

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und
Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer

**Vergleichende Charakterisierung intestinaler Barriereveränderungen in
Gewebeproben und Enteroiden aus Patienten mit chronisch-
entzündlichen Darmerkrankungen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jonas Salm

geboren Schneider

aus Seeheim-Jugenheim

Würzburg, Oktober 2020

Referent: Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Marco Metzger

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2021

Der Promovend ist Arzt

Für diskutierbare Erkenntnisse in einer postfaktischen Zeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Hintergrund und Rolle der Darmbarriere bei Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen..... | 1 |
| 1.2 Funktion der Darmbarriere..... | 2 |
| 1.3 Aufbau und Anatomie der Darmbarriere..... | 2 |
| 1.3.1 Extrazelluläre Bestandteile..... | 5 |
| 1.3.2 Zelluläre Bestandteile..... | 5 |
| 1.3.2.1 Occludenskontakte | 7 |
| 1.3.2.2 Adhaerenskontakte..... | 11 |
| 1.3.2.3 Desmosomen..... | 13 |
| 1.4 Pathophysiologie des Morbus Crohn..... | 14 |
| 1.4.1 Veränderungen der Darmbarriere vor dem Hintergrund einer CED | 18 |
| 1.5 Modelle der Darmbarriere und Chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen | 20 |
| 1.5.1 Tiermodelle | 20 |
| 1.5.1.1 Chemisch induzierte Kolitis Modelle | 21 |
| 1.5.2 Zellkulturen..... | 22 |
| 1.5.3 Primärzell-Modell in Form von Enteroiden..... | 24 |
| 1.6 Fragestellung | 29 |
| 2. Material und Methoden | 30 |
| 2.1 Material | 30 |
| 2.1.1 Sammlung humaner Gewebeproben | 30 |
| 2.1.1.1 Gewebeprozessierung..... | 31 |
| 2.1.2 Antikörper..... | 33 |
| 2.1.2.1 Primärantikörper | 33 |
| 2.1.2.2 Sekundärantikörper | 35 |
| 2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe..... | 35 |
| 2.1.3.1 DAPI | 35 |
| 2.2 Methoden..... | 36 |
| 2.2.1 Generierung der Enteroide..... | 36 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2 Herstellung von Gewebelysaten | 37 |
| 2.2.3 Western Blot..... | 38 |
| 2.2.3.1 Bicinchoninsäure-Test Proteinbestimmung | 38 |
| 2.2.3.2 SDS-Page Elektrophorese..... | 39 |
| 2.2.3.3 Immunoblot | 40 |
| 2.2.4 Gewebe-Färbungen | 43 |
| 2.2.4.1 H.E.-Färbungen | 43 |
| 2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie | 44 |
| 2.2.5 Klassifikation des Entzündungsausmasses | 46 |
| 2.2.6 Statistische Auswertung..... | 47 |
| 3. Ergebnisse | 51 |
| 3.1 Charakterisierung der Studienpatienten | 51 |
| 3.1.1 Histomorphologische Untersuchung der Gewebeproben | 54 |
| 3.1.1.1 Einstufung/Klassierung des Grades der Entzündung | 54 |
| 3.2 Der Schlussleistenkomplex in Patientenproben | 56 |
| 3.2.1 Occludenskontakte in Patientenproben | 56 |
| 3.2.2 Adhaerenskontakte in Patientenproben..... | 61 |
| 3.2.3 Desmosomen in Patientenproben..... | 62 |
| 3.3 Charakterisierung der Enteroide | 68 |
| 3.3.1 Histomorphologische Untersuchung der Enteroide | 68 |
| 3.4 Der Schlussleistenkomplex in Enteroiden | 69 |
| 3.4.1 Occludenskontakte in Enteroiden | 69 |
| 3.4.2 Adhaerenskontakte in Enteroiden..... | 73 |
| 3.4.3 Desmosomen in Enteroiden..... | 74 |
| 3.5 Vergleich der Junktionsproteine in Vollwandproben und Enteroiden | 78 |
| 4. Diskussion | 80 |
| 4.1 Die Entzündungsaktivität unterscheidet sich in Gewebeproben unterschiedlicher Lokalisation..... | 81 |
| 4.2 Die Junktionsproteine durchlaufen quantitative Veränderungen während einer chronischen Inflammation..... | 82 |
| 4.2.1 Enteroide bilden histomorphologisch kleine Duplikate des Magen-Darmtraktes | 85 |
| 4.2.2 Die Verteilung der Junktionsproteine in den Enteroiden gleicht derer in den humanen Vollwandresektaten während einer CED. | 86 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| 4.2.3 Unterschiedliche Entzündungsaktivität erbringt keinen signifikanten Unterschied in der Quantität der Junktionsproteine in den humanen Vollwandlysaten und Enteroiden | 89 |
| 4.2.4 Starker Altersunterschied in der Kontrollgruppe und Patientengruppe mit MC | 90 |
| 5. Ausblick | 92 |
| 6. Zusammenfassung | 94 |
| 7. Anhang..... | 95 |
| 7.1. Literaturverzeichnis..... | 95 |
| 7.2. Tabellenverzeichnis | 108 |
| 7.3. Abbildungsverzeichnis | 109 |
| 7.4. Abkürzungsverzeichnis..... | 110 |
| Danksagung..... | 112 |

1. Einleitung

1.1 Hintergrund und Rolle der Darmbarriere bei Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gehören verschiedene Entitäten wie Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und die Colitis indeterminata (Abraham and Cho, 2009; Guindi and Riddell, 2004). CED sind charakterisiert durch Entzündungen des Darmes und können auch extraintestinale Symptome hervorrufen. Der MC kann dabei den gesamten Darmtrakt vom Mund bis zum Anus befallen und ist durch eine segmentale sowie transmurale Entzündung der Darmwand gekennzeichnet. Die Entzündung in der CU betrifft normalerweise nur Mukosa und Submukosa und ist auf das Colon beschränkt (Abraham and Cho, 2009; Schlegel et al., 2020).

Bei Patienten mit MC und direkten Verwandten ist die Integrität der Darmbarriere gestört. Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität ebendieser Barriere mit dem Verlust ihrer Selektivität. So können Stoffe von luminal nach adluminal gelangen, welche stark pathogen und entzündungsfördernd sind (Hollander, 1986). Die Mechanismen dieser Permeabilitätssteigerung sind Gegenstand aktueller Forschung und vollziehen sich überwiegend auf der Ebene des Schlussleistenkomplexes.

Die genauen Pathomechanismen, die zum Verlust der intestinalen Barrierefunktion bei CED führen sind nach wie vor nicht geklärt. Dies liegt vor allem daran, dass die Möglichkeiten diese Veränderungen mechanistisch zu untersuchen bisher durch den Mangel an validen Modellsystemen limitiert war. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Charakterisierung der intestinalen Barriereveränderungen in humanen Gewebeproben und sog. Organoid- oder Enteroidkulturen, die aus Patienten mit CED im Vergleich zu Patienten ohne CED gewonnen wurden.

1.2 Funktion der Darmbarriere

Die Darmbarriere stellt eine wichtige Regulationsebene des Menschen bei seiner Interaktion mit der Umwelt dar. So ist der Darm mit seiner Oberfläche von bis zu 40 m² eine der größten Grenzflächen des menschlichen Körpers (Helander and Fändriks, 2014). Die Hauptfunktion der Darmbarriere besteht dabei einerseits darin, Nährstoffe wie Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Elektrolyte und Wasser selektiv zu resorbieren. Andererseits werden Bakterien, wie beispielsweise Escherichia Coli, die sich physiologischer Weise in der Darmflora befinden (Berg, 1996) und Schadstoffe am Übertritt in den menschlichen Blutkreislauf gehindert. Um die Darmbarriere aufrecht zu halten und die oben erwähnten Funktionen erfüllen zu können sind verschiedene Komponenten wichtig. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt die Integrität der Enterozyten zwischen denen sich dichte Zell-Zellkontakte ausbilden (Laukoetter et al., 2008; Schlegel et al., 2020).

Die Relevanz einer intakten Darmbarriere wird am besten am Beispiel ihrer Dysfunktion deutlich: So führen CED, virale und bakterielle Enteritiden und nekrotisierende Enterokolitiden zu einer Störung der Darmbarriere (Berkes et al., 2003; Clark et al., 2006; Teahon et al., 1992).

Die Folgen dieser Störung der Darmbarriere sind offensichtlich ein erhöhter Transport aller Darminhalte, einschließlich Bakterien, von luminal nach adluminal. So kann es unter anderem dazu kommen, dass die oben erwähnte physiologische Darmflora zu einer extraintestinalen Entzündung bis hin zu einer Sepsis mit Multiorganversagen führt (Swank and Deitch, 1996).

Somit ist eine intakte Darmbarriere eine wichtige Voraussetzung für die Integrität der menschlichen Physiologie und Gesundheit. Es ist wichtig die Veränderungen, die die Darmbarriere bei oben genannten Erkrankungen vollzieht, im Detail zu untersuchen und zu verstehen, um bei oben genannten Erkrankungen in Zukunft mit neuen therapeutischen Strategien zuvorkommen zu können.

