intermediäre (~ 5 %) in die reiferen nicht-klassischen Monozyten (~10 %) weiterentwickeln zu können (Munn et al., 1996; Weiner et al., 1994; Wong et al., 2012; Yang et al., 2014; Ziegler-Heitbrock,

2014). Monozyten entstehen aus Progenitorzellen des Knochenmarks und werden, abhängig von der *CCL2-CCR2*-Achse, ins Blut abgegeben (Serbina and Pamer, 2006; Shi et al., 2011). Klassische Monozyten reagieren auf eine *CCL2*-Expression durch weitere Monozyten ebenfalls mit Migration zum Ort der Entzündung (Conrady et al., 2013; Gren and Grip, 2016). Während sie eine hohe Phagozytoseaktivität aufweisen, Antigene präsentieren und eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung von Gewebe spielen, sind intermediäre Monozyten mit einer hohen *HLA-DR*<sup>+</sup>-Expression wichtig für die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen (Gren and Grip, 2016; Yang et al., 2014). Nicht-klassische Monozyten patrouillieren das Gefäßsystem (Gren and Grip, 2016). Sowohl intermediäre, aber vor allem nicht-klassische Monozyten exprimieren bei *LPS*-Stimulation eine hohe Anzahl an *TNF- $\alpha$*  und *IL-1 $\beta$*  (Belge et al., 2002; Gren and Grip, 2016; Wong et al., 2011). Während Monozyten sich in anderen Geweben wie Leber, Lunge oder dem ZNS in sich selbst-erneuernde Makrophagen weiterentwickeln (Yona et al., 2013), scheint, in Mäusen bereits nachgewiesen, die Anzahl an intestinalen Makrophagen durch einen kontinuierlichen Nachschub aus zirkulierenden Monozyten des Blutes gesteuert zu werden (Bain et al., 2014).

### 1.2.3. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen und Monozyten entstammen gemeinsamen Vorläuferzellen (Geissmann et al., 2010). Neben der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen im Rahmen der adaptiven Immunabwehr übernehmen Dendritische Zellen zudem wichtige Aufgaben in der Toleranzentwicklung, beispielsweise gegenüber kommensalen Darmbakterien (Mowat, 2003; Proietto et al., 2009; Waisman et al., 2017). Im Blut des Menschen wurden bisher drei unterschiedliche Subtypen nachgewiesen; zwei verschiedene myeloide Dendritische Zellen mit den Oberflächenmarkern *CD1c*<sup>+</sup> bzw. *CD141*<sup>+</sup> und *CD303*<sup>+</sup>-plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) (Dzionek et al., 2000; Ziegler-Heitbrock et al., 2010, p.). Die genauen Aufgaben der DCs des Blutes sind noch nicht ganz klar. Zum einen sollen unreife DCs eine hohe phagozytische Aktivität besitzen und Antigene im Rahmen der T-Zell-Prägung in den Thymus transportieren (Bernardo et al., 2018; Proietto et al., 2009). Andere Arbeiten zeigen jedoch

unterschiedliche Eigenschaften zu ihren Pendanten im Gewebe. Da die DCs im Blut durch die Strömung nur geringen Kontakt zu Antigenen haben sollen, stünde die Antigenpräsentation hier nicht im Vordergrund. Vielmehr würden die Dendritischen Zellen des Blutes in unterschiedlich reifen Stadien existieren, bereit, ins Gewebe einzutreten und dort mit Antigenen in Kontakt zu treten (Proietto et al., 2009; Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

#### **1.2.4. Kommunikation des Immunsystems mit dem Intestinaltrakt**

Das Immunsystem erkennt pathogene Bakterien und setzt eine Immunkaskade in Gang, an dessen Ende die Entzündung des Gewebes steht. Bakterielle Komponenten wie Lipopolysaccharide und Muramyl-dipeptide werden von Immunzellen wie DCs mit Hilfe von *pattern-recognition-receptors (PRRs)* wie *Toll-like-Rezeptoren (TLR)* oder *NOD-like-Rezeptoren (NLR)* erkannt und lösen über Signalwege die Sekretion von Zytokinen sowie Defensinen aus (Ayabe et al., 2000; Cario, 2010; Franchi et al., 2009; Iwasaki and Medzhitov, 2015; Shih et al., 2008). Im Labor-Setting wird das Auslösen dieser Entzündungsreaktion beispielsweise durch die Gabe von *Phytohaemagglutinin (PHA-L)*, einem TLR-Agonisten, imitiert (Unitt and Hornigold, 2011). Die Zytokine aktivieren daraufhin naive Lymphozyten, Monozyten und weitere, noch unreife DCs, welche sich differenzieren und ebenfalls Zytokine ausschütten. Naïve T-Zellen differenzieren - vereinfacht dargestellt - entweder zu T-Helferzellen 1 (TH1), welche *Interleukin-12 (IL-12)* und *Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )* sezernieren und damit die zelluläre Immunantwort aktivieren, oder zu T-Helferzellen 2 (TH2) mit einer Produktion von *IL-4* und *IL-13*, welches die humorale Immunabwehr aktiviert (Monteiro et al., 2011; Strober et al., 2002; Wallace et al., 2014). Monozyten produzieren bei Zytokinsekretion *CCL2*, was weitere Monozyten zum Entzündungsort locken soll (Conrady et al., 2013; Zigmund et al., 2012).

Zytokine können neben ihrer Rolle als Botenstoffe auch direkt Signalwege auslösen, die das Immunsystem regulieren. Das Zytokin *Interferon* wird beispielsweise durch Virus-infizierte Zellen ausgeschüttet und kann durch direkte Aktivierung von Kinasen (*JAK*, *TYK*) und nachfolgend *STAT* eine stabilisierende und Virus-resistente Umgebung herbeiführen (Tanaka et al., 1998). In malignen

Zellen wirkt *IFN* zudem Apoptose-induzierend (Kotredes and Gamero, 2013). Des Weiteren scheint der *IFN Typ I*-Signalweg im Darm in direktem Kontakt zur Mikrobiota zu stehen und mediatorische Funktionen auszuüben, möglicherweise durch *NOD*-like-Rezeptoren (Giles and Stagg, 2017; Pandey et al., 2009). Entlang des Signalwegs gibt es zudem zahlreiche Proteine wie *IRF-1* oder *USP18*, die regulatorisch auf *Interferon* und seine Mitspieler einwirken (Fujita et al., 1989; Ivashkiv and Donlin, 2014). Auch Wechselwirkungen von *IFN* mit dem Zytokin *TNF- $\alpha$*  werden beschrieben (Cantaert et al., 2010).

Courth et al. konnten 2015 indirekt zeigen, dass der *Wnt*-Signalweg in Monozyten Einfluss auf die Produktion und Sekretion von *HD5* und *HD6* in Panethzellen ausübt (Courth et al., 2015). Wie die Monozyten mit den Panethzellen interagieren, ist noch nicht näher untersucht worden.

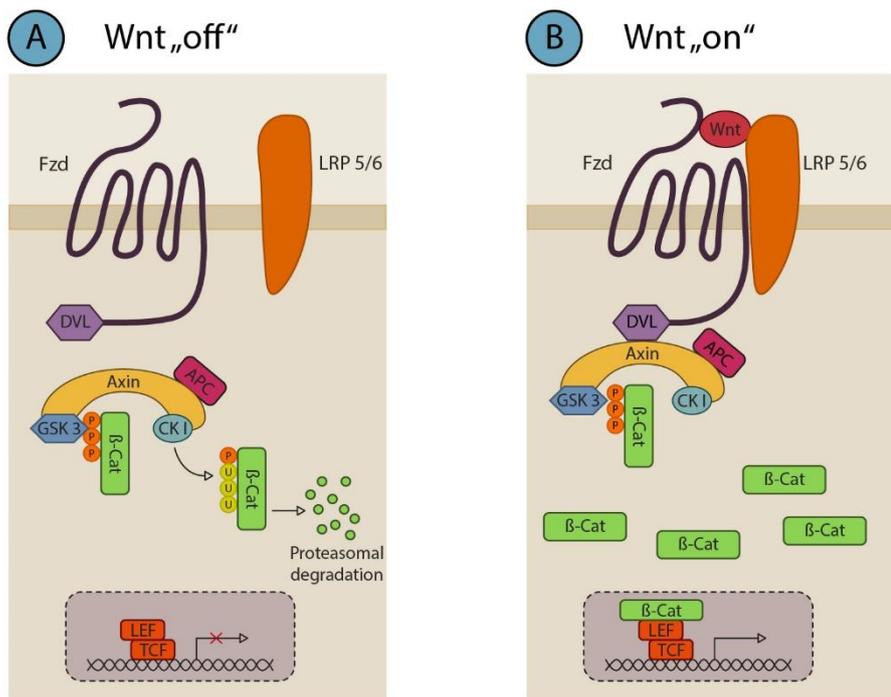
### 1.3. Die Rolle des *Wnt*-Signalwegs im Darm

Im jungen Menschen maßgeblich beteiligt an der Embryonalentwicklung und der Anlage von Organen, nimmt *Wnt* auch im Erwachsenenalter im Darm noch wichtige Funktionen in der Regulation von Stammzellaktivitäten und Aufrechterhaltung von Homöostasen ein (Pinto et al., 2003). *Wnt*-Gene können im Menschen drei verschiedene Signalwege auslösen. Neben dem *Wnt/Ca<sup>2+</sup>*-Signalweg und dem Weg, der wichtig für die Zellpolarität und die Ausbildung des Zytoskeletts ist, gibt es den *Wnt/ $\beta$ -Catenin*-Signalweg, auch kanonischer Signalweg genannt (Huelsenken, 2002). Letzterer wird hier näher erklärt, da er im Darm des Menschen sowohl wichtige Funktionen in der Differenzierung von Stammzellen übernimmt als auch an der Entstehung des Kolonkarzinoms (Kolon-CA) beteiligt zu sein scheint (s. Kapitel 1.3.2 und 1.3.3.).

#### 1.3.1. Der *Wnt/ $\beta$ -Catenin*-Signalweg

Hauptfaktor des *Wnt*-Signalwegs ist  *$\beta$ -Catenin*, ein Protein, das sowohl bei Zell-Zell-Adhäsionen als auch an der Transkription von Genen beteiligt ist (Brembeck et al., 2006). Bei Nicht-Aktivierung des Signalwegs liegt  *$\beta$ -Catenin* gebunden in einem Komplex aus verschiedenen Proteinen wie *Axin*, *APC* oder *GSK3* vor

(*destruction complex*), der mittels Ubiquitinierung und Proteasomen zum Abbau von  $\beta$ -Catenin führt (Barker, 2008; Huelsken, 2002). Die Wirkung von  $\beta$ -Catenin ist somit negativ kontrolliert. Binden sich jedoch *Wnt*-Gene an transmembranöse *Frizzled*-Rezeptoren (*FZD*) und den Co-Faktor *LRP5/6*, wird der *Wnt*-Signalweg aktiviert. *Wnt* kann von Epithelzellen, Panethzellen und Mesenchymalzellen wie Monozyten sezerniert werden (Armbruster et al., 2017; Courth et al., 2015; Farin et al., 2012). Das Protein *Dishevelled* (*DVL*) wird durch den *Wnt-LRP5/6-FZD*-Komplex aktiv und verhindert als Hauptakteur die Bildung des *destruction complex*.  $\beta$ -Catenin ist nicht mehr gebunden und reichert sich intrazellulär an. Folglich gelangt das Protein in den Nucleus. Es lagert sich an die Transkriptionsfaktoren *TCF* und *LEF* an, aktiviert diese mittels weiteren Co-Faktoren und führt so zur Transkription von Zielgenen für die Zelldifferenzierung und Proliferation sowie mit *DEFA5* (HD5) und *DEFA6* (HD6) von Zielgenen für die Immunabwehr (Barker, 2008; Huelsken, 2002; Logan and Nusse, 2004). Bei größeren Mengen an transkribierten Proteinen wirken diese zudem teilweise inhibierend auf den *Wnt*-Signalweg (*negatives Feedback*) (Lustig et al., 2002).

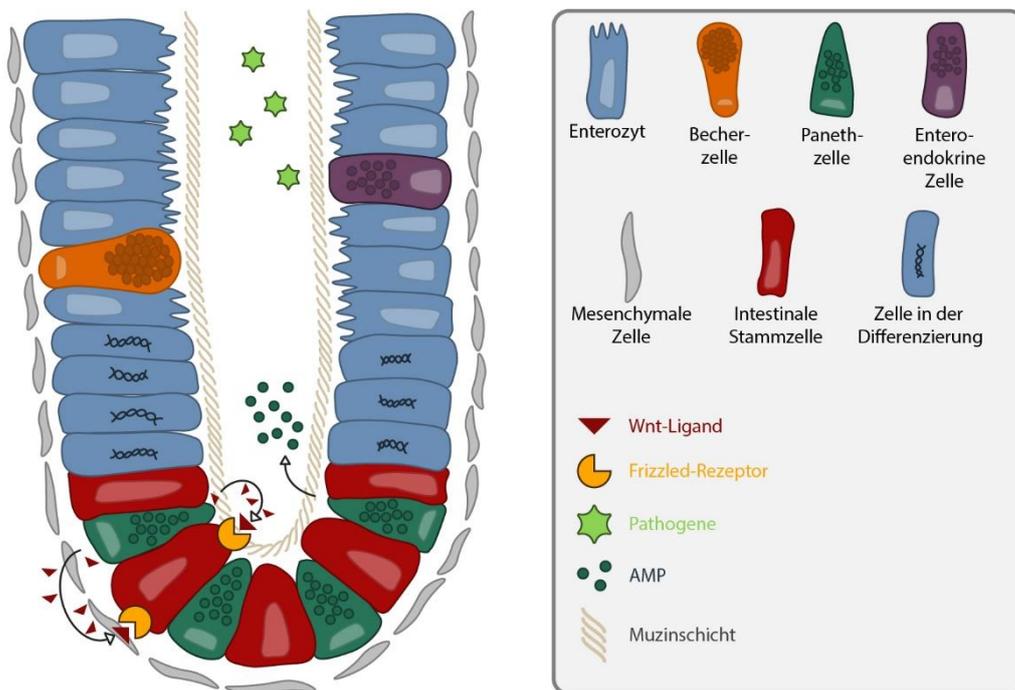


**Abbildung 1: Kanonischer *Wnt*-Signalweg.** Das Fehlen von "*Wnt*" führt zu einer unvollständigen Signalkaskade mit dem Ergebnis des  $\beta$ -Catenin-Abbaus (*proteasomal degradation*) (A). Bei Anlagerung von "*Wnt*" erfolgt die Anreicherung von  $\beta$ -Catenin in der Zelle, sodass es zur Transkription der Zielgene kommt (B). **Genehmigt und modifiziert nach Barker N. (2008) The Canonical *Wnt*/ $\beta$ -Catenin Signalling Pathway. In: Vincan E. (eds) *Wnt Signaling. Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, vol 468. Humana Press.**

### 1.3.2. *Wnt* bei der Panethzellendifferenzierung

*Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5<sup>+</sup>)*-intestinale Stammzellen sind die Basis für jede epitheliale Zelllinie des Darms, auch der der Panethzelle (Barker et al., 2007; Cheng and Leblond, 1974; Crosnier et al., 2006). Proliferation, Erhalt und Differenzierung der Stammzellen werden entscheidend durch den *Wnt*-Signalweg reguliert (Barker et al., 2007; Cheng and Leblond, 1974; Crosnier et al., 2006). So fiel bei *Wnt*-Transkriptionsfaktor 4-negativen Mäusen (*TCF4*<sup>-/-</sup>-Mäusen) postnatal sowie postmortal auf, dass ihnen die gesamte Kryptenbasis samt Stammzellen fehlte (Korinek et al., 1998). Auch *in vivo* Studien zeigten bei Inaktivierung des *Wnt*-Signalwegs Verluste durch eine finale Differenzierung aller verbliebenen Stammzellen (Fevr et al., 2007; Kretschmar and Clevers, 2017; van Es et al., 2012). Van Es et al. konnte 2005 nachweisen, dass speziell der *Wnt*-Transkriptionsfaktor *TCF4* entscheidend zur

Differenzierung der Panethzelle beiträgt (van Es et al., 2005). Sein Vorkommen ermöglicht der Panethzelle die Expression von diversen Panethzellmarkern wie den Defensinen (Gersemann et al., 2011; van Es et al., 2005). Zudem führen schon kleine Abweichungen der regulären  $\beta$ -Catenin-Konzentration im *Wnt*-Signalweg zu Veränderungen in der Panethzelldifferenzierung (Andreu et al., 2008). Neben einem aktivierten *Wnt*-Signalweg ist zudem eine Unterdrückung des *Notch*-Signalwegs von Bedeutung, da die Stammzelle dadurch den Status der Selbsterneuerung zugunsten der Entwicklung der sekretorischen Zelllinien (Becherzellen, Enterendokrine Zellen, Panethzellen) aufgibt (van Es et al., 2005; Yin et al., 2013). Während die Enteroendokrinen Zellen und die Becherzellen während ihrer Differenzierung entlang der Villus-Achse nach oben wandern, bleibt die Panethzelle in der Kryptenbasis (Bry et al., 1994; Koslowski et al., 2010). Auch hier trägt der *Wnt*-Signalweg zur richtigen Position der Zelle bei (Pinto et al., 2003). Um die Stammzellen herum bilden verschiedene Zellen eine Nische, allen voran die Panethzelle (Sailaja et al., 2016; Sato et al., 2011). Neben intrinsischen Signalwegen werden die Stammzellen auch durch exogene Signale dieser Nischenzellen – beispielsweise durch Sekretion von *Wnt* – beeinflusst und sorgen damit für die Proliferation und das Überleben der Zelle (Li and Xie, 2005, s. Abbildung 2). Die Panethzelle durchläuft einen Lebenszyklus von drei bis sechs Wochen (Barker, 2008; Garabedian et al., 1997). Währenddessen geht sie mittels Sekretion von antimikrobiellen Peptiden aktiv gegen aufgenommene Pathogene vor, stellt durch ihre räumliche Nähe und Sekretion gewisser Stammzellnischen-Produkte aber auch eine gewisse Schutzfunktion für die Stammzellen dar (Armbruster et al., 2017; Bevins, 2004; Clevers and Bevins, 2013; Garabedian et al., 1997; Sato et al., 2011).



**Abbildung 2: Stammzellregulation mit Hilfe von *Wnt* aus Panethzellen.**

Genehmigt und modifiziert nach Maritini et al., 2017. Mend your fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease

### 1.3.3. *Wnt* bei Kolorektalem Karzinom

Das Kolorektale Karzinom (CRC) befindet sich mit einer Inzidenz von ca. 30.000/ Jahr unter den drei am häufigsten neu auftretenden Krebserkrankungen bei Frauen und Männern in Deutschland (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Vogelstein und Kollegen setzten 1988 mit ihrem mehrstufigen Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz einen Meilenstein im Verständnis der Entstehung des Kolorektalen Karzinoms (Vogelstein et al., 1988). Der aktivierte *Wnt*-Signalweg trägt einen entscheidenden Anteil dazu bei, dass sich ein CRC entwickeln kann. Normalerweise eng reguliert durch *Wnt*-Inhibitoren wie *AXIN2* oder *DKK1*, kann es bei aktivierenden Mutationen der Agonisten oder *loss-of-function*-Mutationen der Inhibitoren zu unkontrollierten Proliferationen von Zellen und zur Entstehung von Tumoren kommen (Lustig et al., 2002; Xiao et al., 2016; Yan et al., 2001). Einmal irregulär aktiviert, ermöglicht der *Wnt*-Signalweg den entstehenden Adenomen eine unbegrenzte Existenz, in der schlussendlich weitere Mutationen

auftreten und zur Malignität führen können (Pinto and Clevers, 2005). Dabei wird der *Wnt*-Signalweg durch viele weitere Proteine wie *APCDD1* oder *IFIT2/3* (*Interferon*-Signalweg) mit beeinflusst (Ohsugi et al., 2017; Takahashi et al., 2002). Zwei Prozent der CRCs sind Colitis-assoziierte Karzinome (CAC). Langjährig vorbestehende und anhaltend schwere chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) scheinen gute Voraussetzungen für die Entstehung eines Karzinoms zu bieten (Rutter et al., 2004).

Für Menschen mit CED gilt das Risiko, im Laufe des Lebens an einem CAC zu erkranken, als erhöht (Kim and Chang, 2014). Neben vielen erhöht auftretenden Zytokinen wie *IL-6* oder *TNF* wurden in DSS-induzierten Kolon-CA-Modellen auch inflammatorische Komponenten wie *Syndecane* in erhöhter Expression vorgefunden (Choi et al., 2017; Germano et al., 2008; Klampfer, 2011; Terzić et al., 2010). Ebenso scheint die Aktivierung von *STAT3* eine wichtige Rolle zu spielen (Bollrath et al., 2009; Grivennikov et al., 2009, p. 3; Neufert et al., 2010). Die Entwicklungsstufen des CAC sind im Vergleich zum sporadischen CRC ähnlich. Akkumulierte  $\beta$ -*Catenine* sowie *Wnt*-assoziierte Tumorgene wie *cyclin D1* oder *c-myc* zeigten sich bei Patienten mit Pancolitis ulcerosa und frühen Stadien eines CAC erhöht (van Dekken et al., 2007). Aktivierende  $\beta$ -*Catenin*-Mutationen wurden auch in CAC-Mausmodellen gefunden, wenn auch selten (Aust et al., 2002; Greten et al., 2004). Mutationen im *Wnt*-Signalweg scheinen bei CAC später aufzutreten als bei CRC. Vielmehr zeigen sich früh *p53*- und *k-ras*-Mutationen (Grivennikov, 2013; Heinzlmann et al., 2002; Lakatos and Lakatos, 2008; Lashner et al., 1999; Terzić et al., 2010). Auch sind bei der CAC-Entstehung teilweise *injury-dysplasia* gefunden worden, Dysplasien ohne vorherige Adenom-Entwicklung (Terzić et al., 2010).

## 1.4. Barrierestörungen: Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind schubförmig auftretende, entzündliche Erkrankungen des Intestinaltrakts, dessen genaue Ursachen bis heute nicht genau geklärt sind. Hauptvertreter der CED sind die

beiden Erkrankungen Colitis ulcerosa (CU) und M. Crohn (MC). Sie sind durch Defizite in der Epithelbarriere und der Differenzierung von Stammzellen sowie durch Dysregulationen in der Aktivierung des Immunsystems charakterisiert (Gersemann et al., 2011; Sartor, 2006; Wehkamp and Stange, 2010). Des Weiteren spielen genetische sowie epigenetische Faktoren eine Rolle (Stebe-Frick et al., 2018; Wehkamp and Stange, 2010). Zudem entwickeln Mäuse in keimfreier Umgebung keine CED, was den Einfluss des Mikrobioms deutlich macht (Zhou et al., 2009). Durch dauerhaft vermehrte Immunreaktionen wird die Entzündung aufrecht erhalten (Duchmann et al., 1999). Dies kann langfristig dazu führen, dass Karzinome entstehen ((Bernstein et al., 2001), s. Kapitel 1.3.3.). Für Patienten mit Colitis ulcerosa besteht ein Risiko von 2-18 %, im Leben an einem Colitis-assoziierte Karzinom zu erkranken, mit einem mit den Jahren zunehmenden Risiko (Eaden et al., 2001). M. Crohn-Patienten weisen ebenfalls ein erhöhtes Risiko auf, jedoch zu einem geringeren Prozentsatz von 2,9-8,3 % (Canavan et al., 2006; Freeman, 2008).

#### **1.4.1. Colitis ulcerosa**

Die Erkrankung Colitis ulcerosa (CU) zeichnet sich durch eine kontinuierlich nach oral fortschreitende Entzündung der oberflächlichen Darmschleimhaut aus. Die Erkrankung ist auf den Kolon beschränkt. Auf molekularer Ebene kann bei CU-Patienten ein Mangel an Mucinen und Becherzellen und eine dadurch reduzierte Mucinschicht festgestellt werden (Strugala et al., 2008; Tytgat et al., 1996). Dies kann auf niedrige Expressionen der Transkriptionsfaktoren *HATH1* und *KLF4* zurückgeführt werden, die für die Entwicklung der Becherzellen von Bedeutung sind (Gersemann et al., 2009). Die Herunterregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt die Annahme einer defekten Becherzellendifferenzierung als eine Ursache bei Colitis ulcerosa (Gersemann et al., 2009). Im Kolon zeigen sich zudem erhöhte Sekretionen von im gesunden Menschen normalerweise nur wenig bis gar nicht vorkommenden antimikrobiellen Peptiden wie *HBD2* durch Epithelzellen und *HD5* durch Zellen der Kryptenbasis (Fahlgren et al., 2003; Wehkamp et al., 2003). Für *HBD1* wurden keine starken Veränderungen im Kolon festgestellt (Fahlgren et al., 2003). Die Produktion der Defensine scheint

kompensatorisch für den Mucinmangel erhöht zu sein, vermutlich können jedoch weniger AMPs in der Mucinschicht festgehalten werden, sodass Bakterien dennoch bis in das Epithel eindringen können und dort eine Entzündung verursachen (Png et al., 2010).