1.3 Aufbau und Anatomie der Darmbarriere

Der Verdauungstrakt des menschlichen Körpers besteht aus Mundschleimhaut, Ösophagus, Gaster, Duodenum, Intestinum tenue und Intestinum crassum. Dabei wird das Intestinum tenue genauer in Jejunum und Ileum eingeteilt. Der

Einleitung

histologische Wandaufbau all dieser Organe ist dabei im Wesentlichen gleich und von luminal nach adluminal aus den folgenden charakteristischen Schichten aufgebaut: Mukosa, Submukosa, Muskularis, Serosa oder Adventitia (Abbildung 1) (Lüllmann-Rauch, 2009).

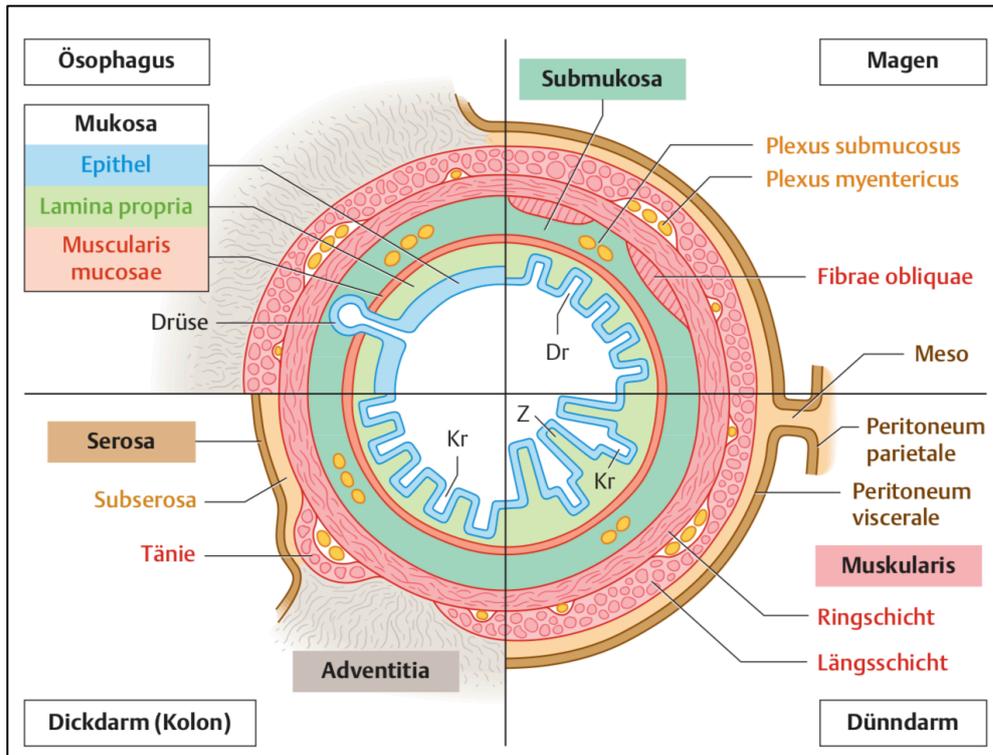


Abbildung 1: Wandaufbau des Magendarmtraktes

Abbildung 1 zeigt die Wandschichten des Magendarmtraktes mit Querschnitten der Hauptabschnitte, Ösophagus, Magen, Dünndarm und Dickdarm. Zur Kenntnis zu nehmen sind die Unterschiede der Hauptabschnitte bezüglich der Architektur der Mukosa. Charakteristisch für den Dünndarm ist dabei die Mukosale-Architektur mit Krypten und Zotten. **Kr**, Krypte. **Z**, Zotte. **Dr**, Drüse. (Schema, mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlags Stuttgart, aus „Taschenlehrbuch für Histologie“ von Renate Lüllmann-Rauch 3. Auflage 2009.)

Die größten regionalen Unterschiede weist der Verdauungstrakt dabei in dem Aufbau der Mukosa mit ihren typischen Schichten von Lamina epithelialis, Lamina propria und Muscularis mucosae auf. Vor allem ihre Architektur und ihr Epithel differieren dabei von Abschnitt zu Abschnitt. So kleidet ein einschichtiges Zylinderepithel den ganzen Verdauungstrakt bis auf Mundschleimhaut und Speiseröhre aus (Lüllmann-Rauch, 2009). Da in der folgenden Arbeit ausschließlich Gewebeproben aus dem terminalen Ileum untersucht wurden,

Einleitung

wird im Folgenden die Darmbarriere und ihr Aufbau mit besonderem Augenmerk auf diesen Abschnitt erklärt. Zum genaueren Verständnis des Aufbaus und der Architektur der Mukosa des Dünndarms siehe Abbildung 2.

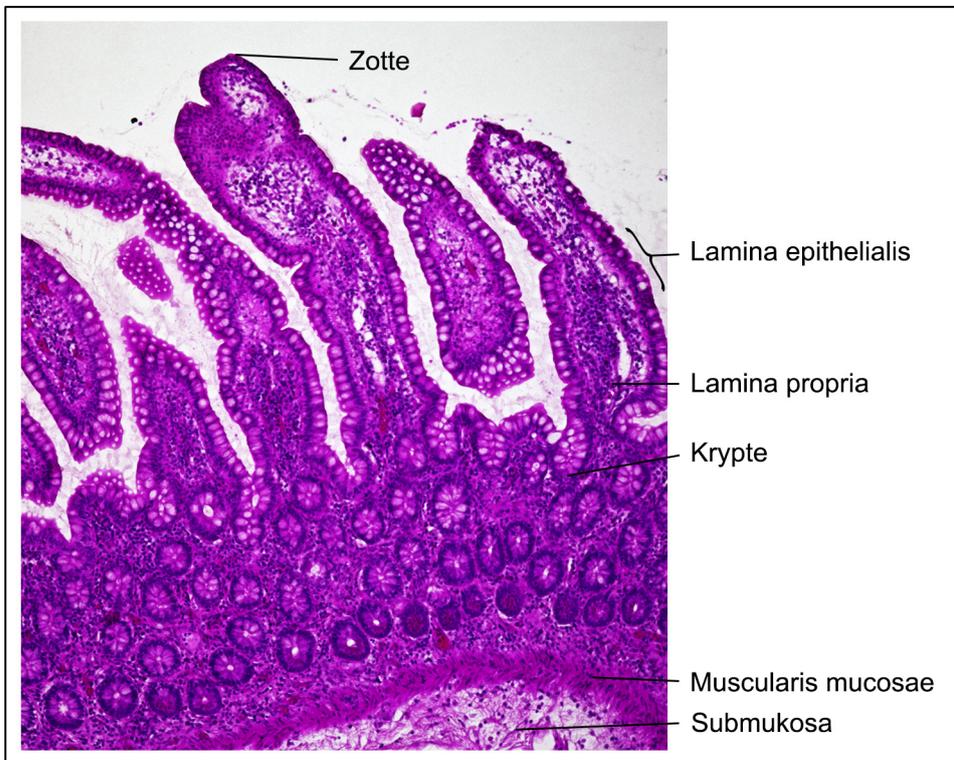


Abbildung 2: Aufbau der Dünndarmwand

Die Abbildung zeigt eine H.E.-Färbung eines Längsschnittes durch das terminale Ileum des Menschen in 10facher Vergrößerung. Zu sehen ist deutlich der Aufbau der Mukosa mit Zotten, Krypten, Lamina epithelialis (bestehend aus Enteroendokrinen Zellen, Becherzellen, Paneth-Zellen und Stammzellen), Lamina propria und Muscularis mucosae. Unterhalb der Mukosa gliedert sich die Submukosa an, welche vor allem aus Kollagenfasern und elastischen Fasern besteht. (H.E.-Färbung und Abbildung: Jonas Salm)

Die Darmbarriere im speziellen ist dabei luminal angeordnet und wird aus unterschiedlichen Strukturen gebildet. Die Bestandteile der Darmbarriere lassen sich nach ihrer Herkunft und Lokalisation weiter in zelluläre und extrazelluläre Bestandteile trennen (Salvo Romero et al., 2015; Schlegel et al., 2020). Der Übersichtlichkeit wegen wird im Folgenden die Barriere von luminal nach adluminal betrachtet.

1.3.1 Extrazelluläre Bestandteile

Eine erste Barriere wird durch nicht immunologische Abwehrmechanismen wie den sauren Magensaft, Intestinale-Motilität, Intestinale Mikroflora, Galle, pankreatische Enzyme und Lysozyme gebildet (Sarker and Gyr, 1992).

Als nächstes besitzt der Darm eine Immunglobulin A (IgA) -haltige Muzin-Schicht, welche in zwei Phasen unterteilbar ist und von Becherzellen gebildet und sezerniert wird.

Beide Phasen, sowohl innere als auch äußere, bestehen größtenteils aus dem großen Gel-bildendem Muc2-Muzin. Neben Ihrer IgA vermittelten Abwehr verhindert die Muzin-Schicht mechanisch, dass sich Bakterien an der Zellwand der Mukosa anheften, sich lokal vermehren und eine Entzündung auslösen (Johansson et al., 2008).

1.3.2 Zelluläre Bestandteile

Neben den oben genannten extrazellulären Abwehrmechanismen verfügt die Darmbarriere über zahlreiche zelluläre Bestandteile, welche auf unterschiedliche Art und Weise zur Wahrung der Integrität der Darmbarriere beitragen.

Die zellulären Bestandteile der Darmbarriere befinden sich dabei vornehmlich in der Mukosa mit ihren von luminal aufgezählten Schichten Lamina epithelialis, Lamina propria und lamina muscularis mucosae (Lüllmann-Rauch, 2009).

Den Hauptteil der Lamina epithelialis bilden dabei die Enterozyten. Sie sind für den Großteil der Barrierefunktion, im Sinne einer Diffusionsschranke, und der Verdauung wie Resorption zuständig (Lüllmann-Rauch, 2009; Schlegel et al., 2020).

Neben den Enterozyten befinden sich in der Mukosa des menschlichen Dünndarms auch sogenannte Paneth-Zellen. Sie sind am Kryptengrund lokalisierte sekretorische Zellen, welche vor allem antimikrobielle Peptide sezernieren und so zur Abwehrfunktion beitragen (Bevins and Salzman, 2011).

Den anteilig größten Bestandteil und damit mutmaßlich entscheidenden der Darmbarriere stellen die Enterozyten dar. Sie bilden den größten Teil der Lamina

Einleitung

epithelialis der Mukosa und kleiden somit den Darm luminal aus. Ihre Membran stellt funktional den größten Beitrag zur Barrierefunktion, da sie für hydrophile Stoffe nahezu nicht überwindbar ist. Lediglich durch eine Schädigung der Membran oder der Enterozyten direkt kann es zu einem Verlust der Barriere kommen. Solch eine Schädigung der Enterozyten kann es zum Beispiel im Zuge einer Chemotherapie, im Sinne eines Zelltodes der Enterozyten, geben. Geht man jedoch von einer intakten Epithelschicht aus, sind die interzellulären Verbindungen essentiell, um den parazellulären Transport zu regulieren und gegebenenfalls zu unterbinden (Turner, 2009). Dieser parazelluläre Weg ist typischerweise bei Entzündungen im Darm unselektiv geöffnet, weshalb der Dysregulation der Interzellularkontakte eine große Bedeutung hierbei zukommt. Die Gesamtheit der Interzellularkontakte wird als Schlussleistenkomplex bezeichnet.

Der Schlussleistenkomplex, oder auch Haftkomplex genannt, besteht von apikal nach basolateral aus einer Kombination verschiedener Zellkontakte. Von apikal gesehen aus einer Zonula occludens (tight-junction) hierunter einer Zonula adhaerens und basolateral der Macula adhaerens (Desmosomen) (Farquhar and Palade, 1963). Diese Epithelzellschicht ist dabei jedoch kein statischer Verbund. Es besteht ein ständiger Wechsel zwischen Apoptose alter Zellen und Generierung neuer Zellen. Enterozyten haben eine Lebensdauer von etwa 5 Tagen und müssen deswegen stetig durch neue Zellen ersetzt werden. Ort dieser Zellerneuerung ist der Krypten-Grund. Dort sitzen multipotente Stammzellen, welche sich auf dem Weg zur Zottenspitze zu Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen differenzieren und dort die durch Apoptose gestorbenen alten Zellen ersetzen (Sato and Clevers, 2013).

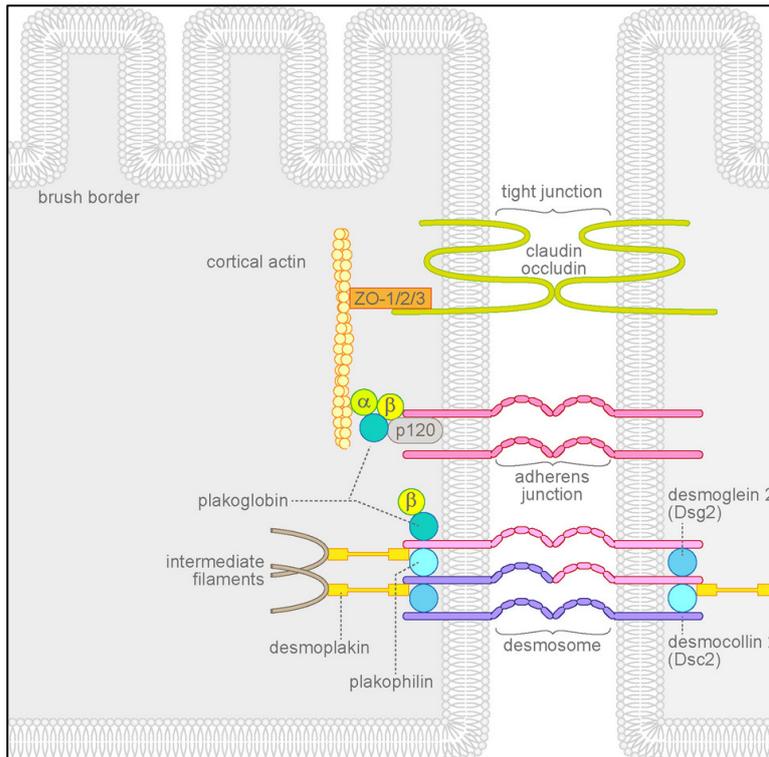


Abbildung 3: Skizze eines Abschlussleistenkomplexes

Von apikal nach basolateral kann man die Bestandteile des Abschlussleistenkomplexes zwischen zwei Enterozyten sehen. Die Zonula occludens aus Claudinen und Occludinen versiegelt den interzellularen Spalt. Darunter sind Zonula adherens aus E-Cadherinen und Desmosomen aus Desmoglein 2 und Desmocollin 2 nötig für die mechanische Absicherung. (Schema mit freundlicher Genehmigung aus Schlegel et al., 2020 (Schlegel et al., 2020)).

1.3.2.1 Occludenskontakte

Occludenskontakte, auch genannt tight junctions, sind die am weitesten apikal liegenden Zell-Zell-Verbindungen eines Abschlussleistenkomplexes und sind sichtbar als feine gürtelförmige Linie zwischen den Zellen (Farquhar and Palade, 1963).

Sie verbinden zwei benachbarte Zellen sehr eng miteinander. Durch diese enge Verbindung ist es möglich, im Sinne einer Tor-Funktion die parazelluläre Durchlässigkeit zu kontrollieren und zwei unterschiedliche Milieus luminal und adluminal aufrecht zu halten.

Des Weiteren sind Occludenskontakte essentiell, um die Polarität eines Epithels im Sinne einer Zaun-Funktion zu ermöglichen. So verhindern sie als

Einleitung

intramembranäre Diffusionsbarriere eine willkürliche Verlagerung der apikal gelegenen Proteine nach basolateral und umgekehrt (Cereijido et al., 2008).

Occludenskontakte bestehen prinzipiell aus zwei Typen von Transmembranproteinen – Tetrapass und Monopass Transmembranproteine. Die Membran vierfach durchspannend, wobei ihr N- und C- Terminal Ende im Cytosol liegt, sind dabei Occludin und Claudine (Balda and Matter, 2008).

All diese Proteine sind dabei mit ihrem C-terminalem Ende über Adaptorproteine wie ZO 1-3, Cingulin und Afadin (AF-6) mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden (Mitic et al., 2000). Ihre Domänen ragen in den interzellularen Spalt und korrespondieren dort mit den Transmembranproteinen der Nachbarzelle.

Die Membran einfach durchspannend sind die sogenannten JAMs (Junctional Adhesion Molecules).

Im Allgemeinen kann man Occludenskontakte in ihrer Dichtigkeit unterscheiden. So kommen in der Niere, genauer im aufsteigenden Ast der Henleschleife, dichte Occludenskontakte vor. Im Darm beispielsweise kann dies erheblich variieren, so dass unter physiologischen Bedingungen Durchlässigkeiten von 4-20 Angström entstehen (Mitic and Anderson, 1998). Die Permeabilität ist in den Krypten üblicherweise höher als an der Spitze der Zotten.

Diese Variabilität der Permeabilität wird im Wesentlichen durch das 22 kilo Dalton (kDa) Protein Claudin (von lat. Claudere - verschließen) mit bis zu 27 bisher bekannten Isoformen bestimmt (Furuse and Tsukita, 2006; Saitou et al., 1998; Tsukita and Furuse, 1999). Im Magen-Darm-Trakt (MDT) sind bis heute acht verschiedene Claudin-Isotypen beschrieben. So kommen Claudin 1,2,3,4,7,15,18 und 20 vor (Heiskala et al., 2001). Ihre Funktion ist dabei unterschiedlich. So sind beispielsweise Claudin 1, 4, 5 dichte Claudine, da sie keinen oder nur kaum parazellularen Transport zulassen. Claudin 2 dagegen ist bekannt als porenbildendes Claudin, welches parazellularen Efflux von Wasser und Kationen begünstigt (Amasheh et al., 2002).

Welche Bedeutungen den Claudinen bei der Bildung der Occludenskontakte und darüber hinaus der Permeabilitätsbarriere und ihrer Steuerung im Darm zuteilwird, wird anhand einiger Beispiele klar, bei denen ihre Integrität gestört ist. So bindet das Enterotoxin des Bakteriums *Clostridium perfringens* mit seinem C-terminalem Ende an Claudin 3 und bildet dadurch Poren aus, was zu den klassischen Symptomen einer Lebensmittelvergiftung mit abdominellen Schmerzen und Diarrhö führt (Fujita et al., 2000; Horiguchi et al., 1987).