Der Einfluss des *Wnt*-Signalwegs auf die Transkriptionsfaktoren *HATH1* und *KLF4* bei Colitis ulcerosa ist umstritten. Tatsache ist, dass *HATH1* und *KLF4* entscheidend an der Differenzierung zu sekretorischen Zelllinie, vor allem Becherzellen, beteiligt sind und damit die Produktion des Mucus mit beeinflussen (Katz et al., 2002; Park et al., 2006; Yang et al., 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass *HATH1* bei Aktivierung des *Wnt* - Signalwegs in Kolon-CA-Zellen herunterreguliert ist, bei gleichzeitigem Fehlen einer *MUC2* - Expression (Leow et al., 2004). Ein Ausschalten des *Wnt*-Signalwegs durch *TCF4*-blockierte Mäuse zeigte dementsprechend erhöhte *MUC2*-Produktionen (van de Wetering et al., 2002). Dennoch sorgte die Expression von *DKK1*, einem *Wnt*-Inhibitor, auch für das Fehlen von Becherzellen und widersprach damit der obigen Annahme (Pinto et al., 2003). Ireland et al. unterstützten die zweite Annahme, da das Ausschalten von  $\beta$ -*Catenin* bei ihm ebenfalls zu einer Becherzellarmut führte (Ireland et al., 2004). Gersemann et al. untersuchten 2009 die Korrelation zwischen *HATH1*, *KLF4* und verschiedenen Faktoren der *Wnt/Notch*-Signalwege. Da sich diese als negativ herausstellten, bewertete er den direkten Einfluss der *Wnt/Notch*-Signalwege auf die reduzierte Expression von *HATH1* und *KLF4* und damit den Einfluss auf die Produktion von Mucinen als eher unwahrscheinlich (Gersemann et al., 2009).

Neben der Epithelbarriere scheint zudem die Immunabwehr bei CU-Patienten vermehrt aktiviert zu sein. Zu Monozyten, die hier einen wichtigen Teil dazu beitragen, gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen (Gren and Grip, 2016). Lissner et al. fanden eine erhöhte Anzahl an Monozyten in der *Lamina propria* (Lissner et al., 2015). Auch Jones et al. bemerkten dort zu wenige Makrophagen und schlossen auf eine gestörte Monozyten:Makrophagen-Balance (Jones et al., 2018). Dabei scheinen M2- eher als M1-Makrophagen den *Wnt*-Signalweg in Epithelzellen aktivieren zu können (Cosín-Roger et al., 2013). Bezüglich der

Monozyten im Blut gibt es konträre Studien. Intermediäre Monozyten sind bei CU-Patienten sowohl stark reduziert (Hanai et al., 2008) als auch erhöht (Takeda et al., 2010) aufgefunden worden. Studien zur Verteilung der klassischen oder nicht-klassischen Monozytensubtypen im Blut bei Colitis ulcerosa-Patienten wurden bislang nicht durchgeführt. Im Blut von Patienten mit Colitis ulcerosa wurden zudem weniger unreife myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen gemessen als in gesunden Kontrollen (Baumgart, 2005). Zudem scheint die Verteilung von pDCs in Blut und Gewebe abweichend zur Kontrolle zu sein (Baumgart et al., 2011). Neben der angeborenen Immunabwehr, bei der Monozyten und Dendritische Zellen eine große Rolle spielen, zeigen sich auch Unterschiede in der erworbenen T-Zell-Immunreaktion auf Antigen-präsentierende Zellen (Sartor, 2006; Shih et al., 2008). Naive T-Zellen entwickeln sich bei CU-Patienten demnach vor allem zu TH2-Zellen, die mit der Sekretion von *IL-4* und *IL-13* zu einer Einschränkung der Epithelbarriere beitragen (Bouma and Strober, 2003; Heller et al., 2005).

#### 1.4.2. Morbus Crohn

Morbus Crohn-Patienten (MC) sind im Gegensatz zu CU-Patienten charakterisiert durch eine diskontinuierlich verlaufende Entzündung der gesamten Intestinalwand. Ein Großteil erkrankt im terminalen Ileum, dem letzten Abschnitt des Dünndarms, jedoch kann der gesamte Gastrointestinaltrakt, wie Teile des Kolons oder Kombinationen betroffen sein (Marshall-Kriterien, (Silverberg et al., 2005; Wehkamp and Stange, 2010, p. 2010)). Im Laufe der Zeit wurden einige mutierte, genetische Loci gefunden, die mit ilealem Morbus Crohn assoziiert sind (Wehkamp and Stange, 2010). Diese gehen mit Einschränkungen in PRRs (*NOD2*; (Ogura et al., 2001; Wehkamp et al., 2004, p. 2004)), Autophagie-Signalwegen (*ATG16L1*; (Hampe et al., 2007)), endosomalen Stressreaktionen (*XBP1*; (Kaser et al., 2008)) und T-Zell-Aktivierungen (*KCNN4*; (Simms et al., 2010)) einher. Für die chronische Entzündung im ilealen Darm bei M. Crohn ist unter anderem die reduzierte Sekretion von Defensinen verantwortlich, beispielsweise von *HD5* und *HD6* in Panethzellen des Dünndarms.  $\beta$ -Defensine des Kolons weichen nur gering von der Kontrollgruppe

ab (Wehkamp et al., 2003). MC-Patienten mit Entzündung des Dickdarms zeigen hingegen auf Grund eines dortigen Mangels an Panethzellen eingeschränkte Produktionen von  $\beta$ -Defensinen (Wehkamp et al., 2008). Beide Veränderungen sind unabhängig des Entzündungsgrades (Bevins et al., 2009; Wehkamp et al., 2005, p. 2005). Neben den genetischen Aspekten ist der *Wnt*-Signalweg entscheidend an der Regulation der Defensinsekretion beteiligt. Sowohl *TCF1* als auch *TCF4* des *Wnt*-Signalwegs sind in Biopsien von M. Crohn-Patienten erniedrigt aufgefunden worden, unabhängig einer *NOD2*-Mutation (Beisner et al., 2014; Wehkamp et al., 2007). Zudem führten Veränderungen des *Wnt*-Co-Faktors *LRP6* zu niedrigeren Defensinexpressionen bei frühen Formen des ilealen M. Crohn (Koslowski et al., 2012). All diese Veränderungen sprechen für einen defekten *Wnt*-Signalweg als eine wichtige Ursache für die niedrige Produktion von Defensinen in Panethzellen. Die erniedrigte Expression von *TCF4* lässt ebenso eine Panethzeldifferenzierungsstörung vermuten (van Es et al., 2005, s. Kapitel 1.3.2.). Im Kolon befinden sich zudem vereinzelt metaplastische Panethzellen, die das Fehlen der AMPs bei M. Crohn kompensieren könnten (Symonds, 1974; Tanaka et al., 2001). Die Reduktion von Defensinen in der Mucusschicht erleichtert Bakterien den Eintritt in das Epithel. Ebenso wie bei CU-Patienten ist die biologische Barriere geschwächt und die Bakterienanzahl im Epithel erhöht (Png et al., 2010; Schultz et al., 1999). Zahlreiche Immunzellen werden zudem in die Darmwand gelockt, mikrobiologisch und klinisch lässt sich eine Entzündungsreaktion wahrnehmen. Für klassische und intermediäre Monozyten gibt es unterschiedliche Studienergebnisse. Die Anzahl an klassischen Monozyten wurde in MC-Patienten bei Thiesen et al. erniedrigt festgestellt (Thiesen et al., 2014). Courth et al. nahmen zudem an, dass die Monozyten, die über den *Wnt*-Signalweg die Produktion von Defensinen in den Panethzellen regulieren, defekt zu sein scheinen (Courth et al., 2015). Intermediäre Monozyten wurden teils erhöht vorgefunden (Grip et al., 2007; Koch et al., 2010), andere fanden erniedrigte intermediäre Monozytenexpressionen, jedoch nicht so stark wie bei CU-Patienten (Hanai et al., 2008). Nicht-klassische Monozyten schienen unverändert (Grip et al., 2007; Koch et al., 2010). Die Zytokinexpressionen in MC-Patienten,

welche sich in Remission befanden, wichen nur gering von der Kontrollgruppe ab, was Schwarzmaier et al. vermuten lässt, dass sich die Hauptentzündungsreaktion eher in der intestinalen Schleimhaut abspielt als im Blut. Dennoch wurden auch im Blut erhöhte *IL1*- $\beta$ - und *CCL2*-Expressionen gemessen (Schwarzmaier et al., 2013). Dendritische Zellen sind wie bei CU-Patienten im Blut erniedrigt vorgefunden worden (Baumgart, 2005). MC-Patienten reagierten auf die Antigenpräsentation durch DCs zudem hauptsächlich mit der Produktion von TH1-Zellen, die *IL-12* und *IFN*- $\gamma$  produzieren (Sakuraba et al., 2009; Sartor, 2006; Shih et al., 2008). Dies unterscheidet sich im Vergleich zu CU-Patienten und hat eine unterschiedliche Aktivierung des Immunsystems zur Folge.

## 1.5. Ziel der Arbeit

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind komplexe Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts. Schwere Verläufe und immer wiederkehrende Schübe treffen auf stark immunsuppressive Medikamente, die jedoch nicht bei jedem Patienten eine ausreichende Wirkung zeigen. Die Lebensqualität der betroffenen Personen ist deutlich beeinträchtigt. Umso wichtiger ist es in dieser Hinsicht, mit Hilfe von neuen Erkenntnissen dazu beizutragen, das Wissen um die zugrundeliegenden Mechanismen und die vielen, noch unverstandenen Aspekte der Erkrankungen zu erweitern und damit die Wissenslücken in der Pathogenese zu minimieren.

Nachdem lange Zeit nur die Tatsache bekannt war, dass Panethzelldefensine bei M. Crohn erniedrigt sind und der *Wnt*-Signalweg vermutlich mit eine Rolle spielt, nicht jedoch, welche Zellen hier die Panethzellen beeinflussen, konnten Courth et al. mit den Monozyten die passende Verbindung nachweisen (Courth et al., 2015). Erste Daten aus der Arbeitsgruppe zeigten daraufhin, dass es die klassischen Monozyten waren, für deren *Wnt*-Liganden und weitere Proteine des *Wnt*-Signalwegs eine weitgehend erniedrigte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Da Morbus Crohn klinisch große Ähnlichkeiten mit der Erkrankung Colitis ulcerosa aufweist und der *Wnt*-

Signalweg für beide enorm wichtig für die Aufrechterhaltung der Homöostase des intestinalen Epithels ist (Pinto et al., 2003), wäre es denkbar, dass CU - Patienten ebenfalls Einschränkungen im *Wnt*-Signalweg bei Monozyten aufzeigen. Diesbezüglich wird die Verteilung von Monozyten und ihren Subtypen bei CU-Patienten gemessen und mit MC-Patienten und einer Kontrollgruppe verglichen. Zudem sollen die Genexpressionen der klassischen Monozyten in Bezug auf den *Wnt*-Signalweg gemessen und erneut ein Vergleich durchgeführt werden. Da für Dendritische Zellen in CED-Patienten ebenfalls Einschränkungen gezeigt wurden (Baumgart, 2005), soll auch hier der Verteilungstyp ermittelt werden. In Bezug auf die Ergebnisse bei den Monozyten wird davon ausgegangen, dass für CU-Patienten ähnliche Messwerte wie für die Kontrollgruppen erhalten werden und dass das *Wnt*-Liganden-Defizit in Monozyten spezifisch für die Erkrankung Morbus Crohn ist. Das bedeutet jedoch nicht, dass der *Wnt*-Signalweg bei Colitis ulcerosa nicht involviert ist. Vielmehr wird vermutet, dass der *Wnt* - Signalweg einen anderen Schwerpunkt aufweist, beispielsweise in der Differenzierung von Stammzellen zu Becherzellen (Gersemann et al., 2009). Diese zeigen bei CU-Patienten Defizite in der Produktion von Mucinen (Antoni et al., 2014). Zudem scheint es vielmehr, dass der *Wnt*-Signalweg bei CU-Patienten verstärkt aktiviert ist (Soletti et al., 2013; You et al., 2008). Mit der Sequenzierung des gesamten Monozytengenoms sollen das Wissen um an den Erkrankungen beteiligten Genen erweitert werden und neue Hypothesen generiert werden. Diese beziehen sich auf die Rolle der Monozyten im Rahmen des *Wnt*-Signalwegs, der Entzündung und der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Für die Erkrankung Colitis ulcerosa ist das Wissen um den Einfluss der klassischen Monozyten noch in den Anfängen. Deshalb ist es von großem Interesse, herauszufinden, ob und inwiefern sich Gengruppen herausbilden, die neue Erkenntnisse zur Pathogenese von Colitis ulcerosa beitragen. Zudem ist ein direkter Vergleich der beiden Erkrankungen hilfreich, um langfristig individuellere Therapien anbieten zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material

Alle weiteren Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, die benutzt wurden, jedoch nicht in der Liste stehen, gehören zur Standardausrüstung eines jeden Labors.

#### 2.1.1. Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
ABI 3500 DX sequencer	Thermo Fischer Scientific, USA
BD FACSAria™ Ilu	BD Bioscience, USA
BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer	BD Bioscience, USA
Centrifuge 5424	Eppendorf, Deutschland
Heracell vios 160i Brutschrank	Thermo Fischer Scientific, USA
Illumina HiSeq 2500	Illumina Inc., USA
LightCycler® 480	Roche, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon Instruments Europe B.V., Niederlande
Nanodrop ND-1000 V3.8.1	PEQLAB Biotechnologie, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf, Deutschland

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Cell Scraper 25cm 2-position blade	SARSTEDT, USA
CELLSTAR® 6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One, Deutschland
EASYstrainer™ Cell Sieves 40µm	Greiner Bio-One, Deutschland
TC-Platte 12 Well, Standard, F	SARSTEDT, USA

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

#### 2.1.3.1. Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Accutase® solution	Sigma-Aldrich, USA
Biocoll (Ficoll)	Merck Millipore, Deutschland
DPBS	Gibco®, Life technologies™, USA
PHA-L	Merck Millipore, Deutschland
RPMI 1640	Merck Millipore, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Deutschland

#### 2.1.3.2. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>
CD1c PE-Dazzle	L161	Biolegend, USA
CD3 BV510	OKT3	Biolegend, USA
CD11c	Bu15	Biolegend, USA
CD14 FITC	M5E2	Biolegend, USA
CD16 AF 700	3G8	Biolegend, USA
CD16 APC antihuman	3G8	Biolegend, USA
CD19 BV510	HIB19	Biolegend, USA
CD20 BV510	2H7	Biolegend, USA
CD56 BV510	HCD56	Biolegend, USA
CD141 APC	M80	Biolegend, USA
CD303 Per-CP-Cy5.5	201A	Biolegend, USA
HLA-DR BV650	L243	Biolegend, USA
Human IgG bloc	-	Sigma-Aldrich, USA
Zombie Aqua	-	Biolegend, USA

### 2.1.3.3. Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit	Roche, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kits	Qiagen, Deutschland
QIAcube RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Deutschland
SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit	Clontech Laboratories, Inc., USA

### 2.1.3.4. Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
dNTP Mix, PCR Grade	Qiagen, DE
HotStarTaq DNA Polymerase (Klon)	Qiagen, DE

### 2.1.4. Medien und Puffer

#### FACS (-Analyse) -Puffer

PBS	500 ml
1 % FCS	5 ml
0,09 % Natriumazid	4,5 ml
100 mM EDTA	1 ml

#### FACS (-Sorting) -Buffer

PBS	47,75 ml
10% BSA	1,25 ml
100 mM EDTA	1 ml

AddR

Pen/ Strep	100 ml
β-Mercaptoethanol	100 ml
Hepes Buffer (1M)	100 ml
Asparagine (10mg/ ml)	20 ml
Sodium Pyruvate	100 ml
Glutamaxx	100 ml
NEAA	60 ml

RPMI full medium

RPMI	500 ml
1 % FCS	50 ml
AddR	29 ml

RLT-Puffer-Medium

RLT-Puffer	400 µl
β-Mercaptoethanol	4 µl

**2.1.5. Primer und Sequenzen**

Alle Oligonucleotide wurden über das Unternehmen MWG Biotech bezogen (Ebersberg, Deutschland).

**Tabelle 1: Primer für real-time PCR**

Zielgen	SENSE (5'-3')	ANTISENSE (5'-3')
Axin 2 for1/rev1	CTGGCTTTGGTGAAGTGTG TTG	AGTTGCTCACAGCCAAGACA
Evi/Wls	TCATGGTATTTTCAGGTG TTTCG	GCATGAGGAACTTGAACCTAAAA
Frizzled 5 Variante 1	TCGGTGCTGTGCTTCAT CTCC	AGGGCCCGTGGTCTGGTAGTG
Lef 1	AAAGACAATCACTGCCA A CC	TGCCTTGCCGAAAGGTTA
Lrp 6	TGCCATTGCCATAGATT AC	CCATTGAGCCTTGTCACT
Tcf 12	TGGTCACCCGTATTT CCT	TTTGGGTCCTTTCC CTG
Wnt 1 for4/rev4	CCGATGGTGGGGTATTG TGAA	TCCCCGGATTTTGGCGTATC

Wnt 2	TAGTCGGGAATCTGCCT TTG	AAATGCCTTTGCTGTCCTT G
Wnt 3 for2/rev2	ATGCCACTGCATCTTCC ACT	GTGCCCTACTTGCAGGGT GT
Wnt 3A	TTGTCCACGCCATTGCC TCA	AGACACCATCCCACCAAA CTCG
Wnt 9B	TGCCACTCACCACCATT CCTT	ATGTCTTTCTCACTCTGCC CTCC

### 2.1.6. Patienten

Bei allen Probanden war entweder die Erkrankung Morbus Crohn (MC) oder die Erkrankung Colitis ulcerosa (CU) bekannt und diagnostisch bestätigt. Es wurden je 30-40 ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Probanden wurden ausführlich über Risiken und Nutzen der Blutentnahme aufgeklärt. Auch wurden sie über die Verwendung und Speicherung ihrer Daten unterrichtet. Das Einverständnis erfolgte schriftlich. Die Kontrollen setzten sich aus Mitgliedern der Arbeitsgruppe zusammen.

Die Ethikkommission der Universität Tübingen hat für diese Arbeit ihr Ethikvotum erteilt (Nr. 687/2012B01).

#### 2.1.6.1. PBMC Kohorte für Zellanalyse

Gruppe	N [total]	Geschlecht	
		w	m
Patienten	21	52 %	48 %
CD	11	45 %	55 %
UC	10	50 %	50 %
Kontrollen	10	50 %	50 %

### 2.1.6.2. PBMC Kohorte für Zellsortierung und RNA-Isolierung

Gruppe	N [total]	Geschlecht	
		w	m
Patienten	10	40 %	60 %
CD	5	40 %	60 %
UC	5	40 %	60 %
Kontrollen	4	100 %	0 %

### 2.1.6.3. PBMC Kohorte für qualitative Real-time PCR

Gruppe	N [max]	Geschlecht	
		w	m
Patienten	14	25 %	75 %
CD	10	25 %	75 %
UC	4	25 %	75 %
Kontrollen	4	50 %	50 %

Die Nutzung der Kontrollen für die qualitative *Real-time* PCR erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Denzau-Graupner. Die Anzahl der genauen Kohorte ist in den jeweiligen Grafen detailliert erwähnt.

### 2.1.6.4. PBMC Kohorte für RNA-Sequenzierung

Gruppe	N [total]	Geschlecht	
		w	m
Patienten	7	25 %	75 %
CD	3	25 %	75 %
UC	4	25 %	75 %
Kontrollen	4	50 %	50%

### 2.1.7. Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™ Software Version 8.0.1	BD biosciences
FlowJo 7.2.1	TreeStar
GraphPad Prism 7/ 8	GraphPad Software, Inc., USA
LightCycler®480 Software release 1.5.0 Version 1.5.0.39	Roche, Deutschland
Adobe Illustrator®	Adobe Systems Software Ireland Limited, Irland
© 2019 Reactome, Version 70	www.reactome.org; Kollaboration aus: Ontario Institute for Cancer Research; Oregon Health and Science University, New York; University Langone Medical Center The European Bioinformatics Institute

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1. Isolation mononukleärer Zellen

Zur Isolation mononukleärer Zellen wurden 4 EDTA-Monovetten mit je ca. 8-10 ml Patientenblut verwendet, im Verhältnis von 1:1 mit PBS gemischt und auf die gleiche Menge an Ficoll geschichtet (erneut Verhältnis 1:1). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25 min bei 400 x g und 23 °C (ohne Deceleration). Die mittig gelegene PBMC-Phase wurde im nächsten Schritt abpipettiert. Danach kam es zu drei Zentrifugationsschritten für 5 min bei 400 x g und 23 °C. Der

Überstand wurde jeweils verworfen, das Pellet mit je 10 ml PBS resuspendiert. Final wurden alle Proben in einem Gesamtvolumen von 10 ml resuspendiert. Für den weiteren Verlauf wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.1.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde angewandt, um Monozyten und Dendritische Zellen anhand ihres Antikörper-Profiles zu erkennen und einzuteilen (Analyse). Des Weiteren wurde sie genutzt, um klassische Monozyten zu gewinnen (Sortierung), damit mit ihnen weitergearbeitet werden konnte.

### Zellanalyse

Für die Zellanalyse wurden die isolierten mononukleären Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, von denen  $3 \times 10^6$  Zellen weiter verwendet wurden. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit 1 ml humanem IgG blocking für 20min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde eine erneute Zentrifugation für 5 min durchgeführt, dieses Mal bei 4 °C. Ab hier erfolgte jede Zentrifugation bei 4 °C, um eine Abspaltung der Oberflächenmoleküle nach Bindung der Antikörper zu vermeiden. Der Überstand wurde verworfen. Die Färbung an sich erfolgte durch Zugabe des Antikörper-Mix (s. Tabelle 2) (inkl. Reserve).

**Tabelle 2: Mastermix (MM) Antikörper-Schema für FACS-Analyse (inkl. Reserve)**

Antikörper	Verdünnung	Volumen in $\mu$ l	MM-Bsp. für 1 Probe
CD14 FITC	pur	2,5	3
CD303 Per-CP-Cy5.5	pur	2,5	3
CD11c PE-Cy7	1:30	2,5	3
CD141 Allophycocyanin	1:27	2,5	3
HLA-DR BV650	1:4	2,5	3
CD3 BV510	1:5	2,5	3
CD19 BV510	1:5	2,5	3
CD20 BV510	1:5	2,5	3

CD56 BV510	1:4	2,5	3
CD1c PE-Dazzle	1:9	2,5	3
CD16 AF700	1:25	2,5	3
Zombie-Aqua	1:100	1	1,5
Gesamtvolumen		28,5 $\mu$ l	

Die Probe wurde im Anschluss für 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und erneute Zentrifugation für 5 min bei 4 °C mit Verwerfen des Überstandes. Letztlich Hinzufügen von 50  $\mu$ l FACS-Puffer.

### Zellsortierung

Bei der FACS-Zellsortierung erfolgte ebenfalls eine Resuspension des Pellets im Anschluss an die Zentrifugation nach der Zellzahlbestimmung, hier jedoch mit 1 ml Sorting-Buffer (SB) (s. Material), anschließendes Umfüllen in ein FACS-Tube. Für die Färbung der Zellen mit Antikörpern zu Beginn Hinzugabe von 10  $\mu$ l human IgG blocking. Dann Inkubation von 20 min im Dunkeln. Im Anschluss Stoppen der abgelaufenen Reaktion durch Auffüllen mit weiteren 1 ml SB. Erneute Zentrifugation für 5 min (400 x g, 23 °C). Für die FACS-Färbung wurde ebenfalls ein Antikörper-Mastermix angesetzt (inkl. Reserve).

**Tabelle 3: Mastermix Antikörper-Schema für FACS-Sortierung mit  $3 \times 10^6$  Zellen**

Antikörper	Volumen in $\mu$ l je $3 \times 10^6$ Zellen
CD14 FITC	2,5
CD16 APC anti-human	2,5
CD3 BV510	0,5
CD19 BV510	0,5
CD20 BV510	0,5
CD56 BV510	0,625
Zombie – Aqua (1:100)	0,5
Gesamtvolumen	7,625

Hinzufügen des Mastermixes und Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurde erneut 1 ml SB hinzugegeben und die Probe ein weiteres Mal für 5 min bei 400 x g, 4 °C zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes und der Aufnahme in 2 ml, erfolgte eine erneute Zellzahlbestimmung. Für das Sortieren der Monozytensubpopulationen war eine Zellzahlkonzentration von  $1 \times 10^7$ / ml nötig. Die Differenz zu den bereits hinzugegebenen 2 ml wurde mit weiterem SB aufgefüllt. Anschließend steriles Filtern (40 µm) und Lagerung auf Eis.

Die sortierten Zellen wurden in FACS-Tubes aufgefangen ( $8 \times 10^5$  Zellen/ Tube), in denen sich bereits 1 ml FCS befand. Zeitnahe Zentrifugation für 5 min bei 400 x g und 4 °C und Verwerfen des Überstandes.

#### **2.2.1.3. Stimulation der klassischen Monozyten**

Für die Stimulation wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in einer 12 Well-Platte mit einem finalen Volumen von 1 ml RPMI ausgesät. Zusätzlich wurde noch 2,5 µl PHA-L hinzugegeben. Die Stimulation erfolgte über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.1.4. Lyse und RNA-Isolation**

##### **Lyse**

Für die Lyse wurden die klassischen Monozyten in den Well-Platten mit jeweils 0,5 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 0,5 ml Accutase und eine Inkubation im Brutschrank für ca. 4 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Nach zusätzlichem Lösen der Zellen mittels eines Schabers wurde die Accutase-Reaktion mit je 1 ml PBS gestoppt. Danach erfolgte ein weiterer Waschgang mit je 0,5 ml PBS mit anschließender Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und dem Verwerfen des Überstandes. Resuspension in 200 µl PBS und Überführung in ein 1,5 ml-großes Eppi. Erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min und Abnahme des Überstandes. Das übrig bleibende Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert.