Des Weiteren führen Knockoutmutationen bei Mäusen im Gen für Claudin 5 (Nitta et al., 2003) oder Claudin 1 (Furuse et al., 2002) wenige Stunden nach ihrer Geburt zum Tod. Claudin 2 wiederum scheint eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der CED zu spielen. So kommt es in Untersuchungen von Patientenproben zu einer Steigerung der Expression des porenbildenden Proteins sowie zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals des Proteins an den Zellgrenzen (Spindler et al., 2015).

Das 65 kDa große Transmembranprotein Occludin wurde als erstes in Occludenskontakten entdeckt (Furuse et al., 1993). Trotz dieser frühzeitigen Entdeckung ist bis heute wenig über die Funktion von Occludin im Hinblick auf die Darmbarriere bekannt. So können sich Occludin defiziente embryonale Stammzellen zu polarisierten Epithelien mit intakten Occludenskontakten differenzieren (Saitou et al., 1998). Bei Occludin-Knockout Mäusen, also Mäusen ohne funktionierendes Occludin-Gen, bilden sich morphologisch und funktional vom gesunden Korrelat nicht zu unterscheidende Occludenskontakte aus. Sogar der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) ist normal (Saitou et al., 2000). Allerdings besitzen solche Mäuse einen auffallenden Phänotyp. So sind Männchen infertil, Weibchen zwar fertil, aber nicht in der Lage, ihre Jungen zu stillen. Die pars compacta der großen Röhrenknochen ist deutlich in ihrer Dicke reduziert und die Tiere leiden an einer chronischen Magenentzündung mit einer Hyperplasie des Magenepithels (Saitou et al., 2000). So scheint Occludin ein wichtiger Regulator der Darmbarriere und anderen Mechanismen zu sein, dessen Funktionsweise noch nicht abschließend geklärt ist.

Weitere transmembranöse Proteine sind die oben erwähnten 36-41 kDa großen JAMs mit den Arten: JAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM-4 und JAM-like (Bazzoni,

2003). Die JAMs besitzen zwei, dem Immunglobulin G (IgG) ähnliche, extrazelluläre Domänen, sie durchspannen die Zellmembran einmal und besitzen somit nur ein intramembranäres Segment mit angeschlossenen kurzen zytosplasmatischen Anteil (Kostrewa et al., 2001; Martin-Padura et al., 1998).

Im intestinalen Epithel wie in Epithelien im Allgemeinen besitzen JAMs adhäsive Funktionen. Des Weiteren aber wirken sie regulatorisch auf die Barrierfunktion der Zonula occludens (Liu et al., 2000). Sie haben auch Auswirkung auf entzündliche Prozesse, was eindrücklich gezeigt wird in JAM-defizienten Mäusen welche zu einer schweren chronischen Darmentzündung neigen (Laukoetter et al., 2007). Neben Epithelien kommt JAM-A auch auf Thrombozyten, Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Dendritischen Zellen, Lymphozyten, Thrombozyten und Spermatozoen vor (Shao et al., 2008; Williams et al., 1999). Diese große Varianz ihres Auftretens unterstreicht einmal mehr ihre große Wirkbreite und Wichtigkeit.

Alle oben genannten Transmembranproteine bedürfen einer Befestigung ihrer selbst, um eine Barrierefunktion übernehmen zu können. Dafür binden sie an das Aktinzytoskelett der Zelle (Madara, 1987). Diese Bindung wird dabei wie weiter oben erwähnt über sogenannte Adaptorproteine vermittelt. Die am besten untersuchten Adaptorproteine sind dabei ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Mitic and Anderson, 1998). Diese Proteine gehören der Familie der Membran-assoziierten-Guanylat-Kinasen (MAGUK) an (Fanning et al., 1996; Haskins et al., 1998). Sie binden mit ihrer PDZ-Domäne an das C-terminale-Ende der Transmembranproteine und selbst wiederum mit ihrem eigenen C-terminalen-Ende an das Aktinzytoskelett (Itoh et al., 1999). Somit stellen sie eine mechanische Verbindung zwischen Transmembranproteinen und der Zelle her. Ihre Funktion scheint essentiell für den Erhalt sowie die Funktion der Occludenskontakte und damit der Permeabilitätsregulation und Zellpolarität zu sein. So kommt es bei Mäusen mit einer Knockoutmutation für ZO-1 sowie ZO-2 zu einem embryonalen Tod (Hunziker et al., 2009; Katsuno et al., 2008). Interessanterweise sind allerdings ZO-3-defiziente Mäuse voll überlebensfähig, zeigen einen normalen Phänotyp und normal funktionsfähige Occludenskontakte (Adachi et al., 2006).

1.3.2.2 Adhaerenskontakte

Adhaerenskontakte sind in einem Schlussleistenkontakt direkt unterhalb von Occludenskontakten angeordnet. Sie können neben ihrer Hauptaufgabe, einer mechanischen Adhäsion der Zellen aneinander, viele zelluläre Signalwege modulieren (Perrais et al., 2007).

Die Ultrastruktur der Zonula Adhaerens ist charakterisiert durch einen interzellulären Spalt mit einer Breite von ca. 200 Angström, einer klaren Parallelisierung der benachbarten Zellmembranen über eine Strecke von 0.2-0.5 μm sowie dichten Plaque-ähnlichen submembranösen Strukturen (Farquhar and Palade, 1963).

Anhand dieser Ultrastruktur kann man ableiten, dass für den Aufbau der Adhaerenskontakte drei Klassen von Proteinen benötigt werden. Die Transmembranproteine, welche den interzellulären Spalt überspannen und die Adhäsion herstellen, vom Cadherin- und Nectin- Typ. Ein zytoskelettales Netzwerk, welches als mechanische Absicherung dient, wie das Aktinzytoskelett. Plaque-Proteine, welche die Verbindung zwischen Transmembranproteinen und Zytoskelett herstellen, wie Catenin und Afadin (Niessen and Gottardi, 2008).

Vereinfacht kann man dabei Adhaerenskontakte in ihrer Struktur in 2 Protein-Komplexe trennen: Cadherin-Catenin- und Nectin-Afadin-Komplexe.

Cadherine wurden dabei in Adhaerensjunctionen zuerst gefunden. Sie sind 120kDa große Transmembranglykoproteine (Ozawa and Kemler, 1992). Sie durchspannen die Membran einmal und bilden die interzelluläre Adhäsion Calcium abhängig, indem sie mit ihrer Ektodomäne an Cadherine der Nachbarzelle binden. Ihre Expression ist Gewebeabhängig. So finden sich VE-Cadherine in Endothelien, N-Cadherine in Neuronen und E-Cadherine in Epithelien wieder. Mit ihrer Endodomäne, genauer der sogenannten Catenin-Binding-Domäne (CBD), binden Cadherine an Proteine der Armadillo-Familie. Die Armadillo-Familie beinhaltet dabei unter anderem die Catenin Unterformen α , β , γ (Plakoglobin) und p120 (Ozawa et al., 1989; Staddon et al., 1995). Dabei übernehmen die Catenine unterschiedliche Funktionen. β -Catenin gilt als Schutz der E-Cadherine vor Proteolyse und verbessert seinen Transport vom endoplasmatischen Retikulum an die Zellmembran (Chen et al., 1999; Huber et

al., 2001). Wichtiger für die Barriere jedoch ist die Verbindung von β und γ -Catenin an α -Catenin. Da α -Catenin als einziges Catenin eine Aktin-Bindungsstelle besitzt (Rimm et al., 1995) wird somit die strukturelle Absicherung der Adhaerensjunction an das Zytoskelett erzeugt.

Diese Absicherung ist allerdings kein starres Gerüst, wie man sich eine mechanische Absicherung im herkömmlichen Sinne vorstellt. Vielmehr ist α -Catenin ein allosterisches Protein, welches entweder F-Aktin oder β -Catenin bindet (Drees et al., 2005) und somit eine flexible Verbindung, sowie die Möglichkeit der Aktin-Polymerisation schafft.

E-Cadherin bindet an p120 im Gegensatz zu anderen Cateninen nicht über CBDs, sondern über sogenannten Juxtamembranäre Domänen (JMD) (Anastasiadis and Reynolds, 2000). P120 wiederum bindet im Gegensatz zu α -Catenin nicht direkt an F-Aktin, sondern schafft über Interaktionen mit und Inhibition von Rho GTPasen eine Verstärkung der Aktinpolymerisation und moduliert darüber die Stärke der Zelladhäsion (Anastasiadis et al., 2000). Über die Bindung von E-Cadherin an p120 wiederum wird die Konzentration von E-Cadherin in der Membran reguliert, indem die Endozytose von E-Cadherin verhindert wird (Davis et al., 2003).

Nectin, mit seinen drei IgG ähnlichen extrazellulären Schleifen, ist ein Transmembranprotein aus der IgG-Superfamilie. Es bildet Calcium unabhängig Adhaerenskontakte über Homodimere aus und gehört zu einer Familie aus vier Mitgliedern. (Irie et al., 2004; Takai and Nakanishi, 2003). Alle Nectine besitzen an ihrer cytosolischen Seite, genauer am C-terminalen Ende, eine PDZ-Bindungsstelle, über welche sie mit dem Aktin bindenden Protein Afadin gekoppelt sind (Takahashi et al., 1999). Neben seiner Aktin bindenden Funktion kommen Afadin weitere wichtige Rollen zu. So geht man davon aus, dass es während der Embryonalzeit zur Bildung von Zell-Zell Kontakten und Zellpolarität und später zum Erhalt ebendieser beiträgt. Gezeigt werden kann dies daran,

dass Mäuse mit einer Knockout-Mutation für Afadin 11 Tage post coitum versterben (Zhadanov et al., 1999).

1.3.2.3 Desmosomen

Desmosomen sind interzelluläre Verbindungen, die starke Adhäsion zwischen Zellen erzeugen und als punktförmige Strukturen imponieren (Farquhar and Palade, 1963). Sie sorgen für eine mechanische Absicherung und Stabilität des Schlussleistenkomplexes, indem sie intrazellulär an Intermediärfilamente binden. Somit sind Desmosomen essentiell für Gewebe, welche starken mechanischen Kräften ausgesetzt sind. Beispielsweise die Epidermis, das Darmepithel und das Myokard (Garrod and Chidgey, 2008). Wenn diese desmosomale, und damit mechanische, Absicherung fehlt, kann es dazu kommen, dass solches Gewebe an Stabilität verliert und zerfällt. Zu sehen ist dieses Phänomen bei einigen autoimmunen und genetischen Krankheiten. Desmosomen fungieren allerdings nicht nur als Adhäsionsverbindung, sondern steuern und regulieren auch Zellproliferation und Differenzierung (Green and Simpson, 2007; Schlegel et al., 2020).

Ihr grundsätzlicher Aufbau setzt sich aus drei großen Proteinfamilien zusammen: Cadherine, Armadillo Proteine und Plaque-Proteine (Green and Simpson, 2007). Cadherine, also Calcium abhängige Bindungsproteine, sind dabei Desmocolline (Dsc) und Desmogleine (Dsg). Sie sind, den interzellulären Spalt überspannende, Transmembranproteine mit einem cytosolischen C-terminalen Ende und extrazellulärem N-terminalen Ende (Koch and Franke, 1994). Sie können dabei nicht nur homophil, also mit dem jeweilig korrespondierendem Dsg oder Dsc der Nachbarzelle, sondern auch heterophil binden (Waschke et al., 2005).

Insgesamt gibt es vier Desmogleine: Dsg 1,2,3,4 und drei Desmocolline: Dsc 1,2,3. Im menschlichen Darm kommen dabei Dsg 2 und Dsc 2 vor (Nava et al., 2007). Der Unterschied in der Funktion von Dsg und Dsc im Magen-Darm-Trakt ist noch nicht abschließend geklärt. Experimente haben aber gezeigt, dass Dsg 2 ein entscheidender Faktor für den Erhalt der Integrität der Darmbarriere ist (Schlegel et al., 2010). Für Dsc2 wurde gezeigt, dass es an der mukosalen

Wundheilung beteiligt ist (Flemming et al., 2020). Des Weiteren wird Dsg 2 nicht nur in Desmosomen exprimiert sondern ebenfalls auf der Zelloberfläche von Enterozyten (Ungewiß et al., 2017). Mit ihrem cytosolischen Ende binden die Cadherine an die Proteine der Armadillo-Familie Plakoglobin und Plakophilin (Huber, 2003), bilden Plaques aus und verankern sich so in der Zelle. Um dieses Gerüst der Desmosomen mechanisch abzustützen, werden diese Strukturen über das Plaque-Protein Desmoplakin an das Zytoskelett, genauer an Intermediärfilamente, verknüpft (Hatsell and Cowin, 2001).

Als Mitglied der Armadillo-Familie übernimmt α -Plakoglobin allerdings nicht nur adhäsive Aufgaben, sondern, wie β -Catenin, auch Funktionen in der Zell-Zell-Kommunikation (Aktary et al., 2017; Peifer et al., 1992).

Der Verlust der Funktion von Desmosomen wird eindrücklich bei einer Reihe von Erkrankungen aufgezeigt. Besonders gut erforscht ist dies in der Haut durch die Autoimmunerkrankungen Pemphigus foliaceus und vulgaris. Dabei kommt es durch Autoantikörper gegen Dsg 1 beziehungsweise Dsg 3 zur Blasen- und Krusten-Bildung der Haut und Schleimhäute mit der Folge von oberflächlichen Erosionen (Amagai et al., 1995; Buxton et al., 1993; Heupel et al., 2008; Stanley et al., 1982). Allerdings ist dies bei Pemphigus foliaceus nach neuestem Forschungsstand kein sterischer Prozess zwischen Antikörper und Dsg 1, sondern fußt auf einer Modulation von intrazellulären Signalwegen (Waschke et al., 2005). Der Bedeutung von Dsg 2 für die Darmbarriere wurde lange wenig Bedeutung zugemessen. Jedoch scheint der Verlust von Dsg 2, wie oben aufgeführt, die Barrierefunktion des Darms stark einzuschränken und sogar zu CED wie MC zu führen (Spindler et al., 2015). Der genaue Wirkmechanismus bleibt dabei nach wie vor ungeklärt.

1.4 Pathophysiologie des Morbus Crohn

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Patienten mit einem MC inkludiert wurden, wird im Folgenden nur auf diese Krankheit eingegangen.

Einleitung

MC ist von anderen CED durch sein Befallsmuster abzugrenzen. Im Rahmen einer Ileitis terminalis gilt das terminale Ileum dabei als Prädilektionsstelle der Erkrankung (Crohn et al., 1952). Der, für die Krankheit charakteristische, diskontinuierliche Befall des MDT macht es jedoch möglich, dass es an verschiedenen unterschiedlichen Stellen des MDT gleichzeitig zu Entzündungen kommt. Die Klinik des MC manifestiert sich vor allem durch chronisch-rezidivierende Abdominalschmerzen und blutig-schleimige Durchfälle. In ca. 35% der Fälle kommen zu diesen Leitsymptomen extraintestinale Symptome der Haut (z.B.: Erythema nodosum), Augen (z.B.: Uveitis) und Gelenke (z.B.: Arthritis) hinzu (Herold, 2017). Die Inzidenz von CED lag 2008 bei 11 pro 100.000 Einwohner, für MC im speziellen bei 6,6 pro 100.000 Einwohner. Der Erkrankungsgipfel liegt dabei bei einem Alter von 16-24 Jahren (Ott et al., 2008), somit beginnt die Krankheit für viele früh und begleitet sie lange durch ihr Leben.

Die Klinik des MC ist erklärbar durch die transmurale Entzündung des MDT. Es bilden sich histologisch Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen, welche den gesamten histologischen Wandaufbau des MDT durchspannen.



Abbildung 4: Histologie des Morbus Crohn

Die Abbildung zeigt eine H.E.-Färbung eines Längsschnittes durch das terminale Ileum eines Patienten mit Morbus Crohn in 4facher Vergrößerung. Zu sehen ist die deutliche Krypten- und Zotten- Architekturstörung sowie vereinzelte mehrkernige Riesenzellen und Epitheloidzellgranulome. (H.E.-Färbung und Abbildung: Jonas Salm)

Je nach Stärke der Entzündung kann es dabei zu Ulzerationen bis hin zu kompletten Wanddurchbrüchen kommen. Folge dieser Wanddurchbrüche und Ulzerationen können Fistel-, Striktur- und Stenosen- Bildung sein. Diese müssen dann operativ behandelt werden (Crohn et al., 1952). Wichtig bei dergleichen Operationen ist, dass der Patient, im Gegensatz zu CU-Patienten, nicht von einer radikalen Operation profitiert und intraoperativ somit möglichst kleinflächig reseziert werden muss.

Trotz intensiver Forschung wurde die Pathogenese des MC noch nicht abschließend geklärt. Viele unterschiedliche Ansätze versuchen die Pathophysiologie zu erklären. Aufgrund bekannter genetischer Einflüsse sowie Umweltfaktoren wird die Entstehung heute als multifaktoriell angesehen (Geremia et al., 2014). So passt auf der einen Seite die starke familiäre Häufung,

mit einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos bei Geschwistern von betroffenen um das 30fache, sowie auf der anderen eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos bei einer biallelen Mutation im Nucleotid Oligomerisation Domain 2 Gen (NOD2-Gen) um 42% (Adler et al., 2011; Hampe et al., 2002) zu der Theorie einer genetischen Prädisposition und Überaktivierung des angeborenen Immunsystems. Auf der anderen Seite spielt das adaptive Immunsystem mit T-Helfer-Zellen (TH1 und TH2-Zellen) und anderen T-Zellen, wie den TH17 und Regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}), im Sinne einer Überaktivierung, eine große Rolle (Geremia et al., 2014). Viel spricht dafür, dass diese Veränderungen in der Immunreaktion über einen erhöhten Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen, wie $TNF-\alpha$, zu einem Zusammenbruch der Darmbarriere führt (Bruewer et al., 2003; Sanders, 2005). Trotz all dieser unterschiedlichen Ansätze ist der Untergang der Darmbarriere das Bindeglied und ein Schlüsselfaktor der fortlaufenden Entzündung und somit essentiell für das Verständnis der Pathogenese (Gassler et al., 2001; Jäger et al., 2013; Spindler et al., 2015).