##### **RNA-Isolation**

Die Isolation der RNA erfolgte nach Anleitung mittels des High Pure RNA Isolation Kits. Die Menge der RNA wurde anschließend am Nanodrop

Spectrophotometer bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.2.2. Nukleinsäuremethoden

### 2.2.2.1. RNA-Umschreibung in cDNA

Da für die spätere Genexpressionsanalyse mittels *Real-time* PCR (RT-PCR) nur DNA-Fragmente abgelesen werden können, wurde die gewonnene mRNA mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit in die stabilere cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben (Tabelle 4). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

**Tabelle 4: Schritte der RNA-Umschreibung in cDNA**

	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
1)	5 min	25 °C
2)	30 min	42 °C
3)	5 min	85 °C

### 2.2.2.2. *Real-time* PCR (RT-PCR)

Basierend auf Arbeiten von Courth et al., sollte in dieser Arbeit als nächstes untersucht werden, inwiefern spezifische Gene wie die Wnt Gene und weitere Gene des Wnt-Signalwegs in klassischen Monozyten aus Blut von Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn sowie einer gesunden Vergleichsgruppe exprimiert werden (Courth et al., 2015). Die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit ihren Teilschritten Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wurde früher vor allem dazu verwendet, DNA-Abschnitte beliebig zu vervielfältigen. Die „Real-time“-PCR ermöglicht durch das Anlagern von Fluoreszenzen an die DNA während des PCR-Durchlaufs eine zeitechte Abbildung der einzelnen Zyklen. Diese Methode wurde am LightCycler® mit Hilfe des LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit durchgeführt. Während der Durchführung der PCR wurde der Farbstoff SYBR Green I durch Interkalierung der DNA aktiv und emittierte Fluoreszenzen. Diese wurden in ihrer höchsten Ausprägung erfasst (Ende der Elongation). Dadurch war je Zykluslauf die dazugehörige emittierte Fluoreszenz

ablesbar. Der jeweilige Zyklusstand wurde bei Überschreitung einer Schwelle, des Cp-Wertes (*crossing point*), ermittelt. Gleichzeitig mit der zu untersuchenden Probe durchlief ein Plasmid mit dem gesuchten DNA-Abschnitt und definierten Konzentrationen in Form von Standardkurven ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ) ebenfalls die PCR. Analog der absoluten Konzentrationen aus den Standardkurven konnte auf eine Konzentration der gesuchten Probe zurückgeschlossen werden. Bestätigt wurde die Validität der Probe mit Hilfe der für jeden Primer spezifischen Hybridisierungstemperatur (*Annealing temperature/ Melting curve*).

Im Rahmen der Arbeit sind für die Erkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn folgende Gene weiter untersucht worden. Sie sind in nachstehender Tabelle mit ihren jeweiligen Temperaturen und Zeiten aufgelistet. Es wurden je 40 Zyklen durchgeführt.

**Tabelle 5: Real-time PCR Einstellungen für 1 Zyklus**

Zielgen	Denaturierung	Amplifikation	Schmelzkurve
Wnt 2, Wnt 3, LRP 6	96°C – 5 min	96°C – 10 s <b>62°C</b> – 5 s 72°C – 10 s	95°C – 1 s 60°C – 15 s 95°C – ∞
Wnt 1, Evi/Wls, Axin 2, LEF 1, TCF 12	96°C – 5 min	96°C – 10 s <b>60°C</b> – 5 s 72°C – 10 s	95°C – 1 s 58°C – 15 s 95°C – ∞
Wnt 3A	97°C – 5 min	96°C – 10 s <b>65°C</b> – 5 s 72°C – 10 s	95°C – 1 s 65°C – 15 s 99°C – ∞
Fzd 5	96°C – 5min	96°C – 10 s <b>66°C</b> – 5 s 72°C – 15 s	95°C – 1 s 64°C – 15 s 95°C – ∞

### 2.2.2.3. RNA-Sequenzierung

Für diese Arbeit ist es das Ziel, bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in klassischen Monozyten des Blutes Veränderungen in der Genexpression festzustellen und diese zu analysieren. Eine RNA-Sequenzierung ist in der Lage, den gesamten Anteil an DNA, der in einer Zelle abgelesen wird, zu erfassen. Da die Ursachen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

in ihrer Komplexität noch weitgehend unverstanden sind und neben dem Wnt-Signalweg noch weitere Komponenten von großem Interesse sein könnten, wurde diese Methode gewählt, um die Spanne an zu untersuchenden Genen zu erweitern und sich einen ersten groben Überblick zu verschaffen. Zudem ermöglichte diese Methode die Erweiterung unseres Blickfeldes auf andere Signalwege, die bei Colitis ulcerosa und M. Crohn eingeschränkt sein könnten.

Vorbereitend wurden die klassischen Monozyten ( $1,5 \times 10^5$ / Tube), die für die RNA-Sequenzierung verwendet wurden, direkt nach der Zellsortierung für 5 min bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden sie in  $400 \mu\text{l}$  RLT-Plus Puffer resuspendiert, welchem  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt wurde (1:100), und danach bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  weggefroren.

Die RNA-Sequenzierung mittels Illumina HiSeq 2500 und die dafür benötigte vorherige RNA-Isolation und cDNA-Umschreibung wurden durch die Kooperation am Fraunhofer-Institutszentrum, Stuttgart durchgeführt. Insgesamt konnten so ca. 22000 Gene untersucht werden.

### 2.2.3. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad Prism Software, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen, analysierten Gruppen festzustellen. Die Ergebnisse wurden auf Normalverteilung getestet. Bei nicht-parametrischer Verteilung auf Grund von teilweise zu geringen Probandenzahlen und mehr als zwei Vergleichsgruppen wurde der „Kruskal-Wallis-Test“ durchgeführt. *P-Values*, die die statistische Signifikanz der Ergebnisse wiedergeben, sind wie folgt gekennzeichnet:  $p > 0,05$  = nicht signifikant (ns);  $p \leq 0,05$  = \*;  $p \leq 0,01$  = \*\*.

Die statistische Signifikanz für die RNA-Sequenzierung zeigt sich im Verhältnis von Prozentsätzen der Clusterfrequenz des getesteten Gensatzes zur Clusterfrequenz des genomischen Hintergrunds. Das Verhältnis stellt sich anhand des logarithmischen Fold Change ( $\log_2(\text{FC})$ ) in Form von  $\log_2(\text{FC}) > 0,5$  bzw.  $\log_2(\text{FC}) < -0,5$  dar. Die erweiterte Auswertung mittels modifiziertem Fold Change (FDR) deckt falsch-positive Signifikanzen auf. In den Ergebnistabellen

ist der  $\log_2$  (FC) aufgeführt. Wenn falsch-positive Signifikanzen dargestellt werden, ist der Zahlenwert in Kursiv geschrieben.

## 3 Ergebnisse

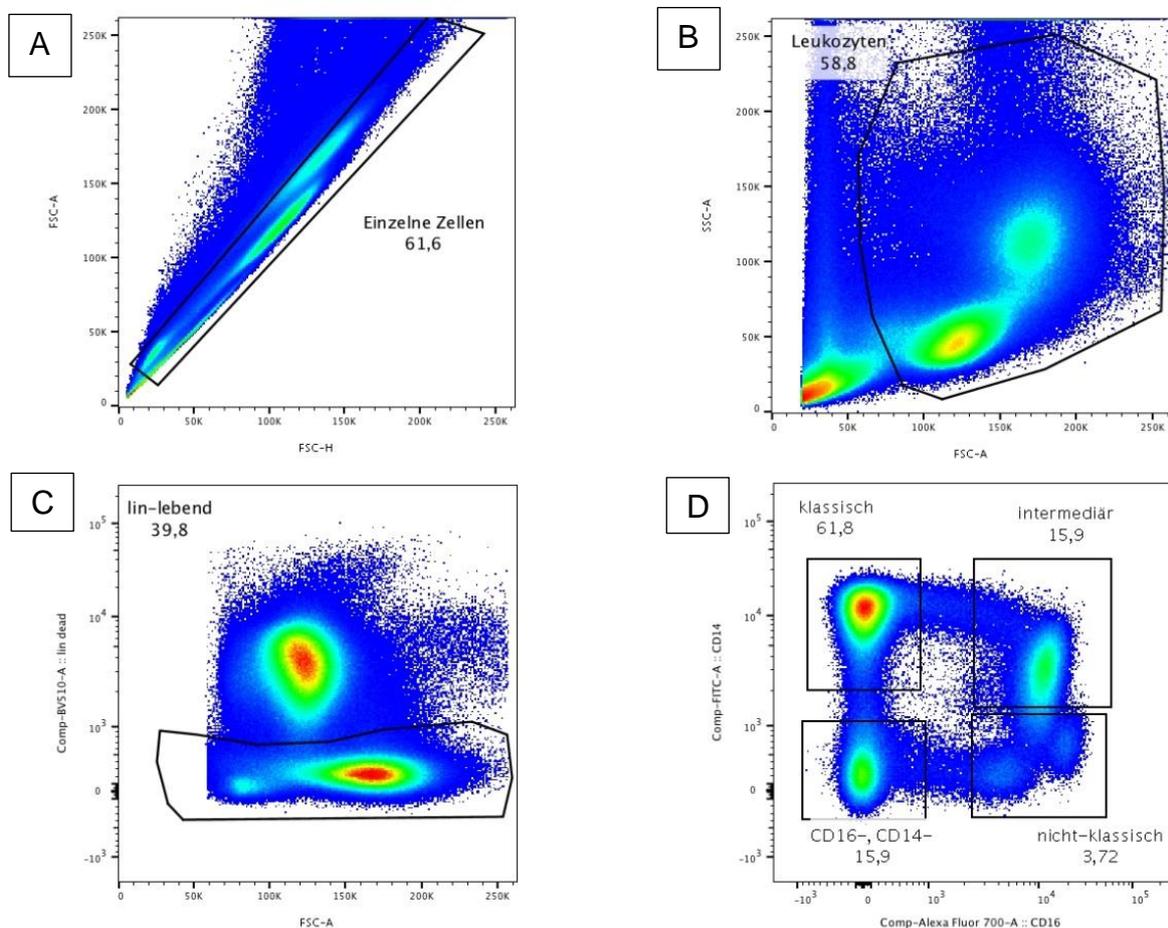
### 3.1. FACS-Analyse der Monozyten und Dendritischen Zellen aus Blut

Courth et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die Expression von Defensinen durch Panethzellen dem Einfluss von Monozyten zu unterliegen scheint und dass dieser bei MC-Patienten gestört zu sein scheint (Courth et al., 2015). Monozyten agieren als wichtige Faktoren im großen Feld des Immunsystems. Das Immunsystem arbeitet durch den Barrieredefekt auch bei der Erkrankung Colitis ulcerosa nicht optimal, weshalb Entzündungen entstehen (Antoni et al., 2014; Tytgat et al., 1996). Da sich die beiden Erkrankungen klinisch ähneln und es scheint, dass beide auf Stammzellendifferenzierungsstörungen beruhen (Gersemann et al., 2009; Wehkamp et al., 2007), ist es von großem Interesse, den Einfluss von Monozyten ebenfalls bei Patienten mit Colitis ulcerosa zu untersuchen. Monozyten kommen im Blut als klassische, intermediäre und nicht-klassische Zellen vor. Um herauszufinden, ob Monozyten allgemein oder einer ihrer Subtypen speziell diesen Einfluss ausübt, wurde mittels FACS-Analyse ein Überblick über das Verteilungsmuster der Zellen gewonnen. Vorarbeiten konnten bereits in geringer Probandenzahl andeuten, dass bei MC-Patienten die klassischen Monozyten stärker präsent waren als bei Gesunden. Dagegen schien es, dass die nicht-klassischen geringer vorhanden waren. Intermediäre Monozyten schienen indifferent. In dieser Arbeit soll jenes Ergebnis in größerer Probandenzahl untersucht werden. Zudem soll hier erstmals ein fundierter Überblick über das Verteilungsmuster der Monozyten-Subtypen bei Colitis ulcerosa gewonnen und dieses anschließend mit den Ergebnissen für M. Crohn verglichen werden.

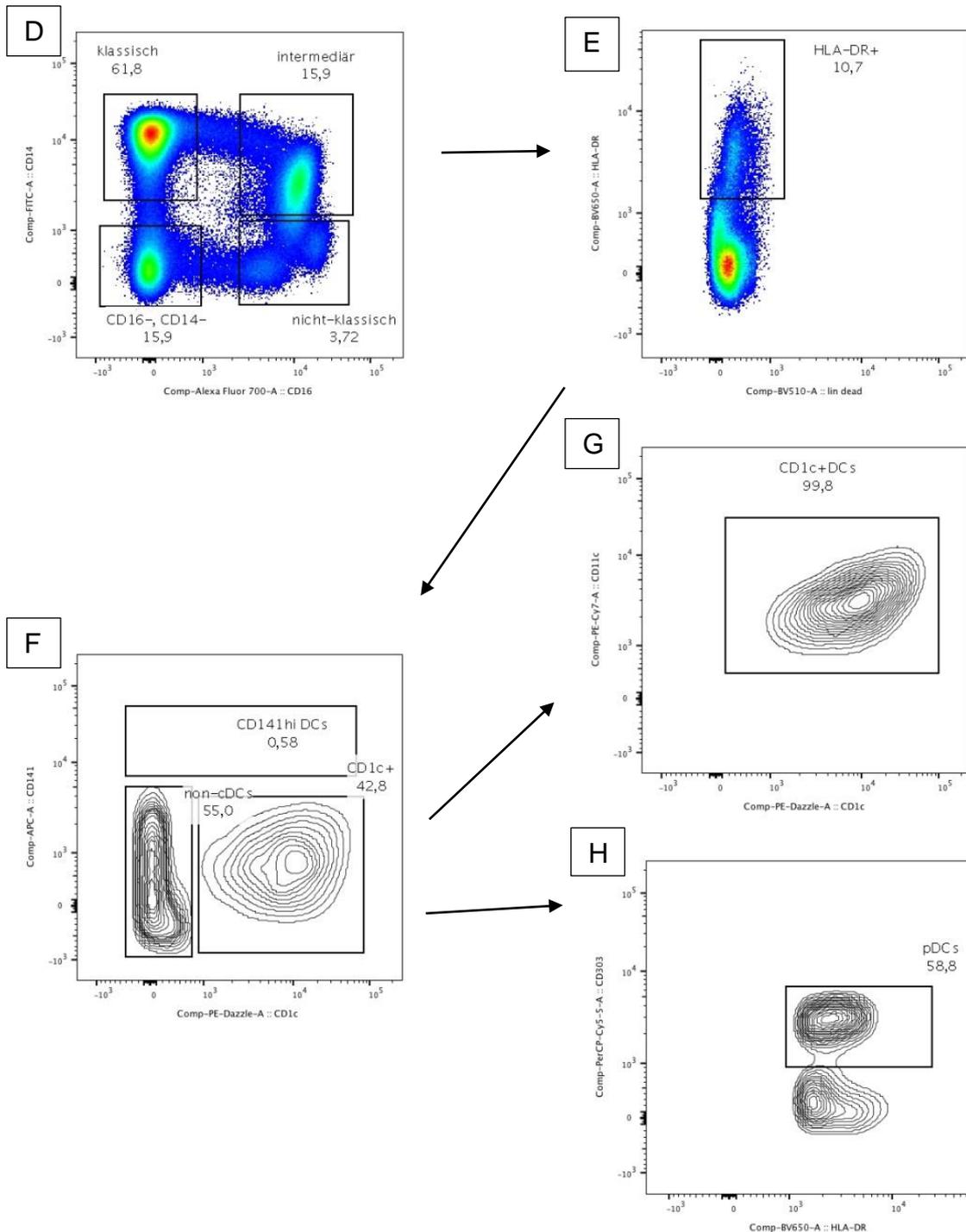
Da Dendritische Zellen und Monozyten derselben Entwicklungslinie entstammen, war es ebenso von Bedeutung, zu ermitteln, ob bei Dendritischen Zellen ähnliche Abweichungen im Verteilungsmuster gegenüber der Kontrollgruppe bestehen.

Für die FACS-Analyse der Monozyten und Dendritischen Zellen wurden periphere mononukleäre Zellen aus Blut von Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa, sowie Gesunden als Kontrolle, isoliert und neben einer Negativ-Selektion (CD3, CD19, CD20, CD56) mit den spezifischen Antikörpern für Monozyten (CD14, CD16) und dendritischen Zellen (CD1c, CD11c, CD141c, CD303) versehen.

Das Setzen der „Gates“ und die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels des Software-Programms FlowJo® (Abbildung 3 und 4).



**Abbildung 3: Beispiel einer Gatingstrategie der Monozyten.** Isolation von PBMCs aus Blut. In (A) werden einzelne Zellen aus PBMC-Isolat durch die Gates (FSC-H und FSC-A) herausgefiltert. Anhand dieser werden in (B) mittels Gate (SSC-A) die Leukozyten selektiert, in (C) mittels der AK-Gruppe BV510 Monozyten und Dendritische Zellen von den restlichen Leukozyten getrennt. (D) zeigt anhand der AK CD14 und CD16 die Verteilung der Monozyten in klassisch, intermediär und nicht-klassisch. Die CD16<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>-Population stellt u.a. die dendritischen Zellen dar. Ausgewertet mittels FlowJo®.



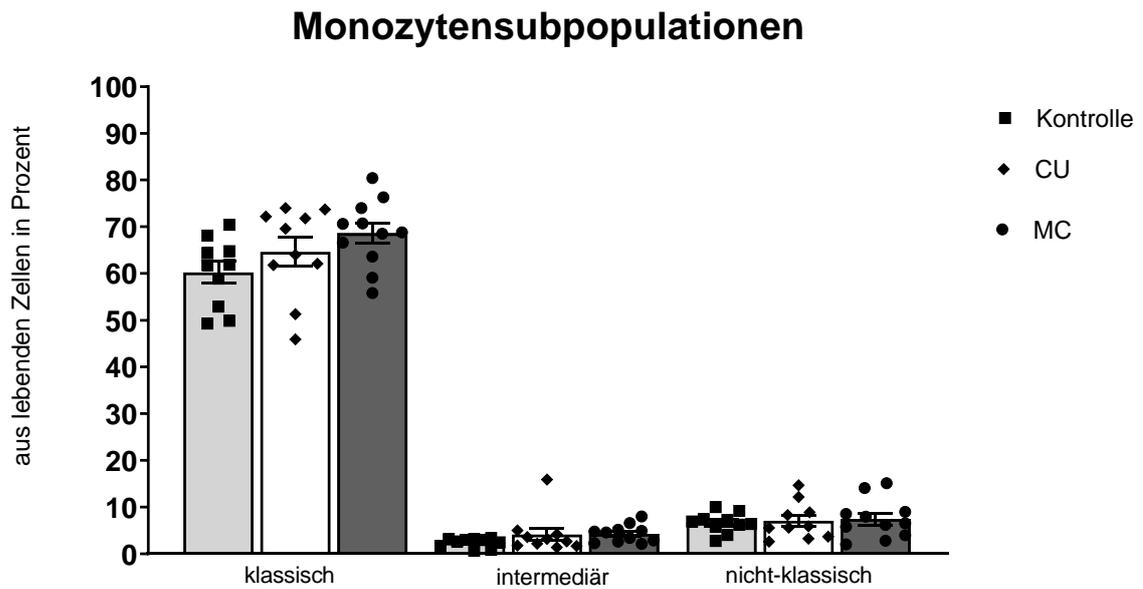
**Abbildung 4: Beispiel einer Gatingstrategie der Dendritische Zellen (DCs).** Isolation von PBMCs aus Blut. Vorangegangen ist die Gatingstrategie der Monozyten (A-D) (s. Abbildung 3). Ausgangspopulation (D) bestimmt durch AK CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>, weitere Selektion durch HLA-DR<sup>+</sup> in (E). In (F) Unterteilung der Zellen mittels AK CD141 und CD1c, dadurch Selektion der CD141<sup>hi</sup> myeloiden DCs. (G) ermittelt CD1c<sup>+</sup> myeloide DCs durch weiteren positiven AK CD11c. Erfassung der plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) durch AK CD303 (H). Auswertung mittels FlowJo®.

### 3.1.1. Verteilungsmuster der Monozytensubtypen

In Abbildung 5 ist das Verteilungsmuster für klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten dargestellt. Die klassischen Monozyten nahmen sowohl bei gesunden Kontrollen als auch bei CED-Patienten den größten Anteil an Monozyten im peripheren Blut ein. Sie kamen ungefähr 10 Mal häufiger vor als nicht-klassische Monozyten. Intermediäre Monozyten waren mit unter 5 % die am geringsten vorkommenden Monozyten.

Im direkten Vergleich der klassischen Monozyten waren diese bei MC-Patienten am stärksten präsent. Sie waren 8,34 % häufiger vorhanden als bei gesunden Kontrollprobanden (60,24 %). Auch CU-Patienten zeigten mit 64,64 % einen größeren Anteil an klassischen Monozyten als die gesunde Kontrolle. Sowohl für intermediäre als auch nicht-klassische Monozyten konnte eine Erhöhung der Zellpopulation beobachtet werden. Intermediäre Monozyten verdoppelten mit 2,4 % auf 4,2 % (CU) bzw. 4,3 % (MC) fast ihren Anteil an der Monozytenpopulation, während nicht-klassische Monozyten nur eine leichte Tendenz nach oben zeigten (~ 6 % auf ~ 7 %).

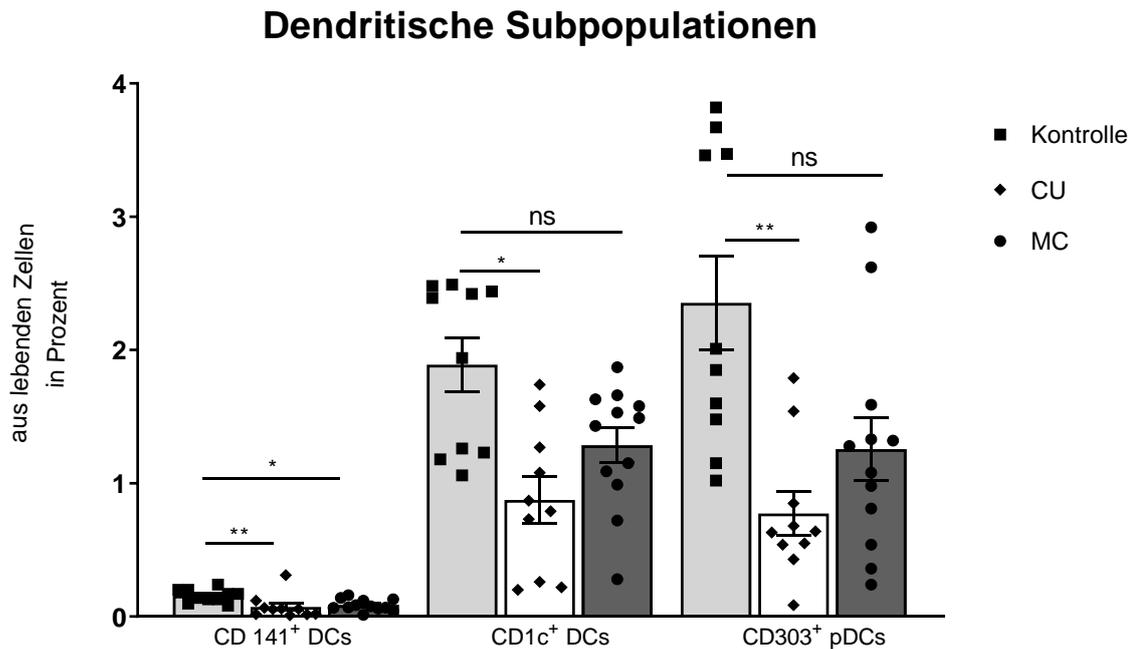
Für alle drei Subpopulationen erwiesen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistischen Signifikanzen.



**Abbildung 5: Verteilungsmuster der Monozytensubpopulationen.** Monozyten isoliert aus peripheren nukleären Zellen des Blutes, mittels FACS (CD14, CD16) selektiert. Keine Signifikanzen.

### 3.1.2. Verteilungsmuster der Dendritischen Zellen

Da Dendritische Zellen durch ihre Antigenpräsentation wie Monozyten entscheidend an der angeborenen Immunreaktion des Körpers gegen Pathogene beteiligt sind, wurden diese im Rahmen der Zellanalyse ebenfalls auf ihr Verteilungsmuster näher untersucht (Abbildung 6). Dabei wurde zwischen den zwei myeloiden Subpopulationen (CD141<sup>+</sup> DCs, CD1c<sup>+</sup> DCs) und den plasmazytoiden DCs (CD303<sup>+</sup> pDCs) unterschieden.



**Abbildung 6 Verteilungsmuster der Subpopulationen der Dendritischen Zellen.** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes. Selektion mittels FACS (CD141, CD1c, CD11c, CD303). Signifikanzen sind dargestellt durch \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; ns = nicht signifikant.

Dendritische Zellen kamen im peripheren mononukleären Blut nur zu einem sehr geringen Prozentsatz vor. Die Anteile am Gesamtvorkommen der DCs bei gesunden Kontrollprobanden beliefen sich auf 2,4 % bei plasmazytoiden DCs über 1,8 % bei CD1c<sup>+</sup> DCs bis zu 0,2 % bei CD141<sup>+</sup> DCs. Bei CU-Patienten und MC-Patienten konnten für Dendritische Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigte Werte für alle drei Subpopulationen beobachtet werden. Dabei traten die Reduktionen der Subpopulationen bei CU-Patienten stärker als bei MC-Patienten auf und waren dementsprechend signifikant. CD303<sup>+</sup> DCs und CD141<sup>+</sup> DCs wiesen dabei statistische Signifikanzen von  $p \leq 0,01$  (\*\*) auf, CD1c<sup>+</sup> DCs zeigten sich ebenfalls signifikant verändert (\*,  $p \leq 0,05$ ). CD1c<sup>+</sup> DCs waren ebenfalls die einzige Subpopulation, für die bei MC-Patienten signifikant veränderte Werte festgestellt wurden (\*,  $p \leq 0,05$ ). Für die zwei anderen Subpopulationen ergaben sich bei MC-Patienten keine statistischen Signifikanzen (ns).

### 3.2. RT-PCR-Analyse der klassischen Monozyten aus Blut

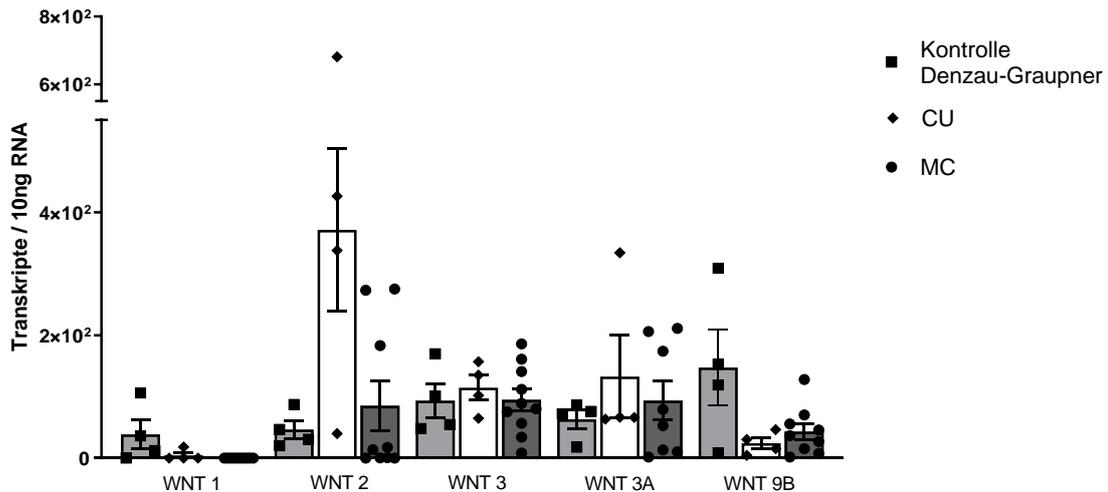
Das Verteilungsmuster der Monozyten aus 3.1.1 zeigte sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa die höchste Konzentration für den klassischen Subtyp (ca. 68 % bzw. 65 %). Da die klassischen Monozyten bei beiden Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Konzentrationen aufwiesen, sollten sie als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Nach erneuter Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Blut, gefolgt durch FACS-Zellsortierung und RNA-Isolation der klassischen Monozyten sollte nun mittels PCR-Analyse geschaut werden, ob die Konzentrationsveränderungen im Rahmen der Expression lokalen Defiziten zu Grunde liegen oder ob bereits auf genetischer Ebene Veränderungen sichtbar waren. Da Monozyten über den *Wnt*-Signalweg Einfluss auf die Expression von Defensinen durch Panethzellen zu nehmen scheinen, wurden die dazugehörigen Gene explizit untersucht.

Zunächst die *Wnt*-Gene *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT3A* und *WNT9B*, die Teil des kanonischen *Wnt*-Signalwegs sind und für die bereits Zusammenhänge in Bezug auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen aufgezeigt werden konnten (Huelsenken, 2002; Pataki et al., 2015), als nächstes zudem Gene für weitere Komponenten entlang dieses Signalwegs. Dabei wurden die Genexpressionen für M. Crohn und die für Colitis ulcerosa miteinander verglichen. Für einen Vergleich mit gesunden Kontrollen wurde auf Vorarbeiten von Denzau-Graupner (unveröffentlichte Daten) zurückgegriffen, da sich eine Isolation der RNA aus Kontrollblut auf Grund geringen Konzentrationen im Blut weitgehend als schwierig erwies. Eine Bestimmung der Signifikanz war deshalb nicht möglich. Die Expression der untersuchten Gene ist in Kopienzahl/ 10 ng RNA angegeben.

Die nähere Untersuchung der dendritischen Zellpopulation wurde für diese Arbeit nicht weiter verfolgt, da ihre Konzentration für eine weitere RNA-Isolation nach heutigem technischen Stand ebenfalls zu gering war.

### 3.2.1. *Wnt*-Liganden

In Abbildung 7 sind die Genexpressionen der für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wichtigsten *Wnt*-Gene dargestellt. Diese beinhalten die Gene *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT3A* und *WNT9B*. Sie aktivieren bei Anlagerung an den Rezeptor den kanonischen *Wnt*-Signalweg.



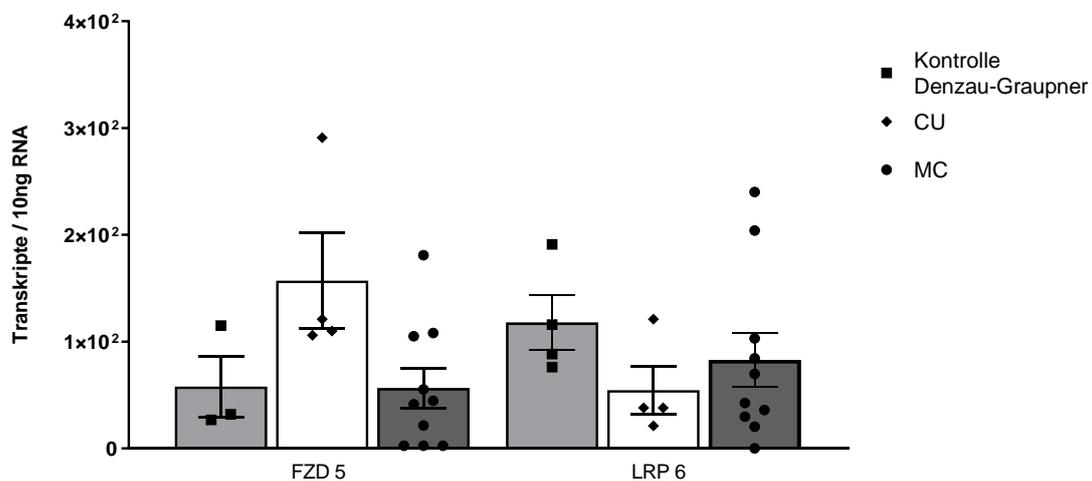
**Abbildung 7: Expressionsanalyse der *Wnt*-Gene *WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT3A*, *WNT9B*.** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa. . N (CU) = 4, N (MC) = 8-10, N (Kontrolle) = 4. Freundliche Genehmigung der Kontrollgruppe durch Denzau-Graupner. Nicht signifikante Ergebnisse.

Für *WNT2* wurde bei CU-Patienten eine deutlich erhöhte Expression im Gegensatz zu der bei M. Crohn-Patienten gemessen. Dieses Gen zeigte die höchste Expression in Bezug auf die *Wnt*-Gene. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe von Denzau-Graupner kann diese Erhöhung bei Colitis ulcerosa bestätigt werden. *WNT3* und *WNT3A* stellten sich beide mit leicht erhöhten Expressionen bei CU-Patienten dar. Dementsprechend waren die Level für MC-Patienten niedriger. Gesunde Kontrollen zeigten bei *Wnt3* ähnliche Ergebnisse zu MC-Patienten, bei *WNT3A* stellten sich CED-Patienten mit höheren Expressionen als die gesunden Kontrollen dar. Insgesamt wiesen *WNT2*, *WNT3* und *WNT3A* für MC-Patienten im direkten Vergleich ähnlich hohe Expressionen auf. Für *WNT9B* ließen sich niedrigere Expressionslevel ermitteln. CU-Patienten

zeigten dabei für WNT9B leicht niedrigere Werte als MC-Patienten. Beide waren deutlich niedriger als die Werte der Kontrollgruppe. *WNT1* konnte für beide Patientengruppen nicht erfasst werden.

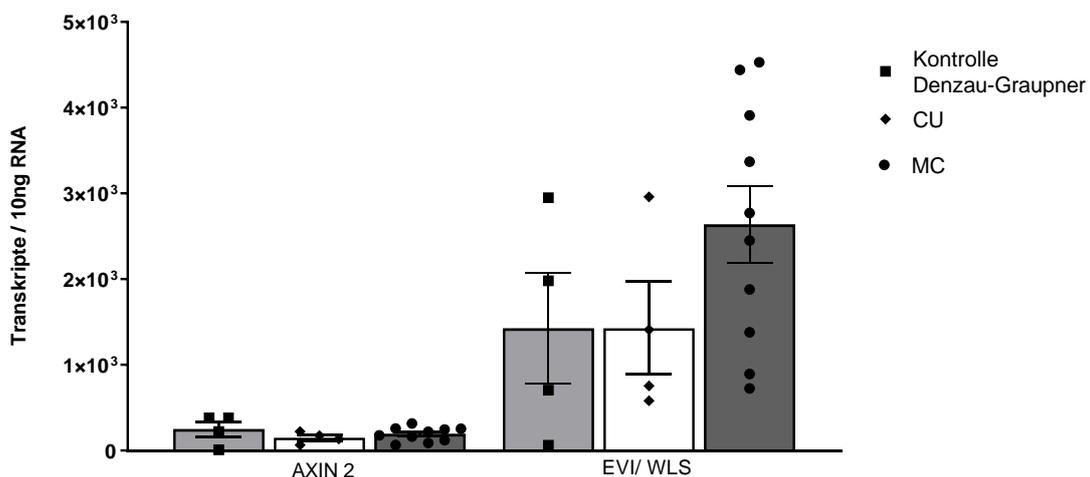
### 3.2.2. Weitere Gene im *Wnt*-Signalweg

Neben den *Wnt*-Liganden aus Kapitel 3.2.1. wurden die Expressionen weiterer wichtiger Gene des *Wnt*-Signalwegs näher untersucht. Die Rezeptoren, mit denen die *Wnt*-Liganden an der Zelloberfläche eine Verbindung eingehen, gehören der *Frizzled* (*FZD*)-Familie an (Huelsen, 2002). *FZD5*, ein Subtyp, zeigte bei CU-Patienten eine niedrigere Genexpression als bei MC-Patienten (Abbildung 8). Im Vergleich wiesen beide Patientengruppen niedrigere Werte als die Kontrollgruppe von Denzau-Graupner auf. Dahingegen ließ sich für CU-Patienten für LRP6, den Co-Faktor von *FZD5*, eine deutliche Erhöhung der Expression wahrnehmen. Die Werte für MC-Patienten glichen sich mit den niedrigeren Messergebnissen der Kontrollgruppe. Beide Erkenntnisse waren nicht signifikant.



**Abbildung 8: Expressionsanalyse von Frizzled 5 (FZD5) und LRP6.** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa. . N (CU) = 4, N (MC) = 10, N (Kontrolle) = 3-4. Freundliche Genehmigung der Kontrollgruppe durch Denzau-Graupner. Nicht signifikante Ergebnisse.

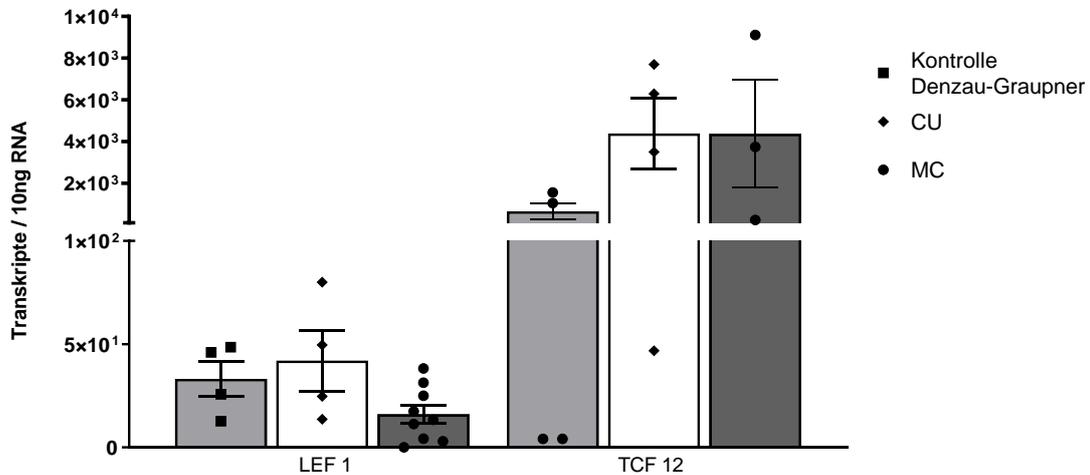
Zudem wurden die beiden Gene *AXIN2* und *EVI/WLS* in Bezug auf Veränderungen der Genexpression näher betrachtet (Abbildung 9). Auf den ersten Blick ließen sich insgesamt höhere Expressionen für *EVI/WLS* beobachten als für *AXIN2*. *AXIN2* zeigte im Vergleich der Expressionslevel bei Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn ähnliche Werte auf. Sie zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe von Denzau-Graupner beide erniedrigt. Für das Gen *EVI/WLS* hingegen fielen Unterschiede auf. MC-Patienten zeigten im Gegensatz zu CU-Patienten deutlich erhöhte Expressionen. CU-Patienten deckten sich hingegen mit den gemessenen Expressionen der Kontrollgruppe von Denzau-Graupner. Alle gemessenen Unterschiede stellten keine signifikanten Ergebnisse dar.



**Abbildung 9: Expressionsanalyse von AXIN2 und EVI/WLS.** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa. . N (CU) = 4, N (MC) = 10, N (Kontrolle) = 4. Freundliche Genehmigung der Kontrollgruppe durch Denzau-Graupner. Nicht signifikante Ergebnisse.

Zuletzt wurden die Expressionen der Gene *LEF1* und *TCF12* ermittelt (Abbildung 10). *LEF1* zeigte für CU-Patienten ein leicht erhöhtes Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollwerten von Denzau-Graupner. Im Gegensatz dazu war das Level bei MC-Patienten leicht erniedrigt. Die Expressionen für *TCF12* wiesen bei beiden CED-Patienten ähnliche Werte auf. Im Vergleich mit den gesunden Kontrollprobanden von Denzau-Graupner waren

die Level für *TCF12* bei ihnen um ein Siebenfaches höher. Beide Gene, für MC-als auch CU-Patienten, zeigten keine signifikanten Veränderungen.



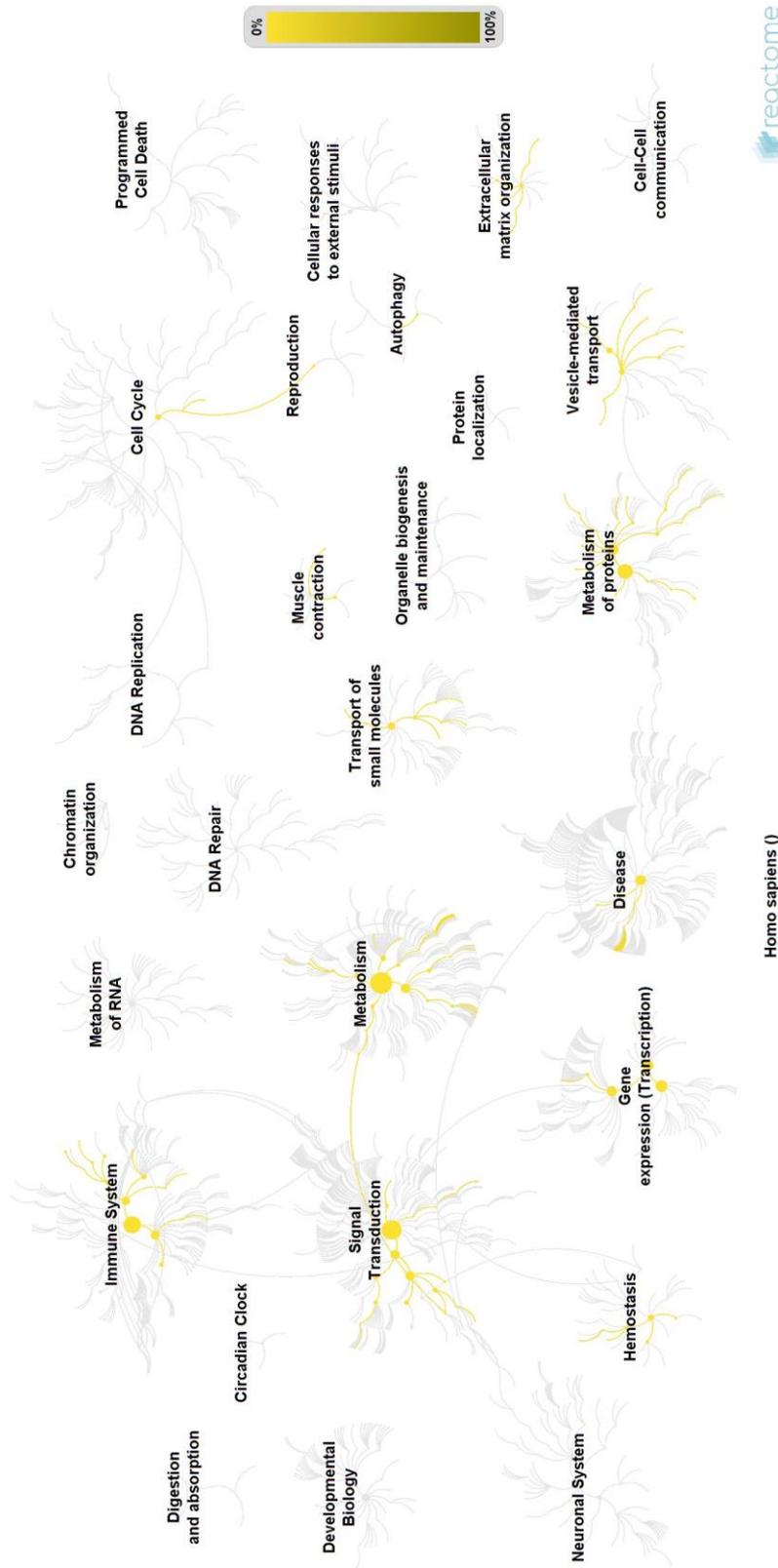
**Abbildung 10: Expressionsanalyse von LEF 1 und TCF 12.** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa. N (CU) = 4, N (MC) = 3 (TCF12) bzw. 9 (LEF1), N (Kontrolle) = 4. Freundliche Genehmigung der Kontrollgruppe durch Denzau-Graupner. Nicht signifikante Ergebnisse.

### 3.3. Analyse der RNA-Sequenzierung

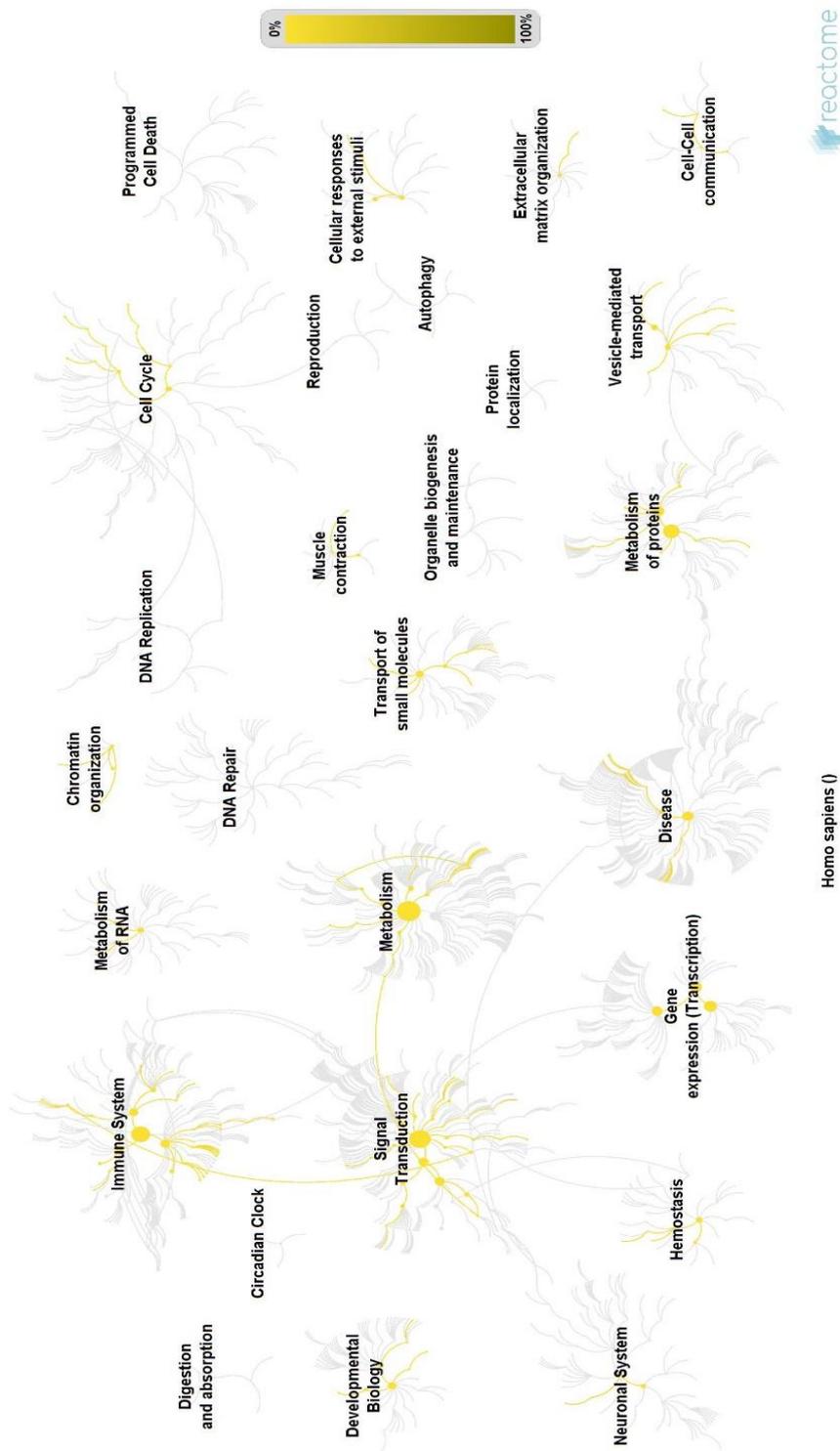
Mittels der RNA-High-Sequenzierungsmethode wurde in dieser Arbeit die Genome von vier Patienten mit Colitis ulcerosa und drei Patienten mit M. Crohn bestimmt, um weitere Erkenntnisse über die Ursachen der Krankheiten zu erlangen. Die RNA-Sequenzierungsmethode ermöglicht die Erweiterung des Wissensstands in Bezug auf das gesamte Genom der Zelle, im Fall der vorliegenden Arbeit des Monozyts. Dies war allein mit der qRT-PCR-Methode in diesem Rahmen nicht möglich. Die Pathomechanismen der beiden Vertreter der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gelten als hoch komplex und sind bis heute in vielen Bereichen noch unverstanden. Sowohl dysfunktionale physikalische wie biologische Barrieren im Rahmen der primären Immunabwehr scheinen eine Rolle zu spielen (s. Kapitel 1.1. und 1.4.) als auch sekundäre Defizite im Zusammenspiel der einzelnen Immunzellen (s. Kapitel 1.2.4.). Zudem zeigt sich eine Verbindung zu Entstehungsmechanismen des kolorektalen

Karzinoms, da auch hier der *Wnt*-Signalweg zentral zu sein scheint (s. Kapitel 1.3.3.).

In den zwei nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 11 und 12) sind verschiedene wichtige Signalwege des menschlichen Körpers in Clustern dargestellt (via [www.reactome.org](http://www.reactome.org)). Hinter jedem Signalweg stehen Gene, die durch das Programm als jeweils zugehörig zum Signalweg definiert wurden. Die Gene, die in das Programm eingespeist wurden, sind jeweils signifikant für Colitis ulcerosa (Abbildung 11) oder M. Crohn (Abbildung 12). Für Colitis ulcerosa stellten sich 42 Gene als signifikant dar, für M. Crohn 58 Gene. Farblich markiert wurden in den Abbildungen die Signalwege, für die sich bei den beiden Patientengruppen Gene mit veränderten Genexpressionen fanden. Diese sind, je nach Anteil an der definierten Gengruppe, unterschiedlich stark gefärbt.



**Abbildung 11: Überblick über signifikant (Gene mit Foldchange FC > 0,5 und FC < -0,5) veränderte Genexpressionen bei Colitis ulcerosa.** Darstellung der gemessenen Gene in zusammengehörigen Gengruppen. Je mehr gemessene Gene zu einer Gengruppe gehören (in Prozent), desto dunkler das Gelb. Auswertung mittels REACTOME (Fabregat et al., 2017).



**Abbildung 12: Überblick über signifikant (Gene mit Foldchange FC > 0,5 und FC < -0,5) veränderte Genexpressionen bei M. Crohn.** Darstellung der gemessenen Gene in zusammengehörigen Gengruppen. Je mehr gemessene Gene zu einer Gengruppe gehören (in Prozent), desto dunkler das Gelb. Auswertung mittels REACTOME (Fabregat et al., 2017).