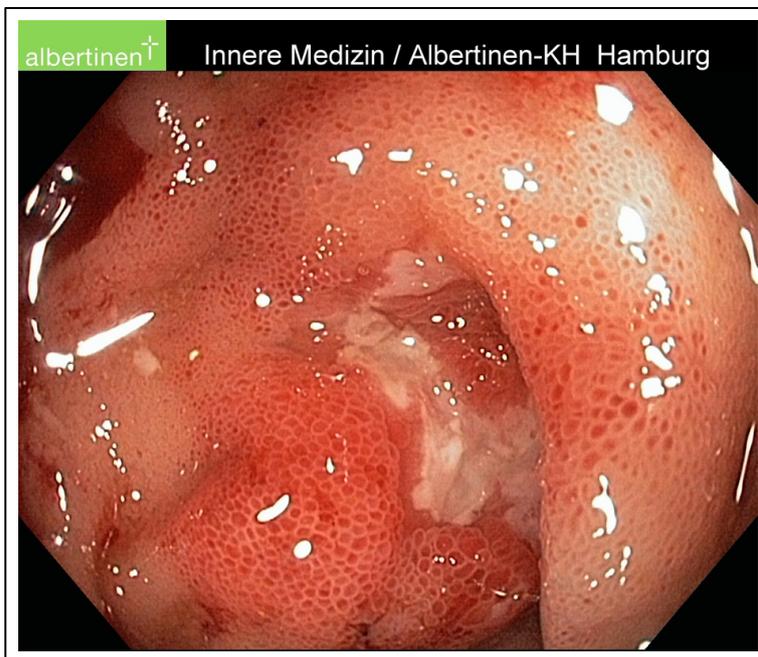


Abbildung 5: Endoskopie-Befund Morbus Crohn

Die Abbildung zeigt das endoskopische Bild des terminalen Ileums eines Patienten mit Morbus Crohn. Deutlich zu sehen ist die erythematös veränderte Schleimhaut sowie weißliche/hell-gelbliche Fibrinbeläge über Ulzerationen als Ausdruck einer chronischen Entzündung bei ausgeprägter Barriestörung.

(Mit freundlicher Genehmigung des Albertinen Krankenhauses Hamburg)

1.4.1 Veränderungen der Darmbarriere vor dem Hintergrund einer CED

Der Verlust der Integrität der Darmbarriere bei Patienten, die an einer CED leiden, ist auf eine Reihe von Veränderungen des Expressionsmusters von Junctionalproteinen zurückzuführen. Veränderungen im Expressionsmuster können dabei Hoch- sowie Herunter-Regulation einzelner Proteine bedeuten und sich in nahezu allen Bestandteilen des Schlussleistenkomplexes auf unterschiedliche Art und Weise manifestieren.

So durchlaufen Occludenskongakte, welche abdichtende Elemente der Darmbarriere sein können, bei einer CED komplexe Änderungen. Die Daten zu Claudin 1 sind dabei kontrovers. Es wurden Steigerungen wie Senkungen der Expression beschrieben (Poritz et al., 2011; Spindler et al., 2015; Weber et al., 2008). Des Weiteren kommt es bei Patienten auch zu einer Steigerung der Expression des Poren-bildenden Claudins Claudin 2 (Heller et al., 2005). Bei beiden Proteinen ist noch nicht abschließend geklärt, ob ihre quantitative Steigerung zu einem Progress der Erkrankung führt oder eine Anpassung des Gewebes, im Rahmen des Erhalts der Homöostase, auf eine Entzündung ist (Turner, 2009). Die restlichen Claudine wie Claudin 4 (Prasad et al., 2005) und Claudin 5 (Zeissig et al., 2007) zeigen eine Senkung der Expression. Einzig Occludin durchläuft keine Änderungen während einer chronischen Entzündung des Darms (Weber et al., 2008).

Die Veränderungen der Adhaerens-Kongakte ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Dabei ist noch nicht klar, welche Rolle Adhaerens-Kongakte bei einer CED spielen und welche Art von Expressionsveränderung vorliegen. Tatsache ist, dass ein Verlust von Adhaerens-Kongakten zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität mit starker Diarrhoe führt. So kommt es bei einer gezielten Tamoxifen induzierten Deletion von E-Cadherin in Dünndärmen von Mäusen zu starken teils blutigen Durchfällen, welche innerhalb von 6 Tagen zum Tod der Maus führen (Schneider et al., 2010). Dieser Verlust von E-Cadherin an den Zellgrenzen ist ebenfalls bei Patienten mit CED zu beobachten. Wobei nicht abschließend geklärt ist, ob es ein der chronischen Entzündung vorausgehender

oder durch die Entzündung bedingter Prozess ist (Gassler et al., 2001; Karayiannakis et al., 1998).

Desmosomen wurden lange Zeit nur als stabilitätserhaltendes Element der Darmbarriere angesehen und ihr Anteil und ihre Rolle im Erhalt oder sogar Erzeugung der chronischen Inflammation unterschätzt. Allerdings wurde gezeigt, dass Dsg 2 ein essentieller Bestandteil der Darmbarriere ist. So kommt es bei einer Deletion von Dsg 2 an den Zellgrenzen von CaCo2 Monolayer Zellkulturen zu einem deutlichen Zusammenbruch der Darmbarriere im Sinne einer Erhöhung des parazellulären Stoffaustausches und einem sinken der Transepithelialen Resistenz (TER). Durch eine Deletion von Dsg 2 kam es allerdings nicht nur zu den oben beschriebenen Prozessen, sondern des Weiteren auch zu einer Reduktion von Claudin 1, 4, 5 und Occludin der Occludenskontakte, nicht jedoch zu einer Änderung von E-Cadherin. Dieses Phänomen lässt darauf schließen, dass Dsg 2 den Zusammenhalt und die Integrität nicht nur der desmosomalen Kontakte des Magen-Darm-Traktes sondern auch seiner Occludenskontakte reguliert (Schlegel et al., 2010). Dsg 2 ist in Patienten mit CED deutlich in seiner Expression reduziert und die Permeabilität der Darmbarriere dadurch stark erhöht. In Zellkulturen wie der CaCo2 Zelllinie wurde mit Hilfe des auch in vivo an der Pathogenese einer CED beteiligten Zytokins TNF- α ebenfalls eine Reduktion von Dsg 2 beobachtet. Darüber hinaus wurden auch die oben beschriebenen Veränderungen der Occludenskontakte, vor allem die Reduktion von Claudin 1 und eine Steigerung der Expression von Claudin 2, beobachtet (Spindler et al., 2015). Diese Veränderungen der Occludenskontakte scheint dabei stark von Änderungen der Dsg 2 Quantität abhängig zu sein. So hob eine Stabilisierung der Dsg 2 Bindung durch ein Tandem Peptid ebenso wie eine komplette Inhibition der Funktion von Dsg 2 die oben genannten Effekte auf Claudin 1 und 2 auf und die Integrität der Darmbarriere wurde trotz TNF- α Stimulation gewahrt (Spindler et al., 2015).

1.5 Modelle der Darmbarriere und Chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Gute Modelle des Magen-Darm-Traktes mitsamt seinen Eigenschaften bezüglich Barriere Funktion und Transport sind essentiell zur Erforschung und Testung von Medikamenten, Krankheiten und Auswirkung von Umwelteinflüssen. In Bezug auf die Untersuchung von Barriereveränderungen bei Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist darüber hinaus ein Modell nötig, dass die Pathophysiologie der zu untersuchenden Erkrankung möglichst genau widerspiegelt. Tiermodelle galten dabei lange als Goldstandard und werden auch heute noch für viele Versuche benutzt und benötigt. Neben den hohen Kosten und dem großen Aufwand, welcher mit der Forschung an Tieren verbunden ist, ist die Validität dieses Modells aufgrund der mitunter schweren Vergleichbarkeit von tierischer und menschlicher Physiologie jedoch eingeschränkt. Aufgrund dessen haben sich immer mehr sogenannter in vitro Modelle zur Erforschung der Darmbarriere etabliert. In vitro heißt dabei, dass Zellen aus dem menschlichen Organismus extrahiert und in einer künstlichen Umgebung zum Wachstum stimuliert werden. Zunächst wurden hierfür bei der Erforschung der Darmbarriere vor allem Zelllinien benutzt, welche aus Tumorgewebe, genauer aus Adenokarzinomen des Darms, stammen, somit immortal sind, schnell wachsen und komplexe Vorgänge an einem einfachen und günstigen Modell darstellen. Diese Zelllinien haben jedoch, unter anderem gerade aufgrund ihrer Immortalität, in ihrer Darstellung deutliche Limitationen und Ungenauigkeiten im Vergleich zur Situation in vivo. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Modelle entwickelt, welche aus Primärzellen, also Zellen aus intaktem menschlichem Gewebe, gezüchtet werden. Solch ein neues Modell stellte 2009 das Forscherteam um Johannes Carolus Clevers erstmals in Form von Organoiden vor (Sato et al., 2009).

1.5.1 Tiermodelle

Oft benutzte Tiermodelle stellen Ratten und Mäuse dar. Viele neue Ansätze in der Medizin müssen und werden zunächst erst in Tiermodellen getestet. So sind Ratten laut der OECD Richtlinie 417 das empfohlene Standard Tier zu Testung

der Toxikokinetik von Chemikalien (OECD, 2010). Die Ergebnisse dieser Tierversuche bedürfen jedoch immer einer Anpassung an den menschlichen Organismus und seinen Gegebenheiten. Sind solche Anpassungen aufgrund fehlender klinischer Daten nicht möglich, verliert ein Tierversuch an Aussagekraft. Neben den ethischen und moralischen Bedenken spielen auch Kosten und Zeitaufwand bei der Forschung an Tieren eine große Rolle. All diese Gründe führen dazu, bessere Alternativen als Tiere zur Erforschung von Physiologie und Pathologie des Menschen zu entwickeln.