Die Tabellen in den folgenden Unterkapiteln zeigen eine Übersicht über die Genabschnitte, die für unterschiedliche Proteine kodieren und die bei den untersuchten Patienten in der RNA-High-Sequenzierung Veränderungen in ihrer Expression aufwiesen. Sie sind nach den Schwerpunkten *Wnt*-Signalweg, Entzündung und Kolon-Karzinogenese zusammengefasst, da diese für chronisch entzündliche Darmerkrankungen in Bezug auf ihre Erkrankungsmechanismen besonders wichtig zu sein scheinen. Dabei gehören einige der Gene mehreren Schwerpunkten an, das heißt, sie spielen beispielsweise eine Rolle im *Wnt*-Signalweg, der gleichzeitig auch in der Kolon-Karzinogenese von Bedeutung ist. Die Gene sind im Ergebnisteil deshalb teilweise mehrfach zugeteilt, werden im Diskussionskapitel jedoch ganzheitlich besprochen. Die Ergebnisse sind auf die Kontrollgruppe normiert.

### 3.3.1. Genexpressionsanalyse im Rahmen des *Wnt*-Signalwegs

Die in Kapitel 3.2. mittels RT-PCR bereits näher untersuchten *Wnt*-Gene (Tabelle 6) konnten mittels RNA-High Sequencing nicht erfasst werden. Auch die weiteren untersuchten Gene des *Wnt*-Signalwegs waren in ihrer Expression nur gering von der Kontrollgruppe abweichend und dementsprechend nicht signifikant (Tabelle 7). Dies traf für CU- und MC-Patienten zu. Eine leicht erhöhte Expression für beide Patientengruppen zeigte sich bei *APC* und *PORCN*. Zudem ließ sich bei CU-Patienten allein ein erhöhtes, jedoch nicht signifikantes Expressionslevel für *Frizzled 5 (FZD5)* beobachten. Des Weiteren waren die Expressionen von MC-Patienten für *LEF1*, *TCF4* und *TCF12* leicht erniedrigt. *TCF3* hingegen zeigte sich eher mit einer Tendenz nach oben.

**Tabelle 6: Genexpressionsanalyse für *Wnt*-Liganden im Rahmen der *Wnt*-Signalwegs von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und M. Crohn (MC).** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen aus Blut. Analyse der Zellen mittels RNA-Sequenzierung. Aufzeigen von erhöhten (rot) bzw. erniedrigten (blau) Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. NA (non available) = nicht erfasst. Signifikant bei  $\log_2(\text{Foldchange})$  bzw.  $\log_2(\text{FC}) > 0,5$  und  $\log_2(\text{FC}) < - 0,5$  und  $\text{FDR} < 0,05$ . N (MC) = 3, N (CU) = 4, N (Kontrollgruppe) = 4.

Wnt Gene	Patienten	
	log <sub>2</sub> (FC)	
	CU	MC
WNT1	NA	NA
WNT2	NA	NA
WNT3	NA	NA
WNT3A	NA	NA
WNT9B	NA	NA

**Tabelle 7: Genexpressionsanalyse für weitere Gene im Rahmen des *Wnt*-Signalwegs von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und M. Crohn (MC).** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen aus Blut. Analyse der Zellen mittels RNA-Sequenzierung. Gezeigt werden erhöhte (rot) bzw. erniedrigte (blau) Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. NA (non available) = nicht erfasst. Signifikant bei  $\log_2(\text{Foldchange})$  bzw.  $\log_2(\text{FC}) > 0,5$  und  $\log_2(\text{FC}) < - 0,5$  und  $\text{FDR} < 0,05$ . N (MC) = 3, N (CU) = 4, N (Kontrollgruppe) = 4. Werte in Kursiv bei modifiziertem FC (FDR) nicht mehr signifikant.

Wnt-Signalweg	Patienten	
	log <sub>2</sub> (FC)	
	CU	MC
EVI/WLS	-0,1	0,0
FZD5	<i>0,5</i>	-0,1
LRP6	-0,1	-0,1
AXIN2	NA	NA
LEF1	0,0	- 0,1
TCF12	0,1	-0,4

Dennoch ließen sich weitere Gene auffinden, die Teil des *Wnt*-Signalwegs waren und sowohl bei Patienten mit Colitis ulcerosa als auch bei Patienten mit M. Crohn Veränderungen in ihrer Genexpression aufwiesen (Tabelle 8). *CTBP2*, *RAP2A*, *PPP2R5A* und *TPRG1L* wiesen bei MC-Patienten signifikant erniedrigte Expressionslevel auf. Diese Gene zeigten bei CU-Patienten fast keine Veränderungen der Genexpression. *JADE1* fiel bei MC-Patienten ebenfalls erniedrigt auf. CU-Patienten zeigten ähnliche, jedoch nicht signifikante Veränderungen.

*LRP8* zeigte als Gen des *Wnt*-Signalwegs bei CU-Patienten eine erhöhte Genexpression auf. Dies schien spezifisch für diese Patientengruppe zu sein, da MC-Patienten so gut wie keine Veränderungen zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen. *C1QA* war hingegen für MC-Patienten mit einem Foldchange von 1,5 signifikant erhöht. CU-Patienten wiesen nur eine leicht veränderte Genexpression auf.

**Tabelle 8: Genexpressionsanalyse für weitere Gene im Rahmen des *Wnt*-Signalwegs von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und M. Crohn (MC).** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen aus Blut. Analyse der Zellen mittels RNA-Sequenzierung. Gezeigt werden erhöhte (rot) bzw. erniedrigte (blau) Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikant bei  $\log_2$  (Foldchange) bzw.  $\log_2$  (FC) > 0,5 und  $\log_2$  (FC) < -0,5 und FDR < 0,05. N (MC) = 3, N (CU) = 4, N (Kontrollgruppe) = 4. Werte in Kursiv bei modifiziertem FC (FDR) nicht mehr signifikant.

Weitere Wnt-Signalweg- Komponenten	Patienten $\log_2$ (FC)	
	CU	MC
TCF3	-0,1	0,1
TCF4	0,0	-0,4
PORCN	0,2	0,2
APC	0,4	0,4
APCDD1	0,9	0,7
C1QA	0,3	1,5
LRP8	0,9	0,1
VCAN	0,6	0,3

SDC2	0,0	1,3
SDC4	1,2	1,0
CCL2	-0,5	1,5
JADE1	-0,6	-0,8
ALDH1B1	-0,8	-0,6
PACSIN2	0,0	-0,8
CTBP2	-0,1	-0,8
RAP2A	0,0	-0,7
PPP2R5A	-0,1	-0,7

### 3.3.1.1. Zusammenfassung „*Wnt*-Signalweg“

Die ursprünglich untersuchten Gene des *Wnt*-Signalwegs wurden in der RNA-Sequenzierung nicht erfasst oder verändert aufgefunden. Dennoch gibt es weitere Gene, die verändert exprimiert beobachtet wurden. Für CU-Patienten zeigten sich erhöhte Expressionen für *LRP8*. Für MC-Patienten ergaben sich erniedrigte Expressionslevel für *TCF4* und einige, weitere Gene des *Wnt*-Signalwegs.

### 3.3.2. Genexpressionsanalyse im Rahmen der Entzündung

Der Name „Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen“ impliziert bereits an sich, dass die Entzündung und damit das Immunsystem in großem Maße an den beiden Erkrankungen beteiligt zu sein scheint. Da das Immunsystem aber ziemlich komplex ist, sollte untersucht werden, ob sich Veränderungen in der Genexpression in manchen Signalwegen stärker präsentieren als in anderen. In Tabelle 9 sind 31 Gene aufgelistet, die in Bezug auf das Immunsystem signifikante Veränderungen der Genexpression aufwiesen. Sie bezogen sich auf CU- und MC-Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe der Gesunden.

**Tabelle 9: Genexpressionsanalyse für Gene im Rahmen der Entzündung von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und M. Crohn (MC).** Isolation aus peripheren mononukleären Zellen aus Blut. Analyse der Zellen mittels RNA-Sequenzierung. Gezeigt werden erhöhte (rot) bzw. erniedrigte (blau) Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikant bei  $\log_2$  (Foldchange) bzw.  $\log_2$  (FC) > 0,5 und  $\log_2$  (FC) < -0,5 und FDR < 0,05. N (MC) = 3, N (CU) = 4, N (Kontrollgruppe) = 4. Werte in Kursiv bei modifiziertem FC (FDR) nicht mehr signifikant.

Entzündung	Patienten $\log_2$ (FC)	
	CU	MC
CCL2	-0,5	1,5
CCL4	-1,0	-0,3
FGD2	-1,0	-0,8
FAM220A	-0,4	-1,0
MYCL	-0,4	-1,1
CLEC5A	-0,5	-1,4
SLC2A14	-1,6	-1,3
IFIT2	-0,9	-0,1
IFIT3	-1,1	0,0
USP18	-1,1	-0,1
RSAD2	-1,0	-0,5
MX1	-0,9	-0,3
IRF1	-0,6	-0,2
TAGAP	-0,9	0,1
LY6E	-0,9	-0,3
MAVS	0,4	1,0
TNFRSF9	-0,9	-0,4
TNFRSF12A	0,7	1,6
CCR1	0,2	0,7
SDC2	0,0	1,3
SDC4	1,2	1,0
FCGR3A	0,1	1,1
MAVS	0,4	1,0
Selenok	0,0	0,6

S100A11	0,2	0,6
C1QA	0,3	1,5
PDE4D	0,8	0,7
IGF2R	0,7	0,3
STAB1	0,9	-0,1
VSIG4	0,3	1,4
CCR1	0,2	0,7

Es fanden sich bei CU-Patienten 14 Gene, die im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe eine signifikant veränderte Expression aufwiesen. Es fiel auf, dass der Großteil von ihnen, 10 Gene, eine erniedrigte Expression zeigte. Unter ihnen fanden sich Gene wie *IFIT2*, *IFIT3*, *Mx1*, *TNFRSF9*, *IRF1*, *USP18* und *RSAD2*. Gene, die sich alle dem *IFN III* induzierten Signalweg zuordnen ließen (Ivashkiv and Donlin, 2014; Schoggins, 2014; Shin et al., 2019). Dieser führt bei Aktivierung über den *JAK/STAT*-Signalweg letztendlich zur Genexpression, unter anderem von „Interferon-induzierten Genen“, die im Körper für eine pro-inflammatorische Immunantwort sorgen (Ivashkiv and Donlin, 2014). Für M. Crohn ließen sich ebenfalls Änderungen in der Genexpression nachweisen. Diese wiesen jedoch einen anderen Schwerpunkt auf als bei CU-Patienten. Die Gene, die eine Rolle im *Interferon Typ III*-Signalweg spielen und dessen Expression bei CU-Patienten signifikant erniedrigt waren, zeigten bei MC-Patienten nur eine geringe bis unveränderte Abweichung der Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Dafür fiel *MAVS* auf, ein weiteres Gen dieses Signalwegs, das sich in seiner Expression bei MC-Patienten erhöht zeigte. Es fanden sich jedoch auch Gene wie *MYCL* und *FAM220A*, die bei MC-Patienten erniedrigte Expressionen aufwiesen.

Ein weiteres Gen, welches bei Patienten mit Colitis ulcerosa eine niedrige Expression zeigte, ist *SLC2A14*. Für diese Patientengruppe war *SLC2A14* sogar die signifikant am stärksten ausgeprägte Veränderung der Expression. Das Gen kodiert für den Glucosetransporter *GLUT3*, welcher Glucose und Fructose, aber auch eine Form von Vitamin C in die Zellen transportiert (Rivas et al., 2008).

Interessant ist, dass auch bei M. Crohn eine erniedrigte Expression für das Gen *SLC2A14* zu beobachten war. Sie war nicht ganz so niedrig wie die Expression von *SLC2A14* bei CU-Patienten, jedoch mit einer Foldchange von -1,3 ebenfalls eindeutig signifikant.

Des Weiteren ließ sich für das Gen *CCL4* bei CU-Patienten, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, eine niedrige Expression feststellen. Das dazugehörige Protein ist ein Zytokin und durch seine chemokinen und inflammatorischen Funktionen wichtig für die Immunantwort. *CCL2* als weiteres Zytokin zeigte ebenfalls eine niedrige Expression, jedoch nicht so stark wie *CCL4*. Für MC-Patienten ließen sich andere Expressionen beobachten. *CCL2* wies beispielsweise eine erhöhte Expression mit einem Foldchange von 1,5 auf. Leicht erniedrigt bei Patienten mit CU, zeigten MC-Patienten mit der erhöhten Expression von *CCL2* dazu einen deutlichen Gegensatz.

Insgesamt dominierten bei den untersuchten, signifikanten Genen für MC-Patienten – mit 13 von 17 – Gene mit erhöhter Expression. Dazu gehörten beispielsweise die zwei Syndecane *SDC2* und *SDC4*. *SDC2* stellte sich bei MC-Patienten mit einem Foldchange von 1,3 signifikant erhöht dar bei gleichzeitig fehlender Genexpressionsveränderung bei CU-Patienten. *SDC4* hingegen fiel mit einem Foldchange von 1,2 bei CU-Patienten mit einem erhöhten Expressionslevel auf. MC-Patienten zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression, jedoch nicht signifikant.

### **3.3.2.1. Zusammenfassung „Entzündung“**

In der RNA-Sequenzierung wurden zahlreiche Gene mit veränderter Expression beobachtet, die eine wichtige Rolle während einer Entzündung spielen. Gerade CU-Patienten zeigten viele Gene mit erniedrigten Expressionen, die dem *Interferon*-Signalweg angehören. Ein wichtiges Gen ist hier beispielsweise *IRF-1*. Zudem zeigten sich Veränderungen in Bezug auf die Gengruppe der *Syndecane*, die gegensätzliche Expressionen im Vergleich der beiden CED-Erkrankungen aufwiesen. Ebenso zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Chemokinrezeptoren, bei denen sich je nach Rezeptor entweder bei MC oder CU erhöhte Expressionen beobachten ließen.

### 3.3.3. Genexpressionsanalyse im Rahmen der Kolon-Karzinogenese

Die Genanalyse bei Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn zeigte zudem einige Veränderungen der Expression bei Genen, die sich dem Bereich Karzinogenese im Kolon zuordnen lassen (Tabelle 10). Da für beide Patientengruppen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Karzinomen zu bestehen scheint (Canavan et al., 2006; Eaden et al., 2001; Freeman, 2008), war es interessant herauszufinden, ob sich dieses Risiko auch in der Genanalyse widerspiegelt. Monozyten werden durch Sekretion von Botenstoffen durch Tumorzellen zum Tumor gerufen und zu seinen Gunsten in ihrer Genexpression verändert (Mantovani et al., 1992). Diesbezüglich ging es unter anderem auch um Gene, die speziell eine Verbindung zum Colitis-assoziierten Kolon-CA aufwiesen. Es fanden sich 17 Gene zum Thema Kolon-Karzinogenese.

**Tabelle 10: Genexpressionsanalyse für Gene im Rahmen der Kolon-Karzinogenese von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und M. Crohn (MC).**

Isolation aus peripheren mononukleären Zellen aus Blut. Analyse der Zellen mittels RNA-Sequenzierung. Gezeigt werden erhöhte (rot) bzw. erniedrigte (blau) Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikant bei  $\log_2$  (Foldchange) bzw.  $\log_2$  (FC) > 0,5 und  $\log_2$  (FC) < - 0,5 und FDR < 0,05. N (MC) = 3, N (CU) = 4, N (Kontrollgruppe) = 4. Werte in Kursiv bei modifiziertem FC (FDR) nicht mehr signifikant.

Kolon-Karzinogenese	Patienten $\log_2$ (FC)	
	CU	MC
APCDD1	0,9	0,7
ABHD2	0,7	0,2
MLH3	0,7	0,1
SAT1	0,1	1,0
SLC6A6	0,6	0,7
S100P	0,3	1,1
S100A11	0,2	0,6
TNFRSF12A	0,7	1,6
TNFRSF9	-0,9	-0,4
ALDH1B1	-0,8	-0,6
TTC9	-1,0	-0,7

MYCL	-0,4	-1,1
ST6GAL1	-0,6	-0,7
IFIT2	-0,9	-0,1
IFIT3	-1,1	0,0
RBM38	0,0	-0,8
ZNF652	-0,1	-0,7

Ein Gen, für das eine erhöhte Expression beobachtet werden konnte, war *APCDD1*. Dies traf für beide Patientengruppen zu. Im Vergleich zu CU-Patienten war diese Erhöhung bei Zuhilfenahme des modifizierten FDR bei MC-Patienten jedoch nicht mehr signifikant. *APCDD1* wurde bereits in seiner Funktion als direktes Zielgen des *Wnt*-Signalwegs beschrieben, dem eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Kolon-CA beigemessen wird (Takahashi et al., 2002).

Für das Gen *ALDH1B1* konnte für beide Patientengruppen eine erniedrigte Expression beobachtet werden. Dies war jedoch nur für CU-Patienten signifikant. *ALDH1B1*, physiologisch in der Kryptenbasis vorkommend und auch in Kolon-CA-Zellen gemessen, scheint durch Modulation des *Wnt*-Signalwegs und weiteren Signalwegen zur Entstehung des Kolon-CA beizutragen (Singh et al., 2015). Zudem wurde *ALDH1B1* als valider, neuer immunhistologischer Marker für CRC bestimmt (Matsumoto et al., 2017).

Auch Tumornekrosefaktor-Rezeptoren scheinen eine Rolle im Rahmen der Genexpressionsanalyse der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu spielen. Sowohl bei MC- als auch bei CU-Patienten zeigten sich signifikante Veränderungen. *TNFRSF9* beispielsweise wies für CU-Patienten mit einer Foldchange von -0,9 eine deutlich erniedrigte Expression auf. MC-Patienten zeigten eine ähnliche Darstellung, jedoch in abgeschwächter und deshalb nicht signifikanter Form. In deutlichem Kontrast dazu präsentierte sich das Gen *TNFRSF12A*. Für beide Patientengruppen ließen sich erhöhte Genexpressionslevel beobachten. Alleinig für MC-Patienten war dies mit einer Foldchange von 1,6 jedoch signifikant.

Des Weiteren zeigten sich bei beiden Patientengruppen erhöhte Expressionen für das Gen *SLC6A6* – kodierend für einen Taurin-Transporter –, welches an Signalwegen beteiligt sein soll, die das Überleben der Zelle sichern. Das Gen wurde bereits erhöht in kolorektalen Zellen gemessen (Yasunaga and Matsumura, 2014). In den Messungen dieser Arbeit waren die Expressionen nur für CU-Patienten signifikant verändert.

Für die Gene *IFIT2* und *IFIT3*, wie in Kapitel 3.3.2. bereits erwähnt, konnten für CU-Patienten niedrigere Expressionen als in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Neben ihrer Verantwortung im *Interferon*-Signalweg werden die zwei Gene auch durch den *Wnt*-Signalweg mitbeeinflusst (Ohsugi et al., 2017).

Für MC-Patienten ließen sich signifikante Veränderungen für die Gene *S100P* und *S100A11* beobachten. Beide zeigten erhöhte Expressionslevel im Vergleich zu nur leicht erhöhten Expressionen bei CU-Patienten. Vertreter der *S100*-Familie sind in entzündliche und proliferative Prozesse des Darms involviert und werden, speziell *S100P*, als prognostische Marker für das kolorektale Karzinom gehandelt (Ichikawa et al., 2011; Moravkova et al., 2016; Wang et al., 2012).

#### **3.3.3.1. Zusammenfassung „Kolon-Karzinogenese“**

Es wurden einige Gene gefunden, die auch im Rahmen des *Wnt*-Signalwegs bei Veränderung ihrer Expression zur Entstehung eines Kolonkarzinoms beitragen könnten. Darunter befinden sich *IFIT2* und *IFIT3* als auch *APCDD1* oder Gene der *S100*-Familie. Die Gene zeigten sowohl niedrigere als auch höhere Expressionen.

## 4 Diskussion

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um weitere Unterschiede zwischen Colitis ulcerosa und M. Crohn festzustellen und dadurch beide Erkrankungen besser voneinander abgrenzen zu können. Die präsentierten Ergebnisse zeigen einmal mehr, dass die zwei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und M. Crohn zwar klinisch ähnliche Symptome aufzeigen, in ihren Ursachen jedoch durch weitreichend unterschiedliche Defizite geprägt sind. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch eine hohe Komplexität aus, was durch diese Arbeit verdeutlicht werden konnte.

In den folgenden Kapiteln werden die Verteilungsmuster von Monozyten und Dendritischen Zellen näher analysiert. Zudem werden die Ergebnisse der qRT-PCR näher diskutiert und in den Kontext des heutigen Wissensstandes eingeordnet. Zuletzt wird versucht, anhand der RNA-Sequenzierung Aufschlüsse über einige Veränderungen der Genexpressionen bei klassischen Monozyten von CED-Patienten zu geben und neue Hypothesen zu generieren.

### 4.1. Analyse des Verteilungsmusters bei Monozyten und Dendritischen Zellen

Der in Courths et al. Arbeit festgestellte Einfluss von Monozyten des Blutes bei MC-Patienten auf die Defensinproduktion führte zu einer näheren Untersuchung des Verteilungsmusters dieser Monozyten bei MC-Patienten in weiteren Vorarbeiten (Courth et al., 2015). CU-Patienten wiesen in vorangegangenen Studien zwar keine eingeschränkte Defensinproduktion auf, zeigten jedoch ähnliche klinische Symptome (Podolsky, 2002). Dies könnte darauf deuten, dass möglicherweise höher geschaltene Regulationsmechanismen ähnliche Defizite haben könnten. Des Weiteren sind Dendritische Zellen durch ihre Antigenpräsentation maßgeblich an der Immunreaktion gegen Pathogene beteiligt. Da die Pathogene im Darmepithel bei CED-Erkrankungen erhöht sind, müssten die Dendritischen Zellen ebenfalls mit Veränderungen auf diesen Umstand reagieren (s. Kapitel 1.4.). In dieser Arbeit sollte deshalb das

Verteilungsmuster von Monozyten und Dendritischen Zellen bei CU-Patienten auf ihre Subtypen hin näher analysiert werden. Zusätzlich wurden weitere MC-Patienten rekrutiert, um direkte Vergleiche zwischen den beiden Erkrankungen ziehen zu können. Die Untersuchung der Verteilungsmuster erfolgte gemäß der Einteilung von Ziegler-Heitbrock mittels FACS durch Zugabe der Antikörper CD14 und CD16 bzw. CD1c, CD11c, CD141 und CD303 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Es ergaben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe Veränderungen sowohl für CU- als auch MC-Patienten. Sowohl für Monozyten als auch für Dendritische Zellen traten im Vergleich zu ähnlichen bereits durchgeführten Studien unterschiedliche Prozentzahlen auf. Dies wurde auf unterschiedliche Methoden bzw. dem Einsatz anderer AK oder „Gates“-Strategien zurückgeführt.

Die Ergebnisse des Verteilungsmusters von Monozyten des Blutes zeigten keine Signifikanzen. Sie ergänzen sich jedoch mit Ergebnissen früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe, sodass eine Erhöhung der Probandenzahl die gewünschten Signifikanzen liefern könnte.

Im Gegensatz zu den Monozyten konnten für Dendritische Zellen signifikante Ergebnisse erreicht werden. Die Ergebnisse können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Beispielsweise könnten RNA-Sequenzierungen von DCs neue Erkenntnisse in Bezug auf genetische Veränderungen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bieten.

#### **4.1.1. Klassische Monozyten bei MC stärker vertreten als bei CU**

Beide Patientengruppen stellten analog zur Kontrollgruppe das stärkste Vorkommen in den klassischen Monozyten dar. Dies zeigte sich bereits bei Studien von Wong et al. und bestätigte damit ihre Ergebnisse (Wong et al., 2012). Für CU-Patienten sowie für MC-Patienten ließen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt klassische Monozyten beobachten. Am höchsten war dies für MC-Patienten zu verzeichnen. Die Erhöhung der klassischen Monozyten für beide Erkrankungen lässt sich nachvollziehen, wenn man ihre Funktion näher in Betracht zieht. Klassische Monozyten haben starke phagozytäre Eigenschaften. Zudem produzieren sie pro-inflammatorische Botenstoffe, wenn

sie auf bakterielle Bestandteile treffen (Gren and Grip, 2016). Bei CED-Erkrankungen ist die Anzahl an pathogenen Keimen im Darmepithel durch die defekte Darmbarriere erhöht. Klassische Monozyten wandern - durch Chemokine gelockt - zum Ort der Entzündung und tragen durch die Produktion der Botenstoffe zu einer pro-inflammatorischen Umgebung bei, welche das Vorgehen gegen Pathogene erleichtert (Schultsz et al., 1999). Es ist nachvollziehbar, dass der Körper bei CED-Erkrankungen ein größeres Aufgebot an Monozyten bereit hält, um gegen die vermehrt auftretenden Mikroorganismen im Epithel vorgehen zu können. Der Unterschied zwischen CU-Patienten und MC-Patienten könnte mit verschiedenen Ursachen zu tun haben. Dabei könnten MC-Patienten zur Zeit der Blutentnahme im Mittel die stärkere Entzündung aufgewiesen haben. Um diese Möglichkeiten einordnen zu können, wäre eine Aufteilung nach Schweregraden der Entzündung hilfreich. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien schienen Thiesen et al. im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger klassische Monozyten bei MC zu finden und nahm an, dass diese vermehrt ins intestinale Epithel migrierten (Thiesen et al., 2014). Da jedoch beide CED-Erkrankungen in der vorliegenden Arbeit erhöhte Populationen für klassischen Monozyten aufwiesen, scheint ein größerer Speicher im Rahmen der Entzündung als wahrscheinlicher.

Studien zeigten zudem, dass sowohl klassische als auch nicht-klassische Monozyten Anteil an der Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündung haben könnten (Ingersoll et al., 2011). Eine Erhöhung dieser Zellpopulationen könnte diese These unterstützen. Weiterhin wäre es denkbar, in zukünftigen Studien darauf zu achten, die Patientengruppen in „akuter Schub“ und „Erkrankung in Remission“ zu unterteilen, um zu schauen, ob dies einen Einfluss auf das Verteilungsmuster der Monozyten des Blutes hätte.

#### **4.1.2. Intermediäre Monozyten bei CU und MC höher exprimiert als bei Kontrolle**

Leichte Erhöhungen konnten des Weiteren für intermediäre Monozyten (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) beobachtet werden. Diese führen wichtige Aufgaben wie Antigenpräsentation und Produktion von Botenstoffen als Teil der Immunreaktion

des Körpers aus (Gren and Grip, 2016). Die Erhöhungen der CD16<sup>+</sup>-Populationen bei MC-Patienten mit aktiver Entzündung konnten bereits bei Hanai et al. und bei Koch et al. festgestellt werden (Hanai et al., 2008; Koch et al., 2010). Hanai et al. verzeichneten auch für CU-Patienten mit aktiver Entzündung eine leichte Erhöhung im Vergleich zu CU-Patienten in Remission. Bei beiden Studien wurde jedoch noch nicht zwischen intermediären und nicht-klassischen Monozyten unterschieden. Erste Unterscheidungen dahingehend erfolgten durch Grip et al. (Grip et al., 2007). Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe unterschieden bei MC-Patienten ebenfalls zwischen den drei Monozytensubtypen und kamen in Bezug auf die intermediären Monozyten auf ähnliche Ergebnisse wie die in der vorliegenden Arbeit. Dabei wurde für intermediäre Monozyten ebenso ein leichter Anstieg beobachtet. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigten nicht-klassischen Monozyten konnten durch die neu gewonnenen Daten dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Um diesbezüglich Klarheit zu gewinnen, wäre eine Erhöhung der Probandenzahl wichtig, um Ausreißer in der Gesamtheit relativieren zu können.

#### **4.1.3. Dendritische Zellen bei CU niedriger exprimiert als bei MC**

Dendritische Zellen kommen in PBMCs bereits in gesunden Menschen sehr gering vor. Sowohl bei CU- als auch bei MC-Patienten konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein Abfall der Zellpopulationen festgestellt werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Baumgart et al. (Baumgart, 2005). Dabei konnten für pDCs und CD141<sup>+</sup> DCs stärkere Reduktionen beobachtet werden als für CD1c<sup>+</sup> DCs. Dieser Unterschied zwischen den DC-Subpopulationen ist, soweit ersichtlich, neu. Es ist auf Grund der niedrigen Werte nicht verwunderlich, dass bisherige Studien über Dendritische Zellen bei CED-Erkrankungen rar sind.

Einige Studien haben sich mit der Aktivität der Dendritischen Zellen bei CED-Erkrankungen im Blut beschäftigt. Sie kommen alle zu dem Ergebnis, dass DCs des Blutes bei CED-Patienten eine hohe funktionelle Kapazität besitzen und Zytokine in erhöhtem Maße ausschütten, bei CU-Patienten teilweise höher als bei MC-Patienten (Hart et al., 2005; Ikeda et al., 2001; Murakami et al., 2002). Es scheint, dass Dendritische Zellen bei Patienten mit einer CED-Erkrankung

geringer, jedoch aktiver sind als DCs bei gesunden Menschen – möglicherweise aus kompensatorischen Gründen. Des Weiteren wurden DCs in der Mucosa des Darms bei beiden Erkrankungen als erhöht beschrieben (Bernardo et al., 2018; Middel, 2006; Murakami et al., 2002). Ebenso zeigte sich ein erniedrigtes Auftreten des CD103<sup>+</sup>-Subtyps (Magnusson et al., 2016).

Grundsätzlich wird angenommen, dass die Verteilung von DCs ins Gewebe unter anderem durch den Rezeptor *TLR-2* reguliert wird (Silva, 2009). An diesen lagern sich Komponenten der Mikrobiota an (Silva, 2009). Neben der Verteilung ins Gewebe wird bei höherem Verbrauch so zudem für Nachschub der DCs gesorgt (Pasquevich et al., 2015). Auch die Bildung von Monozyten wird über *TLRs* reguliert. Dies scheint auf Kosten der Bildung von Dendritischen Zellen zu gehen. So zeigten sich erniedrigte Vorläuferzellen von DCs bei systemischen grampositiven wie gramnegativen Infektionen bei gleichzeitig erhöhten direkten Vorläufern von Monozyten (Pasquevich et al., 2015). Diese Überlegung deckt sich auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Dendritischen Zellen im Blut könnten deshalb erniedrigt sein, weil es einen Mehrbedarf an allen drei Monozytensubtypen gibt. Die Produktion an Dendritischen Zellen im Knochenmark wird vernachlässigt. Punktionen des Knochenmarks könnten dahingehend neue Informationen bringen.

## **4.2. Analyse der Gene des *Wnt*-Signalwegs via qRT-PCR in klassischen Monozyten**

*Wnt* ist ein entscheidender Faktor in der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der spezialisierten Epithelzellen im Darm (van der Flier and Clevers, 2009). Gerade in der Differenzierung von Panethzellen konnte bereits gezeigt werden, dass bei Einschränkungen des *Wnt*-Signalwegs Defizite in der Panethzellendifferenzierung erfolgten. Zudem produzierten die Panethzellen weniger Defensine als die gesunde Vergleichsgruppe.

Monozyten von gesunden Probanden konnten von Courth et al. in MC-Patienten bereits als Aktivator des *Wnt*-Signalwegs in Panethzellen ausgemacht werden (Courth et al., 2015). Vorarbeiten zeigten des Weiteren, dass der *Wnt*-Signalweg

in Monozyten von MC-Patienten – speziell klassischen Monozyten – Veränderungen aufweist.

In dieser Hinsicht sollte untersucht werden, inwiefern CU-Patienten Veränderungen in der Transkription der *Wnt*-Liganden und weiteren Komponenten des *Wnt*-Signalwegs aufweisen.

#### **4.2.1. Bedeutung des *Wnt*-Signalwegs in klassischen Monozyten bei CU-Patienten**

Im direkten Vergleich der Genexpressionen von klassischen Monozyten bei CU- und MC-Patienten zur Kontrolle zeigten sich bei CU-Patienten alle erfassten *Wnt*-Liganden außer *Wnt9B* erhöht. Auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant waren, ergänzen sie doch Studien, die in Kolonbiopsien bei CU-Patienten den *Wnt*-Signalweg induziert sahen (Soletti et al., 2013; You et al., 2008). Dementsprechend besteht die Vermutung, dass Monozyten im Blut einen ähnlich aktivierten *Wnt*-Signalweg haben wie das Kolonepithel. Die Ergebnisse tragen ebenfalls zu der Hypothese dieser Arbeit bei, dass die Einschränkungen, die bisher für die Genexpression von *Wnt*-Liganden bei MC-Patienten gezeigt werden konnten, spezifisch für diese Erkrankung ist und bei CU-Patienten nicht oder vielmehr gegenteilig vorgefunden werden kann.

Neben den *Wnt*-Liganden ließen sich zudem Veränderungen für weitere Gene des *Wnt*-Signalwegs beobachten.

Das Gen *FZD5* zeigte sich erniedrigt. Dies wurde bereits in Kolonbiopsien bei You et al. beobachtet (You et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten für *LRP6* erhöhte Genexpressionen gemessen werden. Da *FZD5* und *LRP6* unmittelbar zusammenarbeiten, um eine *Wnt*-Liganden-Anlagerung zu ermöglichen, könnte diese Erhöhung auch als Kompensation für die niedrigen *FZD5*-Werte zu werten sein.

Des Weiteren konnten niedrige Expressionslevel für *AXIN2* gemessen werden. Als Inhibitor des *Wnt*-Signalwegs im Rahmen einer negativen Feedbackschleife könnten niedrige Messwerte auf Grund fehlender Rückkopplung einen aktivierten

*Wnt*-Signalweg ermöglichen (Jho et al., 2002). *AXIN2* ist streng reguliert, sowohl auf transkriptioneller und translationaler Ebene als auch im Rahmen der Proteinstabilität (Hughes and Brady, 2006). Es wäre natürlich denkbar, dass andere Regulatoren für die Reduktion verantwortlich sein könnten.

Zuletzt zeigten sich erhöhte Messungen für *TCF12* und tendenziell auch für *LEF1*, welche beide als Teil des Transkriptionskomplexes für das Ablesen der *Wnt*-induzierten Gene verantwortlich sind. Dies würde oben formulierte Annahme des aktivierten *Wnt*-Signalwegs weiterhin unterstützen.

Wenn klassische Monozyten nicht nur in Panethzellen (MC-Patienten), sondern auch in Epithelzellen des Kolons einen Einfluss auf den *Wnt*-Signalweg und damit auf die dortige Defensinproduktion hätten, dann könnte ein bei CU-Patienten gezeigter, aktivierter *Wnt*-Signalweg auch eine Kompensationsreaktion auf die dortige reduzierte Mucinschicht bedeuten (Courth et al., 2015).

#### **4.2.2. Bedeutung des *Wnt*-Signalwegs in klassischen Monozyten bei MC-Patienten**

In den untersuchten MC-Patienten wurde in der vorliegenden Arbeit ähnliche (*Wnt3*) bis teils leicht erhöhte Werte (*Wnt2*, *Wnt3A*) beobachtet. *Wnt9B* zeigte erniedrigte Expressionslevel an. Bei Courth et al. fanden sich reduzierte Werte für die beschriebenen *Wnt*-Liganden (Courth et al., 2015). Die Differenzen zu den Ergebnissen von Courth et al. könnten auf unterschiedliche Kohorten zurückzuführen sein. Courth et al. nutzten ileale MC-Proben, während es in der vorliegenden Arbeit keine Unterscheidungen in Bezug auf die Klassifikation gab.

Das Gen *FZD5* stellte sich in seiner Expression leicht erniedrigt dar. Dies kann mit dazu beitragen, dass die Kaskade des *Wnt*-Signalwegs nur in reduzierter Form durchlaufen werden kann. Folglich würden – wie bei M. Crohn bereits gemessen – weniger Defensine in den Panethzellen produziert. Erniedrigte *FZD5*-Expressionen ließen sich bereits bei früheren Untersuchungen von MC-Patienten beobachten (Courth et al., 2015).

Das Gen *EVI/WLS* zeigte bei MC-Patienten im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Expressionslevel. Dies ergänzt sich mit den Ergebnissen für MC-Patienten aus Vorarbeiten. Courth et al. hatten im Vergleich dazu geringere Genexpressionen als die Kontrolle (Courth et al., 2015). *EVI* wird aus Vesikeln ausgeschüttet und sorgt für einen Transport von *Wnt* in der *Wnt*-produzierenden als auch der *Wnt*-empfangenden Zelle (Korkut et al., 2009).

Des Weiteren ließen sich leicht erniedrigte Werte für die Expressionen von *Axin2* feststellen. *AXIN2* bindet  $\beta$ -*Catenin* bei Abwesenheit von *Wnt*. Niedrige Level von *AXIN2* tragen vermutlich zu einer weniger stark ausgeprägten Bildung des *destruction complex* bei.  $\beta$ -*Catenin* hätte folglich größere Chancen, zu akkumulieren. Zudem wirkt *AXIN2* negativ auf den *Wnt*-Signalweg (Jho et al., 2002). Eine niedrige Expression führt vermutlich zu einem aktiveren Signalweg. Die geringere Expression von *AXIN2* zeichnete sich auch in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ab.

Zuletzt wurden erhöhte Expressionslevel für *TCF12* gemessen, welche sich genauso hoch darstellen ließen wie bei CU-Patienten. Erhöhte Level an Transkriptionsfaktoren sind an erhöhten Transkriptionen von Zielgenen beteiligt.

Die zuletzt aufgeführten Komponenten des *Wnt*-Signalwegs (*EVI/WLS*, *AXIN2* und *TCF12*) zeichneten sich durch Genexpressionen aus, die eher zu einem aktiveren als einem eingeschränkten *Wnt*-Signalweg beitragen. Es ist möglich, dass bei MC-Patienten – vermutlich eher bei Patienten mit ilealer Beteiligung – letzten Endes einzig die *Wnt*-Liganden niedrigere Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollprobanden aufweisen (Courth et al., 2015). Die weiteren Komponenten des Signalwegs zeigten in der vorliegenden Arbeit teils erhöhte Expressionen, eine Kompensation wäre denkbar.

### 4.3. Einfluss der klassischen Monozyten bei Patienten mit CED – Generierung weiterer Hypothesen

#### 4.3.1. Bekannte Gene des *Wnt*-Signalwegs nicht erfasst oder unverändert

In der RNA-Sequenzierung wurden die *Wnt*-Gene und weitere Gene des *Wnt*-Signalwegs im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht exprimiert gemessen oder in der Analyse nicht erfasst. Dies traf für beide Patientengruppen zu. Damit konnte die Hypothese, dass der *Wnt*-Signalweg in Monozyten bei CU-Patienten nicht beeinträchtigt ist und diesbezüglich keinen veränderten Einfluss auf die Produktion der Defensine ausübt, im Rahmen der RNA-Sequenzierung auf den ersten Blick nicht angewandt werden. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die verschiedenen Methoden zur Nutzung der mRNA sein. In der qRT-PCR werden die Gene aus ihrer Zellrealität herausgenommen und vervielfältigt. Da jedes Gen gleich viele PCR-Zyklen durchläuft, bleibt die Relation untereinander erhalten und die einzelnen Konzentrationen sind messbar. Wieder eingeordnet in die Summe aller messbaren Gene, wie dies bei der RNA-Sequenzierung der Fall ist, können die Werte – beispielsweise für die *Wnt*-Gene – jedoch verschwindend gering sein und somit nicht erfassbar. Dies scheint in der vorliegenden Arbeit der Fall zu sein. Die in Kapitel 3.2. gemessenen Expressionen des *Wnt*-Signalwegs konnten mit Hilfe der RNA-Sequenzierung nicht reproduziert werden. Die RNA-Sequenzierung wurde zudem mit einer geringen Menge von 5 ng durchgeführt. Dadurch ist es möglich, dass nicht alle Gene erfasst wurden; vor allem, wenn ihre Expression in der Zelle gering ist. Dies erschwert Aussagen über die Genexpressionen der Komponenten des *Wnt*-Signalwegs, die durch die RNA-Sequenzierungsmethode nicht erfasst wurden. Zudem können keine direkten Vergleiche zu den Ergebnissen durch die qualitativen qRT-PCR gezogen werden.

Neben den Komponenten des *Wnt*-Signalwegs, die in der qualitativen qRT-PCR verändert, in der RNA-Sequenzierung jedoch unverändert exprimiert oder nicht erfasst wurden, wurden weitere, eindeutig veränderte Gene beobachtet, die ebenfalls dem *Wnt*-Signalweg zugeordnet werden konnten. Eine direkte

Bestätigung der Hypothese durch Verwendung der gleichen Gene ist nicht möglich, jedoch lassen sich durch die verwendeten Gene ebenso Aussagen über den Einfluss des *Wnt*-Signalwegs in Monozyten bei CED gewinnen.

#### 4.3.2. Aktivierter *Wnt*-Signalweg in CU-Patienten?

Die Hypothese dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass der *Wnt*-Signalweg bei CU-Patienten nicht in der Form eingeschränkt vorzufinden ist wie dies bei MC-Patienten bereits beschrieben wurde (Wehkamp et al., 2007). In Untersuchungen mittels PCR konnten dafür schon erste Hinweise gesammelt werden (s. Kapitel 4.2.1.). In der RNA-Sequenzierung fanden sich weitere Gene, die diese Hypothese unterstützen. Sie stärken zudem den Ansatz eines aktiveren *Wnt*-Signalweg in CU-Patienten, vermutlich im Rahmen einer Kompensation auf niedrige Mucinproduktionen.

*LRP8* als positiver Regulator des *Wnt*-Signalwegs zeigte sich in dieser Arbeit erhöht (Zhang et al., 2012). Das Gen ist ebenso wie *LRP5/6* Teil der *LDLR*-Familie (Kim et al., 1996), interagiert mit *Wnt*-Genen jedoch über andere Domänen (Zhang et al., 2012). Zhang et al. zeigten für Vorläuferzellen von Osteoblasten, dass *LRP8* bei *Wnt3A*-Anlagerung durch eine Interaktion mit *Axin* zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -*Catenin* führt und dadurch zur Differenzierung der Osteoblasten beiträgt (Zhang et al., 2012). Es ist gut möglich, dass *LRP8* den *Wnt*-Signalweg in Monozyten bei CED-Erkrankungen auf ähnliche Weise fördert.

Neben *LRP8* als direkte Komponente des *Wnt*-Signalwegs zeigten auch direkte Zielgene des Signalwegs wie *IFIT2* veränderte Expressionen. Ohsugi et al. zeigten 2017 beispielsweise, dass *IFIT2* durch den *Wnt*-Signalweg herunterreguliert werden kann (Ohsugi et al., 2017). Dabei wurden bestimmte Reporter-Regionen von *IFIT2* supprimiert. Zudem waren *IFIT2* und *IFIT3* bei Ausschaltung von  $\beta$ -*Catenin* erhöht (Ohsugi et al., 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten erniedrigte Expressionen für *IFIT2* und *IFIT3*. Dies unterstützt die Überlegung, dass der *Wnt*-Signalweg in CU-Patienten stärker aktiv und die Expression von *IFIT2* und *IFIT3* dadurch reduziert ist.

Auch *Versican* zeigte sich in bereits durchgeführten Studien als Zielgen des *Wnt*-Signalwegs. Rahmani et al. akkumulierten  $\beta$ -*Catenin* durch Inhibition von dessen Abbauenzyme und sahen eine vermehrte Transkriptionsaktivität von *Versican*. Zudem fanden sie direkte Bindungsstellen für *TCF4* in der Promoterregion des Gens (Rahmani et al., 2005).

Als weiteres Zielgen ließen sich erhöhte Messwerte für das Gen *Adenomatosis polyposis coli downregulated 1 (APCDD1)* beobachten. Positive Korrelationen mit der Transkriptionsaktivität des  $\beta$ -*Catenin/TCF4*-Komplexes und Anlagerungsmöglichkeiten für diesen lassen *APCDD1* als direktes Zielgen des *Wnt*-Signalwegs charakterisieren (Takahashi et al., 2002). Auf der anderen Seite interagiert *APCDD1* an der Zelloberfläche auch mit *Wnt3A* und *LRP5* und inhibiert den *Wnt*-Signalweg in Bezug auf die Entwicklung und Differenzierung von Neuronen (Shimomura et al., 2010). Es ist möglich, dass hier unterschiedliche Faktoren Einfluss auf das Gen *APCDD1* ausüben, die zellspezifisch sind und entweder die induzierenden oder inhibierenden Fähigkeiten des Gens fördern. Zudem wirkt *APCDD1* vermutlich in Form eines negativen Feedbacks (Shimomura et al., 2010).

#### **4.3.3. Eingeschränkter Wnt-Signalweg bei MC-Patienten trotz aktiven Wnt-Signalweg-Komponenten?**

Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zeigten ähnlich den PCR-Ergebnissen dieser Arbeit Messwerte, die auf den ersten Blick nicht unbedingt zu bereits durchgeführten Studien passten. Bisher wurde davon ausgegangen, dass der *Wnt*-Signalweg in MC-Patienten durch Einschränkungen im *TCF*- oder *LRP6*-Gen vermutlich nicht in vollem Maße funktionsfähig ist (Beisner et al., 2014; Koslowski et al., 2012; Wehkamp et al., 2007). Dabei wurde jeweils Epithel des Dünn- bzw. Dickdarms untersucht, bei Kohorten mit iliealem und ileocolonalem M. Crohn. Zudem zeigten Courth et al. erniedrigte *Wnt*-Liganden in Monozyten von Patienten mit ilealem M. Crohn (Courth et al., 2015).

In der RNA-Sequenzierung dieser Arbeit fielen in klassischen Monozyten bei MC-Patienten einige Gene auf, die in ihrer Expression einem eher aktivierten

als eingeschränkten *Wnt*-Signalweg entsprachen. Dazu gehörten die Gene *JADE-1*, *CTBP2*, *PPP2R5A* und *RAP2A*, die in ihrer physiologischen Konzentration den *Wnt*-Signalweg inhibierend regulieren (Chitalia et al., 2008; Hamada and Bienz, 2004; Park et al., 2013; Wang et al., 2018; Zhuang et al., 2017). Die genannten Gene zeigten in dieser Arbeit in Monozyten bei MC-Patienten erniedrigte Expressionen. Diese Reduktion der *Wnt*-Signalweg-Inhibitoren könnte zu einer Aktivierung des *Wnt*-Signalwegs beitragen.

Zudem zeigten sich erhöhte Messwerte für *C1QA*, eine Komponente des Serum-Komplement-Systems (Sina et al., 2018). Für *C1QA* konnte bereits gezeigt werden, dass es den *Wnt*-Signalweg durch Anlagerung an *FZD*-Rezeptoren – unabhängig von weiteren *Wnt*-Liganden – aktivieren kann (Naito et al., 2012).

Die mittels RNA-Sequenzierung gemessenen Werte für die Komponenten des *Wnt*-Signalwegs bei MC-Patienten unterstützen die PCR-Ergebnisse dieser Arbeit. Es zeigten sich auch hier Gene, die zu einem aktiveren *Wnt*-Signalweg beitragen.

Wenn insgesamt davon ausgegangen wird, dass die Hypothese des eingeschränkten *Wnt*-Signalwegs bei MC-Patienten weiterhin stimmen mag, ist es möglich, dass eine unterschiedliche Gewichtung der Komponenten des *Wnt*-Signalwegs für diese Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich ist. Demnach haben vermutlich Einschränkungen von *TCF*- oder *LRP6*-Genen als direkte Partizipatoren grundsätzlich einen stärkeren Einfluss auf einen funktionierenden *Wnt*-Signalweg als obengenannte Negativ-Regulatoren. Eine weitere Ursache könnte zudem eine zu schwache Kompensationseffizienz sein. Die niedrigen Expressionen der Negativ-Regulatoren wären hier ein Mittel des Immunsystems, die Einschränkungen der direkten Partizipatoren aufzufangen und abzumildern. Der Versuch wäre jedoch nicht ausreichend, um einen reduzierten *Wnt*-Signalweg zu kompensieren. Letzten Endes würden beide Möglichkeiten weiterhin zu einem reduzierten *Wnt*-Signalweg führen.

#### 4.3.4. Ist *IRF-1* in CED-Patienten für TH1/TH2-Unterschied mitverantwortlich?

Patienten, die an M. Crohn erkrankt sind, reagieren bei Entzündungen mit einer TH1-Zell-Immunantwort, während CU-Patienten vor allem TH2-Zellen ausbilden (Bouma and Strober, 2003; Heller et al., 2002; Sartor, 2006; Shih et al., 2008). Die Analyse der Gene ergab eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied in CED-Patienten. Das in der RNA-Sequenzierung entdeckte Gen *IRF-1* wirkt während Entzündungen positiv regulierend auf das Zytokin *IFN* und führt dabei unter anderem zur Prägung von TH1-Zell-Reaktionen (Huber and Farrar, 2011; Liu et al., 2003; Lohoff et al., 1997; Ohteki et al., 1998). *IL-4*-Expressionen als wichtige Vertreter der TH2-Reaktionen werden durch *IRF-1* indirekt unterdrückt (Elser et al., 2002). Das Fehlen von *IRF-1* führt im Gegensatz dazu zu einer fehlenden Ausbildung von TH1-Zellen, jedoch einem physiologischen Vorkommen von TH2-Zellen (Taki et al., 1997). Dies stimmt mit der Situation bei CU-Patienten überein. Viele Studien beobachteten bei CU-Patienten eine vermehrte TH2-Antwort (Bouma and Strober, 2003; Heller et al., 2002). In der RNA-Sequenzierung dieser Arbeit wurde dazu passend bei dieser Patientengruppe eine erniedrigte Expression von *IRF-1* gefunden. MC-Patienten zeigten in der vorliegenden Arbeit eine unveränderte *IRF-1*-Expression, die vermutlich reicht, um die Ausbildung von TH2-Zellen zu unterdrücken. Dementsprechend zeigte sich – wie schon in Studien beschrieben – vor allem eine TH1-Antwort (Sakuraba et al., 2009; Sartor, 2006; Shih et al., 2008).

*IRF-1* wird in dieser Arbeit von klassischen Monozyten exprimiert. Studien zeigten bereits, dass während einer Entzündung neben Makrophagen und DCs auch Monozyten des Blutes zum Lymphknoten und damit zum Ort der T-Zell-Prägung migrierten (Geissmann et al., 2008; Palframan et al., 2001). Der genaue Einfluss von Monozyten auf die Differenzierung von TH-Zellen ist jedoch – soweit ersichtlich – noch nicht näher untersucht worden. Die unterschiedlichen Expressionen des Gens bei CU- und MC-Patienten und ihre Konsequenzen lassen vermuten, dass das Gen *IRF-1* speziell in Monozyten

entscheidend mit an der Differenzierung der T-Zellen beteiligt ist. Das Gen wäre ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Therapien.