1.5.1.1 Chemisch induzierte Kolitis Modelle

Zu den am häufigsten benutzten Tiermodelle einer CED in Nagetieren zählen das sogenannte DSS- sowie TNBS-Modell. Diese beiden Modelle lassen sich als Übergruppe den chemisch induzierten Koliden zuordnen (Antoniou et al., 2016). Das von Morris et al. 1989 erstbeschriebene TNBS-Modell fußt auf einer rektalen Applikation von Ethanol kombiniert mit 2,4,6-trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) in unterschiedlichen Konzentrationen (Morris et al., 1989). Dies führt mit hoher Verlässlichkeit und geringen Kosten innerhalb von 1-3 Tagen zu einer Kolitis mit Lokalisation im distalen Kolon (Morampudi et al., 2014). Klinisch manifestiert sich eine akute Kolitis mit inkonsistentem Stuhlgang und teils blutigem Durchfall. Die Pathogenese beruht auf einer TH1-Zell vermittelten Immunantwort mit Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , IL-12 und IL-17. Darüber hinaus ist sie jedoch nicht gleichzustellen mit der Ätiopathogenese des MC (Antoniou et al., 2016).

Das von Okayasu et al. 1990 erstbeschriebene DSS-Modell hingegen fußt auf einer Applikation von Dextran-Natriumsulfat (DSS) oral über das Trinkwasser (Okayasu et al., 1990). Je nach Konzentration des DSS ist es hierbei möglich zwischen einer akuten und chronischen Kolitis zu variieren.

Die Pathogenese dieser Kolitis verbleibt ebenfalls unklar, ist jedoch vor allem ein Produkt der chemisch induzierten Schädigung des Darmepithels und der damit verbundenen Möglichkeit eines unselektiven Transports proinflammatorischer Inhalte des MDT von luminal nach adluminal (Chassaing et al., 2014). Das DSS-Modell zeichnet sich darüber hinaus, ähnlich wie das TNBS-Modell, durch seine Einfachheit und Kostengünstigkeit aus.

Beide Modelle besitzen jedoch natürliche Limitationen in ihrer Anwendbarkeit zur Erforschung der Pathogenese von CED. TNBS induzierte Kolitiden beruhen auf einer rein immunvermittelten Pathogenese und berücksichtigen dadurch nicht die multifaktorielle Entstehung der CED (Antoniou et al., 2016). DSS induzierte Kolitiden hingegen beruhen auf einer rein chemisch-mechanischen Schädigung des Epithels. Besonders deutlich wird dies dadurch, dass T- und B-Zellen in diesem Modell, im Gegensatz zur Situation im Menschen, nicht notwendig zur Entstehung einer Kolitis sind (Chassaing et al., 2014). Des Weiteren sind bei DSS-induzierten Kolitiden diese stark abhängig von der mikrobiellen Darmbesiedelung des jeweiligen Tieres (Oh et al., 2014).

1.5.2 Zellkulturen

Zellkultur-Modelle sind beliebte Modelle im Hinblick auf die Funktion des Magen-Darm-Traktes. Isolierte humane intestinale Epithelzellen in Kultur zu halten ist dabei ein sehr teurer und schwieriger Prozess. Als günstige und einfache Alternative wurden hierfür Zelllinien aus Adenokarzinomen des humanen Colons, wie die von Jorgen Fogh kultivierten CaCo2 und HT-29 Zelllinien sowie die T84 und HCT116 Zelllinie etabliert. Im Gegensatz zu den CaCo2 und HT29 Linien ist die T84 Zelllinie dabei nicht aus dem Primärtumor gewonnen, sondern aus Lungenmetastasen eines Kolorektalen Karzinoms extrahiert worden (Devriese et al., 2017).

Zelllinien haben nun unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Bildung von sogenannten epithelialen Monolayer sowie in ihrer Fähigkeit zur korrekten Abbildung der Barriere Eigenschaften des Darms. So wachsen CaCo2 und T84 Zellen in Kultur ohne Zusatz oder Entnahme von Stoffen der konventionellen Medien in Form eines Monolayer (Devriese et al., 2017). CaCo2 Zellen entwickeln und differenzieren sich somit spontan in einen Monolayer aus polarisierten Enterozyten. Nach 2-3 Wochen Wachstum besitzt dieser Monolayer des Weiteren voll entwickelte Zell-Zell Verbindungen und somit einen intakten Schlussleistenkomplex (Rousset, 1986). HT-29 Zellen hingegen wachsen nur unter Ausschluss von Glucose zu einem differenzierten und

polarisierten Monolayer heran (Zweibaum et al., 1985), wobei ihr Wachstum und das Erreichen von Konfluenz wesentlich länger dauert im Vergleich zu CaCo2 oder T84 Zellen (Rousset, 1986). T84 bilden ebenfalls einen komplett intakten Monolayer unter Ausbildung eines Schlussleistenkomplexes aus. Des Weiteren bilden und sezernieren diese Zellen allerdings noch Muzin, wodurch sie die Situation, wie sie in vivo vorherrscht, besser darstellen als vergleichbare Zellmodelle (Devriese et al., 2017). Eine weitere Besonderheit der T84 Zellen ist ihre Beeinflussbarkeit durch das angeborene Immunsystem (Ou et al., 2009).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften besitzen diese Zelllinien verschiedene Einsatzgebiete in der Forschung. Im Falle von CED und der in den Vordergrund gerückten Erforschung der Veränderungen der Barriere Eigenschaften wurden vor allem die genannten CaCo2, T84, HT-29 und HCT116 Zelllinien verwendet (Meir et al., 2015; Schlegel et al., 2010; Spindler et al., 2015). Trotz ihrer vielen, vor allem durch ihre leichte Handhabung und ihre Kosteneffizienz generierten Vorteile weisen diese Zellkulturmodelle einige Limitationen im Hinblick auf den Vergleich zur in vivo Situation auf.

Zellkulturmodelle, welche auf Tumorzellen beruhen, bilden zweidimensionale polarisierte Epithelien aus. Durch diese Zweidimensionalität geht im Vergleich zur Situation in vivo und ihrer Dreidimensionalität Information verloren. Des Weiteren zeigen CaCo2 Zellen eine unüblich starke Zellverbindung durch Occludenskontakte auf. Dies zeigt sich in Messungen des TEER, welcher bei CaCo2 Zelleverbänden größer als $300 \Omega\text{cm}^2$ ist (Rousset, 1986), wohingegen der durchschnittliche TEER im Dünndarm im Mittel $40 \Omega\text{cm}^2$ beträgt (Sjöberg et al., 2013). Diese erhöhten TEER-Werte zeigen sich auch in T84, und zeigen uns die schwere Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen dieser Modelle mit der tatsächlichen Situation in vivo auf.

Die größte Problematik in ihrer Validität als physiologisches Modell ergibt sich jedoch aus ihrem kanzerogenen Hintergrund (Balimane and Chong, 2005). Alle genannten und bekannten Zelllinien zur Erforschung der Darmbarriere stammen aus Tumorzellen. Durch unterschiedliche Mutationen besitzen sie unter anderem die Fähigkeit zur ungebremsten Proliferation (Shay et al., 1991) im Sinne einer

Immortalisierung, sowie die Fähigkeit zur Metastasierung. Durch diese Veränderungen ist ihre Vergleichbarkeit mit der menschlichen Physiologie im gesunden reduziert. Artificielle Gründe für beobachtetes Verhalten der Zellkultur und daraus gewonnener Rückschlüsse auf die Situation in vivo sind nie auszuschließen.

1.5.3 Primärzell-Modell in Form von Enteroiden

Um ein möglichst exaktes physiologisches Modell des Magen-Darmtraktes zu generieren, sind Modelle aus Primärzellen des menschlichen Körpers optimal geeignet. Jedoch wurde schon 1965 postuliert, dass es nicht möglich ist, Langzeitkulturen aus Primärzellen, ohne Induktion einer genetischen Mutation zu erzeugen (Hayflick, 1965). Dieser Missstand wurde erst 2009 durch Johannes Carolus Clevers und sein Forscherteam beseitigt. Durch ihre Forschungsarbeit gelang es, durch aus dem Kryptengrund des menschlichen Dünndarms isolierte Lgr5+ Stammzellen mittels Wachstumsfaktoren eine Krypt-Villus Struktur zu erzeugen, welche alle epithelialen Zelllinien generiert (Sato et al., 2009). Diese Struktur wurde Organoid genannt. Durch ihren Stammzellursprung stellen sie eine Miniatur-Kopie des Dünndarms dar. Die sich stellende Frage nach der Exaktheit in ihrer Epithelabbildung wurde dabei von der Clevers-Gruppe durch in vitro gezüchtete Colon Organoide, welche einer Maus mit chemisch induzierter Mukosa-Schädigung per anum reinduziert wurden beantwortet. Durch die Applikation regenerierte sich das zerstörte Mukosa-Gewebe vollständig, wodurch gezeigt wurde, dass das durch Organoide in vitro gezüchtete Epithel dem des in vivo vorherrschenden Epithels gleicht (Yui et al., 2012).