#### **4.3.5. Monozyten des Blutes könnten zur Entstehung von CAC beitragen**

Die Analyse der Gene zeigte zuletzt, dass unter ihnen auch Gene zu finden waren, die in Studien bereits im Rahmen des Themas „Kolon-Karzinogenese“ näher untersucht wurden. Zu ihnen zählten die Gene *IFIT2*, *IFIT3*, *S100P*, *S100A11* und *APCDD1*. Dabei wurden in dieser Arbeit erniedrigte Werte von *IFIT2* und *IFIT3* in Monozyten bei CU-Patienten festgestellt, erhöhte Werte von *S100P* und *S100A11* bei MC-Patienten und ebenfalls erhöhte Expressionen für *APCDD1* bei beiden Erkrankungen, wobei die Werte nur für CU-Patienten signifikant waren. Diese neuen Erkenntnisse, die aus der RNA-Sequenzierung für klassische Monozyten in CED-Erkrankungen hervorgingen, decken sich mit Veränderungen von Messwerten derselben exprimierten Gene in Kolon-CA-Biopsien (Fuentes et al., 2007; Ohsugi et al., 2017; Takahashi et al., 2002).

*IFIT2* und *IFIT3* sind Teil des *Interferon*-Signalwegs. *IFIT2* ist neben seiner antiviralen Funktion wichtig für die Regulation der Zellproliferation und wirkt sowohl Apoptose-induzierend als auch Tumor-supprimierend (Critchley-Thorne et al., 2009; Stawowczyk et al., 2011; Zhou et al., 2013). *IFIT3* sorgt in Monozyten durch Verstärkung von Inhibitoren für einen reduzierten Zellzyklus und damit ebenfalls für eine reduzierte Zellproliferation (Xiao et al., 2006). Eine Inhibition des *Interferon*-Signalwegs verhindert die Apoptose von Zellen bzw. fördert die Zellproliferation (Jia et al., 2017). Die bei CU-Patienten dieser Arbeit erniedrigt gemessenen Werte von *IFIT2* und *IFIT3* konnten durch Ohsugi et al. auch in Kolon-CA-Zellen nachgewiesen werden. Die niedrigen Expressionen führten zu anti-apoptotischen Eigenschaften (Ohsugi et al., 2017). Von außen zugeführtes *IFIT2* konnte diese Eigenschaften rückgängig machen (Ohsugi et al., 2017).

Die Wirkung von externem *IFIT2* auf Kolon-CA-Epithelzellen konnte auch für die Proteine der *S100*-Familie beobachtet werden. Diese Proteine führen durch

Anlagerung an den *receptor for advanced glycation end-products (RAGE)* und indirekter Aktivierung von *NF- $\kappa$ B* zu Zellproliferation und -migration (Arumugam et al., 2004; Turovskaya et al., 2008). Neben erhöht gemessenen Expressionen von *S100P* und *S100A11* in Kolon-CA-Biopsien (SW480-Zellen) konnten diese Proben auch durch Aktivierung von *RAGE* mittels exogenem *S100P* zu weiterer Proliferation und Migration angeregt werden (Cross et al., 2005; Fuentes et al., 2007; Melle et al., 2006). Im Gegensatz dazu führte eine Blockade des *RAGE*-Signalwegs im CAC-Mausmodell zu einer Reduktion der chronischen Entzündung und zu einer geringeren Tumorgenese. *RAGE*<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten zudem gar kein CAC (Turovskaya et al., 2008).

Neben den Genen des *IFN*-Signalwegs und den Proteinen der *S100*-Familie zeigte auch *APCDD1* durch erhöhte Genexpression ein ähnliches Bild, im Sinne der Förderung von Zellproliferation. Takahashi et al. zufolge fördert *APCDD1* das Wachstum von Krebszellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Takahashi et al., 2002). Es wird zudem diskutiert, ob das Gen in Kolon-CA-Zellen durch autokrine Selbststimulation oder durch exogene Sekretionen zu den Zellen gelangt, da *APCDD1* sowohl kodierende Abschnitte zu Signalpeptiden als auch zu Transmembransegmenten aufwies (Takahashi et al., 2002).

Insgesamt führten alle aufgeführten Gene in ihrer veränderten Expression in Kolon-CA-Zellen zu einer Stimulation der Zellproliferation. Da die Gene in dieser Arbeit bei CED-Patienten, teils bei CU-, teils bei MC-Patienten, in gleichen Maßen veränderte Expressionen zeigten, könnten sie mit dazu beitragen, dass das Risiko für eine erhöhte Zellproliferation und die Entwicklung eines CAC in CED-Patienten erhöht ist. Zudem zeigten alle Gene Anzeichen dafür, dass sie auch bei exogener Gabe regulierend auf die Kolon-CA-Zellen wirken konnten. In dieser Arbeit wurden die veränderten Gene in klassischen Monozyten des Blutes beobachtet. Sie könnten eine Quelle für die exogene Produktion der Gene darstellen und so Einfluss auf das Kolon-Epithel ausüben bzw. es regulieren. Welche Faktoren für die Sekretion der Gene in Monozyten ausschlaggebend sind und ob sie in einem direkten Zusammenhang zur

Konzentration in der Kolon-CA-Zelle stehen, könnte ein Schwerpunkt für weitere Untersuchungen sein.

#### 4.4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Arbeit trägt zu der von vielen Studien bereits unterstützten Annahme, dass M. Crohn und Colitis ulcerosa unterschiedlichen Krankheitsmechanismen zugrunde liegen, bei. Schwerpunkte waren die Charakterisierung von Immunzellen des Blutes bei Colitis ulcerosa als auch der Vergleich zu den Ergebnissen bei M. Crohn. Die Analyse von Monozyten und Dendritischen Zellen zu Beginn zeigte dabei quantitative Unterschiede. Klassische Monozyten fielen bei beiden Erkrankungen höher aus als die Kontrollgruppe, jedoch unterschiedlich stark in ihrer Ausprägung. Auch die intermediären Monozyten zeigten bei beiden Patientengruppen stärkere Expressionen als ihre Kontrollgruppe. Beide Zellgruppen unterstützten mit ihrem erhöhten Vorkommen ihre wichtige Rolle in der Immunantwort bei CED-Patienten. Dendritische Zellen kamen bei beiden Patientengruppen, bei CU-Patienten noch weniger als bei MC-Patienten in geringerer Häufigkeit vor als in ihrer Kontrollgruppe. Mit diesen Daten wird der Ansatz gestärkt, dass bei gleichen Vorläuferzellen Dendritische Zellen auf Grund eines Mehrbedarfs an Monozyten nachteilig differenziert werden.

Mittels qRT-PCR kristallisierte sich bei CU-Patienten ein aktivierter *Wnt*-Signalweg heraus. Sowohl *Wnt*-Liganden als auch Teile des *Wnt*-Signalwegs zeigten erhöhte Genexpressionen. Bei MC-Patienten war dies nicht ganz so eindeutig. Die klare Bestätigung vorangegangener Hypothesen blieb aus. Die Expressionen der *Wnt*-Liganden waren variabel verändert, der restliche *Wnt*-Signalweg zeigte eher aktive Komponenten. Die RNA-Sequenzierung ermöglichte die Generierung von weiteren Hypothesen. Dabei konnte bei CU-Patienten die Annahme des aktivierten *Wnt*-Signalwegs aus qRT-PCR-Untersuchungen gestützt werden. Damit bestätigt sich die Hypothese dieser Arbeit: der *Wnt*-Signalweg in klassischen Monozyten bei CU-Patienten zeigt höchstwahrscheinlich keine Einschränkungen. Ein Nachweis der Spezifität dieser

Einschränkungen für MC-Patienten konnte diese Arbeit jedoch nicht bieten. Für MC-Patienten ergab die RNA-Sequenzierung neue Ansätze. Es fanden sich einige Modifikatoren des *Wnt*-Signalwegs, welche in ihrer veränderten Expression ebenfalls zu einem aktiven *Wnt*-Signalweg beitragen. Die RNA-Sequenzierung zeigte mit der veränderten Expression von *IRF-1* bei CU-Patienten des Weiteren eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Differenzierung von T-Helferzellen in CED-Erkrankungen. Zuletzt fanden sich in den klassischen Monozyten, teils bei CU-Patienten, teils bei MC-Patienten, veränderte Expressionen von Genen, die in ähnlicher Expression bereits in kolorektalen Krebszellen gemessen wurden (*IFIT2*, *IFIT3*, *S100P*, *S100A11*, *APCDD1*). Dass diese Gene, die bisher mit Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht wurden, in klassischen Monozyten bei CED-Patienten exprimiert wurden, zeigt diese Arbeit – soweit ersichtlich – zum ersten Mal. Studien konnten bereits nachweisen, dass externe Expressionen dieser Gene ähnliche, zellproliferative Wirkungen auf das Kolonepithel erzielen wie endogene Produktionen. Mit den klassischen Monozyten präsentiert diese Arbeit erstmals eine mögliche Quelle für die externe Expression dieser Gene. Die Mukosaumgebung von Tumorzellen scheint zudem wichtig für die Entstehung und Erhaltung eines Tumors (Sanz-Pamplona et al., 2014). Eine nähere Betrachtung der Beteiligung von klassischen Monozyten an dieser Umgebung scheint mit den Erkenntnissen dieser Arbeit von nicht unbeachtlichem Interesse.

Die Ergebnisse, die mittels FACS-Analyse, qRT-PCR und RNA-Sequenzierung neu herausgearbeitet werden konnten, sind im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen – soweit ersichtlich – in dieser Arbeit erstmals aufgeführt. Die neuen Erkenntnisse bereichern die Wissenschaft und tragen dazu bei, die Komplexität der CED-Erkrankungen besser zu verstehen und mögliche, neue Therapieansätze weiter zu verfolgen.

## 5 Zusammenfassung

Colitis ulcerosa und M. Crohn als Hauptvertreter der CED-Erkrankungen zeigen auf molekularer Ebene deutliche Unterschiede. Niedrige Mucinproduktionen in Becherzellen bei CU-Patienten stehen niedrigen Defensin-Produktionen in Panethzellen bei MC-Patienten gegenüber, wobei beide Barrierestörungen zu einem erhöhten Vorkommen an Bakterien im Darmepithel führen. Courth et al. stellten fest, dass der Wnt-Signalweg in Monozyten des Blutes bei Patienten mit M. Crohn Einschränkungen aufweist und die Panethzellen vermutlich dadurch weniger Defensine produzieren (Courth et al., 2015). Es stellt sich die Frage, inwiefern die Einschränkungen auch bei Colitis ulcerosa auftreten oder ob sich diese nur spezifisch für die Erkrankung M. Crohn darstellen. Dazu wurden Monozyten des Blutes bei Colitis ulcerosa charakterisiert und diese mit Ergebnissen für M. Crohn verglichen. In einem ersten Schritt wurden Monozyten und Dendritische Zellen des Blutes beider Patientengruppen auf ihr Verteilungsmuster hin untersucht, gefolgt von einer molekularen Analyse der Komponenten des *Wnt*-Signals via qRT-PCR, fokussiert auf klassische Monozyten. Es fiel auf, dass die drei Monozyten-Subpopulationen bei beiden CED-Erkrankungen erhöht vorkamen. Bei MC-Patienten zeigte sich diese Abweichung noch stärker als bei CU-Patienten. Im Gegensatz dazu waren alle Subpopulationen der Dendritischen Zellen erniedrigt, dieses Mal vor allem bei CU-Patienten. Da beide aus derselben Vorläuferzelle stammen, wird eine Differenzierung zugunsten der Monozyten vermutet. Die molekulare Analyse ergab Tendenzen, die bei CU-Patienten für einen aktiveren *Wnt*-Signalweg sprachen. Damit konnten Teile der Hypothese gestärkt werden. Die Analyse bei MC-Patienten zeigte nicht eindeutige Ergebnisse, sodass die hier erhobenen Daten die ursprüngliche Hypothese nicht vollständig unterstützen konnten. Im Anschluss erfolgte eine RNA-Sequenzierung der klassischen Monozyten des Blutes. Dadurch konnten neue Hypothesen in Bezug auf die Themen „*Wnt*-Signalweg“, „Entzündung“ und „Kolon-Karzinogenese“ aufgestellt werden. CU-Patienten zeigten hier erneut einen aktiven *Wnt*-Signalweg. Für die gemessenen *Wnt*-Komponenten bei MC-Patienten ließen sich ebenfalls tendenziell erhöhte

Expressionen messen. Die RNA-Sequenzierung wies zudem mit dem in seiner Expression veränderten Gen IRF-1 eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Ausbildung von TH-Zellen bei CED-Erkrankungen. Zuletzt ließen sich sowohl bei Colitis ulcerosa als auch bei M: Crohn in den klassischen Monozyten veränderte Gene finden (*APCDD1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *S100P*, *S100A11*), die in ihrer Expression zu einer erhöhten Zellproliferation des Kolonepithels beitragen. Die klassischen Monozyten könnten zudem eine Quelle für die in einigen Studien diskutierte, mögliche Sekretion von Produkten dieser Gene an das Kolonepithel sein. Zusammengenommen kann diese Arbeit Teile der anfangs genannten Hypothese stärken; der Wnt-Signalweg in klassischen Monozyten bei CU-Patienten scheint aktiv und dementsprechend nicht eingeschränkt. Dies ermöglicht, die Erkrankungen in ihrer Gesamtheit besser zu verstehen und langfristig, neue Therapien zu entwickeln.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., Romagnolo, B., 2008. A genetic study of the role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev. Biol.* 324, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.027>
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2014. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 1165–1179. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1165>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01204>
- Arumugam, T., Simeone, D.M., Schmidt, A.M., Logsdon, C.D., 2004. S100P Stimulates Cell Proliferation and Survival via Receptor for Activated Glycation End Products (RAGE). *J. Biol. Chem.* 279, 5059–5065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310124200>
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G922-929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>
- Aust, D.E., Terdiman, J.P., Willenbacher, R.F., Chang, C.G., Molinaro-Clark, A., Baretton, G.B., Loehrs, U., Waldman, F.M., 2002. The APC/ $\beta$ -catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 94, 1421–1427.
- 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>
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., Mowat, A.Mcl., 2014. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in adult intestine. *Nat. Immunol.* 15, 929–937. <https://doi.org/10.1038/ni.2967>
- Barker, N., 2008. The Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling Pathway, in: Vincan, E. (Ed.), *Wnt Signaling: Pathway Methods and Mammalian Models*, Methods in Molecular Biology™. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 5–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-249-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-249-6_1)
- Barker, N., van Es, J., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P., Clevers, H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1010. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Baumgart, D.C., 2005. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 54, 228–236. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.040360>
- Baumgart, D.C., Metzke, D., Guckelberger, O., Pascher, A., Grötzinger, C., Przesdzing, I., Dörffel, Y., Schmitz, J., Thomas, S., 2011. Aberrant

- plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 166, 46–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04439.x>
- 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–G498. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00347.2013>
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L., 2002. The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *J. Immunol.* 168, 3536–3542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3536>
- Bernardo, D., Chaparro, M., Gisbert, J.P., 2018. Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 62, 1700931. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700931>
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliever, E., Wajda, A., 2001. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Cancer* 91, 854–862. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010215\)91:4<854::AID-CNCR1073>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010215)91:4<854::AID-CNCR1073>3.0.CO;2-Z)
- Bevins, C.L., 2004. The Paneth cell and the innate immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20, 572–580.
- Bevins, C.L., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut* 58, 882–883.
- Bezirtzoglou, E., 1997. The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe* 3, 173–177. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0102>
- Bollrath, J., Pheese, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, Ö., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R.M., Kirchner, T., Arkan, M.C., Ernst, M., Greten, F.R., 2009. gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cancer Cell* 15, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.002>
- Bouma, G., Strober, W., 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 521–533. <https://doi.org/10.1038/nri1132>
- Brembeck, F.H., Rosário, M., Birchmeier, W., 2006. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev., Oncogenes and cell proliferation* 16, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.12.007>
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Bry, L., Falk, P., Huttner, K., Ouellette, A., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 1994. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10335–10339.

- Canavan, C., Abrams, K.R., Mayberry, J., 2006. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 1097–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x>
- Cantaert, T., Baeten, D., Tak, P.P., van Baarsen, L.G., 2010. Type I IFN and TNF $\alpha$  cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. *Arthritis Res. Ther.* 12, 219. <https://doi.org/10.1186/ar3150>
- Cario, E., 2010. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1583–1597. <https://doi.org/10.1002/ibd.21282>
- Cebula, A., Seweryn, M., Rempala, G.A., Pabla, S.S., McIndoe, R.A., Denning, T.L., Bry, L., Kraj, P., Kisielow, P., Ignatowicz, L., 2013. Thymus-derived regulatory T cells control tolerance to commensal microbiota. *Nature* 497, 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature12079>
- Cederlund, A., Gudmundsson, G., Agerberth, B., 2011. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 278, 3942–3993. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08302.x>
- Cheng, H., Leblond, C.P., 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* 141, 537–561. <https://doi.org/10.1002/aja.1001410407>
- Chitalia, V.C., Foy, R.L., Bachschmid, M.M., Zeng, L., Panchenko, M.V., Zhou, M.I., Bharti, A., Seldin, D.C., Lecker, S.H., Dominguez, I., Cohen, H.T., 2008. Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating  $\beta$ -catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nat. Cell Biol.* 10, 1208–1216. <https://doi.org/10.1038/ncb1781>
- Choi, S., Chung, H., Hong, H., Kim, S.Y., Kim, S.-E., Seoh, J.-Y., Moon, C.M., Yang, E.G., Oh, E.-S., 2017. Inflammatory hypoxia induces syndecan-2 expression through IL-1 $\beta$ -mediated FOXO3a activation in colonic epithelia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31, 1516–1530. <https://doi.org/10.1096/fj.201601098R>
- 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>
- Conrady, C.D., Zheng, M., Mandal, N.A., van Rooijen, N., Carr, D.J.J., 2013. IFN- $\alpha$ -driven CCL2 production recruits inflammatory monocytes to infection site in mice. *Mucosal Immunol.* 6, 45–55. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.46>
- Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Calatayud, S., Hernández, C., Alvarez, A., Hinojosa, J., Esplugues, J.V., Barrachina, M.D., 2013. M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative

- colitis. *PloS One* 8, e78128.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078128>
- 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>
- Critchley-Thorne, R.J., Simons, D.L., Yan, N., Miyahira, A.K., Dirbas, F.M., Johnson, D.L., Swetter, S.M., Carlson, R.W., Fisher, G.A., Koong, A., Holmes, S., Lee, P.P., 2009. Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9010–9015.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901329106>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- Cross, S.S., Hamdy, F.C., Deloulme, J.C., Rehman, I., 2005. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 46, 256–269.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02097.x>
- De Groote, D., Zangerle, P.-F., Gevaert, Y., Fassotte, M.-F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239–248.
- DeGray, G., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., Daniell, H., 2001. Expression of an Antimicrobial Peptide via the Chloroplast Genome to Control Phytopathogenic Bacteria and Fungi. *PLANT Physiol.* 127, 852–862. <https://doi.org/10.1104/pp.010233>
- Deloose, E., Janssen, P., Depoortere, I., Tack, J., 2012. The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 271–285.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.57>
- 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>
- 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.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., Schmitz, J., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* 165, 6037–6046. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6037>
- 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.

- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Li-Weber, M., 2002. IFN- $\gamma$  Represses IL-4 Expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17, 703–712. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00471-5)
- Es, J.H. van, Gijn, M.E. van, Riccio, O., Born, M. van den, Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., Clevers, H., 2005. Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959. <https://doi.org/10.1038/nature03659>
- Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Forner, O., Marin-Garcia, P., Arnau, V., D'Eustachio, P., Stein, L., Hermjakob, H., 2017. Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1559-2>
- 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>
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., Huelsken, J., 2007. Wnt/ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559. <https://doi.org/10.1128/MCB.01034-07>
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., Nuñez, G., 2009. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 227, 106–128. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>
- Freeman, H.J., 2008. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 1810–1811. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.1810>
- Fuentes, M.K., Nigavekar, S.S., Arumugam, T., Logsdon, C.D., Schmidt, A.M., Park, J.C., Huang, E.H., 2007. RAGE Activation by S100P in Colon Cancer Stimulates Growth, Migration, and Cell Signaling Pathways. *Dis. Colon Rectum* 50, 1230–1240. <https://doi.org/10.1007/s10350-006-0850-5>
- Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E.L., Taniguchi, T., 1989. Induction of endogenous IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* 337, 270. <https://doi.org/10.1038/337270a0>
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Garabedian, E.M., Roberts, L.J.J., McNevin, M.S., Gordon, J.I., 1997. Examining the Role of Paneth Cells in the Small Intestine by Lineage Ablation in Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 272, 23729–23740. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23729>
- Geissmann, F., Auffray, C., Palframan, R., Wirrig, C., Ciocca, A., Campisi, L., Narni-Mancinelli, E., Lauvau, G., 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.* 86, 398–408. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.19>

- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327, 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Germano, G., Allavena, P., Mantovani, A., 2008. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine* 43, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.014>
- Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2009. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* 77, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2008.09.008>
- Gersemann, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2011. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol. WJG* 17, 3198–3203. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i27.3198>
- Giles, E.M., Stagg, A.J., 2017. Type 1 Interferon in the Human Intestine-A Coordinator of the Immune Response to the Microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* 23, 524–533. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001078>
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Gren, S.T., Grip, O., 2016. Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1992–1998. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000824>
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., Karin, M., 2004. IKK $\beta$  Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* 118, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.013>
- Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S., Henriksson, G., 2007. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 566–572. <https://doi.org/10.1002/ibd.20025>
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., Karin, M., 2009. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* 15, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>
- Grivennikov, S.I., 2013. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 35, 229–244. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0352-6>
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Gum, J.R., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Siddiki, B., Kim, Y.S., 1994. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 269, 2440–2446.
- Hamada, F., Bienz, M., 2004. The APC Tumor Suppressor Binds to C-Terminal Binding Protein to Divert Nuclear  $\beta$ -Catenin from TCF. *Dev. Cell* 7, 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.022>

- 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., Häslér, 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>
- Hanai, H., Iida, T., Takeuchi, K., Watanabe, F., Yamada, M., Kikuyama, M., Maruyama, Y., Iwaoka, Y., Hirayama, K., Nagata, S., Takai, K., 2008. Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1210–1216. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01714.x>
- Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J., 2005. Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 129, 50–65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>
- Heinzlmann, M., Lang, S.M., Neynaber, S., Reinshagen, M., Emmrich, J., Stratakis, D.F., Heldwein, W., Wiebecke, B., Loeschke, K., 2002. Screening for p53 and K-ras mutations in whole-gut lavage in chronic inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 1061–1066.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., Schulzke, J.D., 2005. Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology* 129, 550–564. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.002>
- Heller, F., Fuss, I.J., Nieuwenhuis, E.E., Blumberg, R.S., Strober, W., 2002. Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis, Is Mediated by IL-13-Producing NK-T Cells. *Immunity* 17, 629–638. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00453-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00453-3)
- Huber, J.P., Farrar, J.D., 2011. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* 132, 466–474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03412.x>
- Huelsken, J., 2002. The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* 115, 3977–3978. <https://doi.org/10.1242/jcs.00089>
- Hughes, T.A., Brady, H.J.M., 2006. Regulation of axin2 expression at the levels of transcription, translation and protein stability in lung and colon cancer. *Cancer Lett.* 233, 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.026>
- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., Srikrishna, G., 2011. S100A8/A9 Activate Key Genes and Pathways in Colon Tumor Progression. *Mol. Cancer Res.* 9, 133–148. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0394>
- Ikeda, Y., Akbar, F., Matsui, H., Onji, M., 2001. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 841–850.

- Ingersoll, M.A., Platt, A.M., Potteaux, S., Randolph, G.J., 2011. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.*, Special Issue: Innate immune cell trafficking 32, 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.001>
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A.R., Sansom, O.J., Winton, D.J., 2004. Inducible cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of  $\beta$ -catenin. *Gastroenterology* 126, 1236–1246. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.020>
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 16, 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jäger, S., Stange, E., Wehkamp, J., 2010. Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation. *Int. J. Inflamm.* 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/910283>
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., Costantini, F., 2002. Wnt/ $\beta$ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1172–1183. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1172-1183.2002>
- Jia, H., Song, L., Cong, Q., Wang, J., Xu, H., Chu, Y., Li, Q., Zhang, Y., Zou, X., Zhang, C., Chin, Y.E., Zhang, X., Li, Z., Zhu, K., Wang, B., Peng, H., Hou, Z., 2017. The LIM protein AJUBA promotes colorectal cancer cell survival through suppression of JAK1/STAT1/IFIT2 network. *Oncogene* 36, 2655–2666. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.418>
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., van der Post, S., Rodriguez-Piñeiro, A.M., Sjövall, H., Bäckström, M., Hansson, G.C., 2011a. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3635–3641. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., Hansson, G.C., 2011b. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4659–4665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Jones, G.-R., Bain, C.C., Fenton, T.M., Kelly, A., Brown, S.L., Ivens, A.C., Travis, M.A., Cook, P.C., MacDonald, A.S., 2018. Dynamics of Colon Monocyte and Macrophage Activation During Colitis. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02764>
- 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>
- Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., Kaestner, K.H., 2002. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2619–2628.
- Kim, D.-H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H.-J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S., Yamamoto, T., 1996. Human Apolipoprotein E Receptor 2: A NOVEL LIPOPROTEIN RECEPTOR OF THE LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR FAMILY PREDOMINANTLY EXPRESSED IN BRAIN. *J. Biol. Chem.* 271, 8373–8380. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8373>
- Kim, E.R., Chang, D.K., 2014. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 9872–9881. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9872>
- Klampfer, L., 2011. Cytokines, Inflammation and Colon Cancer [WWW Document]. <https://doi.org/info:doi/10.2174/156800911795538066>
- Koch, S., Kucharzik, T., Heidemann, J., Nusrat, A., Luegering, A., 2010. Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 161, 332–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04177.x>
- 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.
- Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N., Budnik, V., 2009. Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless. *Cell* 139, 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.051>
- Koslowski, M.J., Beisner, J., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2010. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.011>
- Koslowski, M.J., Teltschik, Z., Beisner, J., Schaeffeler, E., Wang, G., Kübler, I., Gersemann, M., Cooney, R., Jewell, D., Reinisch, W., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Schwab, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2012. Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet.* 8, e1002523. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002523>
- Kotredes, K.P., Gamero, A.M., 2013. Interferons as Inducers of Apoptosis in Malignant Cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 33, 162–170. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0110>
- Kretzschmar, K., Clevers, H., 2017. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Dev. Biol., Hubrecht Institute centennial, from embryos to stem cells* 428, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.015>

- Lakatos, P.L., Lakatos, L., 2008. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World J. Gastroenterol.* WJG 14, 3937–3947. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3937>
- Lashner, B.A., Shapiro, B.D., Husain, A., Goldblum, J.R., 1999. Evaluation of The Usefulness of Testing for P53 Mutations in Colorectal Cancer Surveillance for Ulcerative Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 456. [https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.877\\_f.x](https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.877_f.x)
- Lauvau, G., Loke, P., Hohl, T.M., 2015. Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Semin. Immunol.* 27, 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.014>
- Leow, C.C., Romero, M.S., Ross, S., Polakis, P., Gao, W.-Q., 2004. Hath1, Down-Regulated in Colon Adenocarcinomas, Inhibits Proliferation and Tumorigenesis of Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 64, 6050–6057. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0290>
- Li, L., Xie, T., 2005. STEM CELL NICHE: Structure and Function 30.
- Liebler, J.M., Kunkel, S.L., Burdick, M.D., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Strieter, R.M., 1994. Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 152, 241–249.
- Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L.-I., Köhl, A.A., Erben, U., May, C., Schulzke, J.-D., Siegmund, B., 2015. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1297–1305. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384>
- Liu, J., Cao, S., Herman, L.M., Ma, X., 2003. Differential Regulation of Interleukin (IL)-12 p35 and p40 Gene Expression and Interferon (IFN)- $\gamma$ -primed IL-12 Production by IFN Regulatory Factor 1. *J. Exp. Med.* 198, 1265–1276. <https://doi.org/10.1084/jem.20030026>
- 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>
- Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrücker, H.-W., Duncan, G.S., Bischof, S., Röllinghoff, M., Mak, T.W., 1997. Interferon Regulatory Factor-1 Is Required for a T Helper 1 Immune Response In Vivo. *Immunity* 6, 681–689. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80444-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80444-6)
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., Behrens, J., 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1184–1193.
- Magnusson, M.K., Brynjólfsson, S.F., Dige, A., Uronen-Hansson, H., Börjesson, L.G., Bengtsson, J.L., Gudjonsson, S., Öhman, L., Agnholt, J., Sjövall, H., Agace, W.W., Wick, M.J., 2016. Macrophage and dendritic cell subsets in IBD: ALDH+ cells are reduced in colon tissue of patients with ulcerative colitis regardless of inflammation. *Mucosal Immunol.* 9, 171–182. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.48>

- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L., 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 13, 265–270. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90008-U](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90008-U)
- Matsumoto, A., Arcaroli, J., Chen, Y., Gasparetto, M., Neumeister, V., Thompson, D.C., Singh, S., Smith, C., Messersmith, W., Vasiliou, V., 2017. Aldehyde dehydrogenase 1B1: a novel immunohistological marker for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 117, 1537–1543. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.304>
- Melle, C., Ernst, G., Schimmel, B., Bleul, A., Mothes, H., Kaufmann, R., Settmacher, U., Von Eggeling, F., 2006. Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma. *Int. J. Oncol.* 28, 195–200. <https://doi.org/10.3892/ijo.28.1.195>
- Middel, P., 2006. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* 55, 220–227. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.063008>
- Monteiro, L., Souza-Machado, A., Menezes, C., Melo, A., 2011. Association between allergies and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Acta Neurol. Scand.* 123, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2010.01355.x>
- Moravkova, P., Kohoutova, D., Rejchrt, S., Cyrany, J., Bures, J., 2016. Role of S100 Proteins in Colorectal Carcinogenesis [WWW Document]. *Gastroenterol. Res. Pract.* <https://doi.org/10.1155/2016/2632703>
- Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341. <https://doi.org/10.1038/nri1057>
- Munn, D.H., Bree, A.G., Beall, A.C., Kaviani, M.D., Sabio, H., Schaub, R.G., Alpaugh, R.K., Weiner, L.M., Goldman, S.J., 1996. Recombinant human macrophage colony-stimulating factor in nonhuman primates: selective expansion of a CD16+ monocyte subset with phenotypic similarity to primate natural killer cells. *Blood* 88, 1215–1224.
- Murakami, H., Akbar, S.M.F., Matsui, H., Horiike, N., Onji, M., 2002. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 504–510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01838.x>
- Naito, A.T., Sumida, T., Nomura, S., Liu, M.-L., Higo, T., Nakagawa, A., Okada, K., Sakai, T., Hashimoto, A., Hara, Y., Shimizu, I., Zhu, W., Toko, H., Katada, A., Akazawa, H., Oka, T., Lee, J.-K., Minamino, T., Nagai, T., Walsh, K., Kikuchi, A., Matsumoto, M., Botto, M., Shiojima, I., Komuro, I., 2012. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 149, 1298–1313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.047>
- Neufert, C., Pickert, G., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Nikolae, A., Ouyang, W., Neurath, M.F., Becker, C., 2010. Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle* 9, 652–655. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10615>

- Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S., 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- 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., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606. <https://doi.org/10.1038/35079114>
- Ohsugi, T., Yamaguchi, K., Zhu, C., Ikenoue, T., Furukawa, Y., 2017. Decreased expression of interferon-induced protein 2 (IFIT2) by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling confers anti-apoptotic properties to colorectal cancer cells. *Oncotarget* 8, 100176–100186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22122>
- Ohteki, T., Yoshida, H., Matsuyama, T., Duncan, G.S., Mak, T.W., Ohashi, P.S., 1998. The Transcription Factor Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) Is Important during the Maturation of Natural Killer 1.1+ T Cell Receptor- $\alpha/\beta$ + (NK1+ T) Cells, Natural Killer Cells, and Intestinal Intraepithelial T Cells. *J. Exp. Med.* 187, 967–972. <https://doi.org/10.1084/jem.187.6.967>
- O'Keefe, M., Mok, W.H., Radford, K.J., 2015. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4309–4325. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2005-0>
- Ostaf, M.J., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* 5, 1–19. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201773>
- Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., Andrian, U.H. von, 2001. Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV: A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues. *J. Exp. Med.* 194, 1361–1374. <https://doi.org/10.1084/jem.194.9.1361>
- Pandey, A.K., Yang, Y., Jiang, Z., Fortune, S.M., Coulombe, F., Behr, M.A., Fitzgerald, K.A., Sasseti, C.M., Kelliher, M.A., 2009. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 5, e1000500. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000500>
- Park, D.-S., Seo, J.-H., Hong, M., Choi, S.-C., 2013. Role of the Rap2/TNFK kinase pathway in regulation of LRP6 stability for Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.104>
- Park, E.T., Oh, H.K., Gum, J.R., Crawley, S.C., Kakar, S., Engel, J., Leow, C.C., Gao, W.-Q., Kim, Y.S., 2006. HATH1 Expression in Mucinous Cancers of the Colorectum and Related Lesions. *Clin. Cancer Res.* 12, 5403–5410. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0573>
- Pasquevich, K.A., Bieber, K., Günter, M., Grauer, M., Pötz, O., Schleicher, U., Biedermann, T., Beer-Hammer, S., Bühring, H.-J., Rammensee, H.-G., Zender, L., Autenrieth, I.B., Lengerke, C., Autenrieth, S.E., 2015. Innate immune system favors emergency monopoiesis at the expense of DC-

- differentiation to control systemic bacterial infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 45, 2821–2833. <https://doi.org/10.1002/eji.201545530>
- Pataki, C.A., Couchman, J.R., Brábek, J., 2015. Wnt Signaling Cascades and the Roles of Syndecan Proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem.* 63, 465–480. <https://doi.org/10.1369/0022155415586961>
- Pazgier, M., Hoover, D.M., Yang, D., Lu, W., Lubkowski, J., 2006. Human beta-defensins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1294–1313. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5540-2>
- Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñero, A.M., Nyström, E.E.L., Wising, C., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* 260, 8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>
- Pinto, D., Clevers, H., 2005. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 306, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.022>
- 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>
- Png, C.W., Lindén, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., McGuckin, M.A., Florin, T.H.J., 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2420–2428. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Proietto, A.I., Dommelen, S. van, Wu, L., 2009. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol. Cell Biol.* 87, 39–45. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.86>
- Rahmani, M., Read, J.T., Carthy, J.M., McDonald, P.C., Wong, B.W., Esfandiarei, M., Si, X., Luo, Z., Luo, H., Rennie, P.S., McManus, B.M., 2005. Regulation of the Versican Promoter by the  $\beta$ -Catenin-T-cell Factor Complex in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 13019–13028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411766200>
- Rivas, C.I., Zúñiga, F.A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., Vera, J.C., 2008. Vitamin C transporters. *J. Physiol. Biochem.* 64, 357–375.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Ed.), 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010.
- Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., Williams, C., Price, A., Talbot, I., Forbes, A., 2004. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126, 451–459. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.010>
- Sailaja, B.S., He, X.C., Li, L., 2016. The regulatory niche of intestinal stem cells: Regulatory niche of intestinal stem cells. *J. Physiol.* 594, 4827–4836. <https://doi.org/10.1113/JP271931>

- Sakuraba, A., Sato, T., Kamada, N., Kitazume, M., Sugita, A., Hibi, T., 2009. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137, 1736–1745. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.049>
- Sanz-Pamplona, R., Berenguer, A., Cordero, D., Molleví, D.G., Crous-Bou, M., Sole, X., Paré-Brunet, L., Guino, E., Salazar, R., Santos, C., de Oca, J., Sanjuan, X., Rodriguez-Moranta, F., Moreno, V., 2014. Aberrant gene expression in mucosa adjacent to tumor reveals a molecular crosstalk in colon cancer. *Mol. Cancer* 13, 46. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-46>
- Sartor, R.B., 2006. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol.* 38 *Hepatol.* 3, 390–407. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0528>
- 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>
- Schade, C., Flemström, G., Holm, L., 1994. Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and -inhibited rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 107, 180–188. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0016508594900752>
- Schoggins, J.W., 2014. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr. Opin. Virol., Viral pathogenesis / Vaccines* 6, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.006>
- Schroeder, B.O., Ehmann, D., Precht, J.C., Castillo, P.A., Kuchler, R., Berger, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2015. Paneth cell  $\alpha$ -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.* 8, 661–671. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.100>
- Schultsz, C., Van Den Berg, F.M., Ten Kate, F.W., Tytgat, G.N., Dankert, J., 1999. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 117, 1089–1097.
- Schwarzmaier, D., Foell, D., Weinhage, T., Varga, G., Däbritz, J., 2013. Peripheral Monocyte Functions and Activation in Patients with Quiescent Crohn's Disease. *PLOS ONE* 8, e62761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062761>
- 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>
- Selsted, M.E., Tang, Y.Q., Morris, W.L., McGuire, P.A., Novotny, M.J., Smith, W., Henschen, A.H., Cullor, J.S., 1993. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268, 6641–6648.
- Serbina, N.V., Pamer, E.G., 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317. <https://doi.org/10.1038/ni1309>

- Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T.M., Serbina, N.V., Lipuma, L., Leiner, I., Li, M.O., Frenette, P.S., Pamer, E.G., 2011. Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* 34, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.016>
- Shih, D.Q., Targan, S.R., McGovern, D., 2008. Recent advances in IBD pathogenesis: Genetics and immunobiology. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 10, 568–575. <https://doi.org/10.1007/s11894-008-0104-x>
- Shimomura, Y., Agalliu, D., Vonica, A., Luria, V., Wajid, M., Baumer, A., Belli, S., Petukhova, L., Schinzel, A., Brivanlou, A.H., Barres, B.A., Christiano, A.M., 2010. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* 464, 1043–1047. <https://doi.org/10.1038/nature08875>
- Shin, S.D., Shin, A., Mayagoitia, K., Wilson, C.G., Bellinger, D.L., Soriano, S., 2019. Interferon downstream signaling is activated early in pre-symptomatic Niemann-Pick disease type C. *Neurosci. Lett.* 706, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.05.005>
- Silva, M.A., 2009. Intestinal Dendritic Cells and Epithelial Barrier Dysfunction in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 436–453. <https://doi.org/10.1002/ibd.20660>
- 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., Roberts, R.L., Fowler, E.V., Zhao, Z.Z., McGuckin, M.A., Huang, N., Hayward, N.K., Webb, P.M., Whiteman, D.C., Cavanaugh, J.A., McCallum, R., Florin, T.H.J., Barclay, M.L., Garry, R.B., Merriman, T.R., Montgomery, G.W., Radford-Smith, G.L., 2010. KCNN4 gene variant is associated with ileal Crohn's Disease in the Australian and New Zealand population. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2209–2217. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.161>
- 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>
- Singh, S., Arcaroli, J., Chen, Y., Thompson, D.C., Messersmith, W., Jimeno, A., Vasiliou, V., 2015. ALDH1B1 Is Crucial for Colon Tumorigenesis by Modulating Wnt/ $\beta$ -Catenin, Notch and PI3K/Akt Signaling Pathways. *PLOS ONE* 10, e0121648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121648>
- Soletti, R.C., Rodrigues, N.A.L.V., Biasoli, D., Luiz, R.R., Souza, H.S.P. de, Borges, H.L., 2013. Immunohistochemical Analysis of Retinoblastoma and  $\beta$ -Catenin as an Assistant Tool in the Differential Diagnosis between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *PLOS ONE* 8, e70786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070786>

- Soruri, A., Grigat, J., Forssmann, U., Riggert, J., Zwirner, J., 2007.  $\beta$ -Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur. J. Immunol.* 37, 2474–2486. <https://doi.org/10.1002/eji.200737292>
- Stawowczyk, M., Scoy, S.V., Kumar, K.P., Reich, N.C., 2011. The Interferon Stimulated Gene 54 Promotes Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 7257–7266. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.207068>
- Stebe-Frick, S., Ostaff, M.J., Stange, E.F., Malek, N.P., Wehkamp, J., 2018. Histone deacetylase-mediated regulation of the antimicrobial peptide hBD2 differs in intestinal cell lines and cultured tissue. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31125-x>
- Strober, W., Fuss, I.J., Blumberg, R.S., 2002. The Immunology of Mucosal Models of Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 495–549. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816>
- Strugala, V., Dettmar, P.W., Pearson, J.P., 2008. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* 62, 762–769. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x>
- Symonds, D.A., 1974. Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum. *Arch. Pathol.* 97, 343–347.
- Takahashi, M., Fujita, M., Furukawa, Y., Hamamoto, R., Shimokawa, T., Miwa, N., Ogawa, M., Nakamura, Y., 2002. Isolation of a Novel Human Gene, APCDD1, as a Direct Target of the  $\beta$ -Catenin/T-Cell Factor 4 Complex with Probable Involvement in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 5651–5656.
- Takeda, S., Sato, T., Katsuno, T., Nakagawa, T., Noguchi, Y., Yokosuka, O., Saito, Y., 2010. Adsorptive Depletion of  $\alpha 4$  Integrinhi- and CX3CR1hi- Expressing Proinflammatory Monocytes in Patients with Ulcerative Colitis. *Dig. Dis. Sci.* 55, 1886–1895. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-0974-2>
- Taki, S., Sato, T., Ogasawara, K., Fukuda, T., Sato, M., Hida, S., Suzuki, G., Mitsuyama, M., Shin, E.-H., Kojima, S., Taniguchi, T., Asano, Y., 1997. Multistage Regulation of Th1-Type Immune Responses by the Transcription Factor IRF-1. *Immunity* 6, 673–679. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80443-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80443-4)
- Tanaka, M., Saito, H., Kusumi, T., Fukuda, S., Shimoyama, T., Sasaki, Y., Suto, K., Munakata, A., Kudo, H., 2001. Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 1353–1359.
- Tanaka, N., Sato, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Oda, E., Noguchi, S., Schreiber, R.D., Tsujimoto, Y., Taniguchi, T., 1998. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells* 3, 29–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00164.x>
- Tang, Y.-Q., Yuan, J., Ösapay, G., Ösapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J., Selsted, M.E., 1999. A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated  $\alpha$ -Defensins. *Science* 286, 498–502. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.498>

- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M., 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101-2114.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Thiesen, S., Janciauskiene, S., Uronen-Hansson, H., Agace, W., Högerkorp, C.-M., Spee, P., Håkansson, K., Grip, O., 2014. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 95, 531–541. <https://doi.org/10.1189/jlb.0113021>
- Turovskaya, O., Foell, D., Sinha, P., Vogl, T., Newlin, R., Nayak, J., Nguyen, M., Olsson, A., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., Varki, N., Kronenberg, M., Freeze, H.H., Srikrishna, G., 2008. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis* 29, 2035–2043. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn188>
- Tytgat, K.M.A.J., van der Wal, J.-W.G., Einerhand, A.W.C., Büller, H.A., Dekker, J., 1996. Quantitative Analysis of MUC2 Synthesis in Ulcerative Colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 397–405. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1039>
- Unitt, J., Hornigold, D., 2011. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1324–1328. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.010>
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., Clevers, H., 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241–250.
- van Dekken, H., Wink, J.C., Vissers, K.J., Franken, P.F., Ruud Schouten, W., J. Hop, W.C., Kuipers, E.J., Fodde, R., Janneke van der Woude, C., 2007. Wnt pathway-related gene expression during malignant progression in ulcerative colitis. *Acta Histochem.* 109, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.02.007>
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- van Es, J.H., Haegerbarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.-K., Boj, S.F., Korving, J., van den Born, M., van Oudenaarden, A., Robine, S., Clevers, H., 2012. A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1918–1927. <https://doi.org/10.1128/MCB.06288-11>
- van Es, J.H., 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>
- 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>

- Waisman, A., Lukas, D., Clausen, B.E., Yogev, N., 2017. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin. Immunopathol.* 39, 153–163.  
<https://doi.org/10.1007/s00281-016-0583-z>
- Wallace, K.L., Zheng, L.-B., Kanazawa, Y., Shih, D.Q., 2014. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 6–21.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.6>
- Wang, D.P., Gu, L.L., Xue, Q., Chen, H., Mao, G.X., 2018. CtBP2 promotes proliferation and reduces drug sensitivity in non-small cell lung cancer via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Neoplasma* 65, 888–897.  
[https://doi.org/10.4149/neo\\_2018\\_171220N828](https://doi.org/10.4149/neo_2018_171220N828)
- Wang, Q., Wang, Q., Zhang, Y.-N., Zhang, Y.-N., Lin, G.-L., Lin, G.-L., Qiu, H.-Z., Qiu, H.-Z., Wu, B., Wu, B., Wu, H.-Y., Wu, H.-Y., Zhao, Y., Zhao, Y., Chen, Y.-J., Chen, Y.-J., Lu, C.-M., Lu, C.-M., 2012. S100P, a potential novel prognostic marker in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 28, 303–310.  
<https://doi.org/10.3892/or.2012.1794>
- 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., Koslowski, M., Wang, G., Stange, E.F., 2008. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* 1, S67–S74.  
<https://doi.org/10.1038/mi.2008.48>
- 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., 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18129–18134.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>
- 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>
- Wehkamp, Jan, 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.
- Weiner, L.M., Li, W., Holmes, M., Catalano, R.B., Dohnarsky, M., Padavic, K., Alpaugh, R.K., 1994. Phase I Trial of Recombinant Macrophage Colony-stimulating Factor and Recombinant  $\gamma$ -Interferon: Toxicity, Monocytosis, and Clinical Effects. *Cancer Res.* 54, 4084–4090.

- Wilson, S.S., Wiens, M.E., Smith, J.G., 2013. Antiviral mechanisms of human defensins. *J. Mol. Biol.* 425, 4965–4980. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038>
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., Wong, S.-C., 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–e31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., Wong, S.C., 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
- Xiao, S., Li, D., Zhu, H.-Q., Song, M.-G., Pan, X.-R., Jia, P.-M., Peng, L.-L., Dou, A.-X., Chen, G.-Q., Chen, S.-J., Chen, Z., Tong, J.-H., 2006. RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16448–16453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607830103>
- Xiao, Y., Yang, X., Miao, Y., He, X., Wang, M., Sha, W., 2016. Inhibition of cell proliferation and tumor growth of colorectal cancer by inhibitors of Wnt and Notch signaling pathways. *Oncol. Lett.* 12, 3695–3700. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5175>
- Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A.B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R.H., Fuller, J.H., Reinhard, C., 2001. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14973–14978.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., Wang, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., Zoghbi, H.Y., 2001. Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* 294, 2155–2158. <https://doi.org/10.1126/science.1065718>
- Yasunaga, M., Matsumura, Y., 2014. Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer. *Sci. Rep.* 4, 4852. <https://doi.org/10.1038/srep04852>
- Yin, X., Farin, H.F., van Es, J.H., Clevers, H., Langer, R., Karp, J.M., 2013. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nat. Methods* 11, 106–112. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2737>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- You, J., Nguyen, A.V., Albers, C.G., Lin, F., Holcombe, R.F., 2008. Wnt Pathway-Related Gene Expression in Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1013–1019. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-9973-3>

- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhang, J., Zhang, X., Zhang, L., Zhou, F., van Dinther, M., Ten Dijke, P., 2012. LRP8 mediates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and controls osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 27, 2065–2074. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1661>
- 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* 49, 9770–9782. <https://doi.org/10.1021/bi101512j>
- Zhou, L., Braat, H., Faber, K.N., Dijkstra, G., Peppelenbosch, M.P., 2009. Monocytes and their pathophysiological role in Crohn's disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 192–202. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8308-7>
- Zhou, X., Michal, J.J., Zhang, L., Ding, B., Lunney, J.K., Liu, B., Jiang, Z., 2013. Interferon Induced IFIT Family Genes in Host Antiviral Defense. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 200–208. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5613>
- Zhuang, Z., Zhuang, Z., Hu, F., Hu, F., Hu, J., Hu, J., Wang, C., Wang, C., Hou, J., Hou, J., Yu, Z., Yu, Z., Wang, T.T., Wang, T.T., Liu, X., Liu, X., Huang, H., Huang, H., 2017. MicroRNA-218 promotes cisplatin resistance in oral cancer via the PPP2R5A/Wnt signaling pathway. *Oncol. Rep.* 38, 2051–2061. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5899>
- Ziegler-Heitbrock, L., 2014. Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol., Monocytes in Homeostasis and Disease* 291, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.06.008>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
- Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliyah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., Shakhar, G., Halpern, Z., Jung, S., 2012. Ly6Chi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity* 37, 1076–1090. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026>
9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013

## 7 Erklärungen zum Eigenanteil

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

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

Die Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Frau Jutta Bader (MTA) und Dr. rer. nat. Nicole Armbruster, selbstständig und von mir allein durchgeführt. Die Zellanalysen und -sortierungen erfolgten in Kooperation mit dem FACS Core Facility, Tübingen, sowie die RNA-Sequenzierung, die dazugehörige RNA-Isolierung und die cDNA-Umschreibung durch das Fraunhofer-Institutszentrum, Stuttgart.

Die statistische Auswertung wurde eigenständig mit Unterstützung von Dr. rer. nat. Nicole Armbruster und Dr. rer. nat. Christian Grumaz durchgeführt.

Die Abbildungen 1 und 2 sind den oben genannten Quellen entnommen und von mir entsprechend modifiziert worden. Alle weiteren Tabellen und Abbildungen wurden eigenständig von mir angefertigt.

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

Tübingen, den 19.12.2019



Marie-Christine Weber

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die dazu beigetragen haben, dass meine Dissertation zu dem wurde, was sie heute ist.

Zu allererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jan Wehkamp, der mir mit der Bereitstellung des Themas, seinen konstruktiven Vorschlägen und das in mich gesetzte Vertrauen die Basis für meine Arbeit gelegt hat.

Ebenso danken möchte ich meiner Mentorin Dr. rer. nat. Nicole Armbruster, die mich während der Laborzeit fachlich sehr gut betreut und mir bei allen Höhen und Tiefen stets motivierend zur Seite gestanden hat.

Des Weiteren danke ich von Herzen Dr. rer. nat. Judith Wendler für die Übernahme der Betreuung und die unermüdliche Unterstützung während des Schreibprozesses. Du hast mir sehr geholfen, dran zu bleiben und bei all den spannenden Themen nicht den roten Faden zu verlieren.

Jutta Bader und Marion Strauß danke ich für die tolle Einarbeitung in die Methoden meiner Dissertation. Ihr wart die gute Seele des Labors.

Dr. rer. nat. Kristin Bieber (FACS Core Facility, Tübingen) und Dr. rer. nat. Christian Grumaz (Fraunhofer - Institutszentrum, Stuttgart) danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Besonders danke ich der AG Wehkamp für die tolle Zeit. Euer herausragendes Engagement für uns Doktoranden und die immer positive Stimmung im Labor sprechen für sich. Ich wünsche euch nur das Beste!

Zuletzt geht mein Dank an meine Familie, insbesondere meinen Mann, für die nicht-enden-wollende Liebe und Unterstützung.