Vor der Erzeugung von Organoiden als Modell stand die Frage nach dem Beweis von Stammzellen im Kryptengrund des Dünndarms. Die Mukosa des Dünndarms ist eines der sich am schnellsten regenerierenden Gewebe von Säugetieren und erneuert sie sich alle 5 Tage komplett (Sato and Clevers, 2013). Für diese Leistung bedarf es zum einen einer Stammzelle, welche die für die Erneuerung nötigen Zellen generiert und zum anderen einer engen Homöostase zwischen Zellerneuerung im Kryptengrund und Apoptose in den Villispitzen. Diese Stammzelle wurde mittels eines Marker Gens, dem Lgr5+, von dem später klar

wurde, dass es den Rezeptor für den Wachstumsfaktor R-Spondin darstellt (de Lau et al., 2011), von der Clevers Gruppe 2007 beweisend entdeckt (Barker et al., 2007). Diese Lgr5+ Stammzellen liegen dabei am Kryptengrund des Dünndarms und sind dort mit einer Anzahl von sechs bis sieben Zellen pro Krypte vorhanden (Bjerknes and Cheng, 1999). Außer im Dünndarm kommen Lgr5+ Stammzellen des Weiteren im Colon (Barker et al., 2007), Magen (Barker et al., 2010) und Haarfollikeln (Jaks et al., 2008) vor. Aus den entdeckten Lgr5+ Stammzellen des Dünndarms differenzieren sich dabei alle Zellen der Mukosa. Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrine Zellen migrieren während ihrer Differenzierung entlang der Krypt-Villus-Achse nach apikal, wohingegen die vierte sich differenzierende Zellreihe, die Paneth-Zellen, am Kryptengrund verbleiben und die Stammzellen dort einrahmen (Barker et al., 2007).

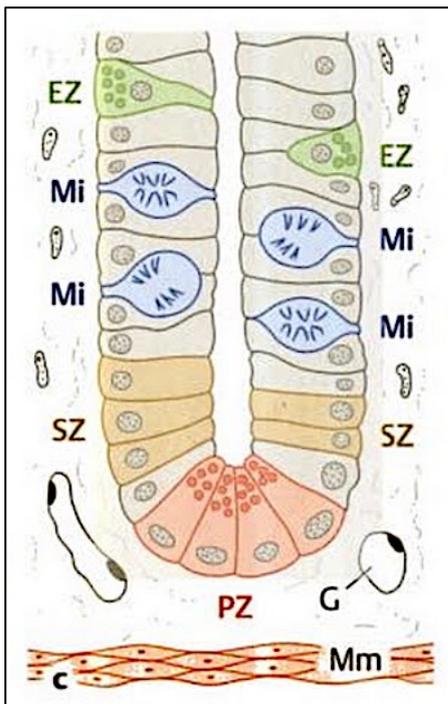


Abbildung 6: Der Kryptengrund

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer Krypte samt des Kryptengrundes. Zu sehen sind die Stammzellen sowie Paneth-Zellen am Grund. Alle Zellen der Mukosa differenzieren sich aus den Stammzellen des Kryptengrundes und migrieren während der Entwicklung nach apikal. **PZ** = Paneth-Zelle; **SZ** = Stammzelle; **Mi** = Mitosen; **EZ** = enteroendokrine Zellen; **G** = Blutgefäß; **Mm** = Muscularis mucosae. (Schema, mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag Stuttgart, aus „Taschenlehrbuch für Histologie“ von Renate Lüllmann-Rauch 3. Auflage 2009.)

Das Besondere der Lgr5+ Stammzellen ist dabei, dass sie in vitro ohne eine mesenchymale Nische Krypt-Villus-Strukturen ausbilden und sog. Mini-Därme (Organoide) formen, welche alle differenzierten Zelltypen beinhalten (Sato et al., 2009). Zur Stammzellexpansion und ihrer Wandlung in Organoid-Form werden unterschiedliche Wachstumsfaktoren benötigt, welche in vivo ebenfalls vorkommen und viel über die Physiologie der Erneuerung des Magen-Darmtraktes erklären. Benötigte Faktoren sind: Wnt, EGF (epidermal growth factor), Notch, und R-Spondin. EGF als bekannter Wachstumsfaktor bindet über seinen Rezeptor an die Zelle und stimuliert diese. Notch ist ebenfalls ein essentieller Differenzierungs- und Wachstums-Faktor, welcher aus Paneth-Zellen sezerniert wird. Ohne sein Zutun würden sich alle Stammzellen zu sekretorischen Zellen differenzieren (Es et al., 2005).

Wnt stellt den wichtigsten Faktor dar und ist die treibende Kraft hinter der Biologie der Krypten. So stabilisiert es β -catenin und aktiviert über den Transkriptionsfaktor Tcf4 ein genetisches Programm, welches den Erhalt und Aufbau der Stammzellnische unterstützt (Korinek et al., 1998). Paneth Zellen sind dabei auch hier in der Lage, neben ihrer Aufgabe der Sekretion von Defensinen, Lysozymen, Antimikrobiellen Peptiden und des oben genannten Notch und EGF, Wnt zu sezernieren und somit Stammzellen zu stimulieren. Dies zeigt, dass die Lgr5+ Stammzellen ihre eigene Nische über den Prozess der Differenzierung in Paneth Zellen erzeugen (Farin et al., 2012; Sato et al., 2011a). R-Spondin ist ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor. Er verstärkt das Wnt Signal und dient als Ligand an Lgr5+ (Carmon et al., 2012; de Lau et al., 2011). R-Spondin ist dabei ex- und in- vivo essentiell. In vivo kommt es bei einer Depletion von Lgr4 und -5, also den Rezeptoren von R-Spondin, zu einem Untergang der Krypten (de Lau et al., 2011; Mustata et al., 2011) wohingegen exogen hinzugefügtes R-Spondin eine Kryptenhyperplasie erzeugt (Kim et al., 2005; Sato and Clevers, 2013).

Diese Beobachtungen zu den unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und der erzeugten Stammzellnische lassen sich auch in vitro nachvollziehen. So bilden Lgr5+ Stammzell-Kulturen in Matrigel, einer Basalmembran imitierenden Laminin und kollagenreichen dreidimensionalen Matrix, Krypten aus. Diese vergrößern sich rapide aufgrund des Wnt-Gradienten. Dieser Gradient entsteht durch die

Akkumulation des von Paneth-Zellen sezernierten Wnts (Farin et al., 2012; Sato et al., 2011a). Wird nun R-Spondin und Wnt der Kultur hinzugefügt hebt sich der Gradient aufgrund der homologen Verstärkung des Wnt-Signals auf und aus den Krypten bilden sich kreisförmige symmetrische Organoide ohne eine Krypt-Villus Struktur aus (Sato et al., 2011a). Beobachtet man diese symmetrische Struktur nun über längere Zeit, bilden sich erneut Krypten ähnliche Zysten aus, welche am Ort des zufälligen Auftretens von Paneth-Zellen erzeugt werden (Sato and Clevers, 2013). Eindrücklich wird das Verhalten und der Nutzen von Paneth-Zellen und der durch sie erzeugten Wnt- und R-Spondin- Gradienten auch bei Adenomatosis Polyposis Coli (APC) -mutanten Zellen belegt. Diese Zellen bilden bereits ohne die exogene Zugabe von R-Spondin und Wnt kreisrunde Organoide aus, was durch die dauerhafte starke homologe Aktivierung des Wnt-Signalweges aufgrund des Verlustes des APC-Gen zu erklären ist (Sato and Clevers, 2013; Sato et al., 2011a).

Zur Generierung von Enteroiden aus Lgr5+ Stammzellen werden also neben einer mit Matrigel gefüllten Matrix die oben aufgeführten Wachstumsfaktoren EGF, Notch und R-Spondin benötigt. Zur Generierung von Colon-Krypten aus Lgr5+ Stammzellen wird des weiteren Wnt benötigt, da das Colon-Epithel keines bis kaum Wnt synthetisiert (Sato and Clevers, 2013). Durch neueste Forschungsergebnisse ist es auch möglich geworden, Organoide mittels dieser Wachstumsfaktoren aus pluripotenten, also embryonalen, Stammzellen zu generieren (Spence et al., 2011). Diese Organoide können dann im Gegensatz zu denen aus Lgr5+ Stammzellen, also organspezifischen adulten Stammzellen, gewonnenen Organoiden komplette Organe darstellen und wurden nach neuester Nomenklatur von Spence et al. intestinale Organoide genannt. Aus Lgr5+ Stammzellen gewonnene Modelle wurden hingegen intestinale Enteroide genannt (Spence, 2017). Diese Nomenklatur dient in der folgenden Arbeit als Vorlage und das untersuchte Modell wird somit folgerichtig Enteroid genannt. Morphologisch bilden die in vitro generierten Enteroide Zysten mit zentralem Lumen aus, welches von hochprismatischen Villus Epithelzellen umrahmt ist und nach außen zeigende Krypten-ähnliche Strukturen besitzt. Die basolaterale Seite der Zellen ist nach außen zum Matrigel hin orientiert, wohingegen der

Bürstensaum die luminale Oberfläche bildet. Paneth-Zellen und Becherzellen sezernieren ihre Stoffe ebenfalls ins Lumen der Enteroide (Sato and Clevers, 2013). Somit stellen Enteroide in der Tat kleine Duplikate des Epithels des MDT dar.

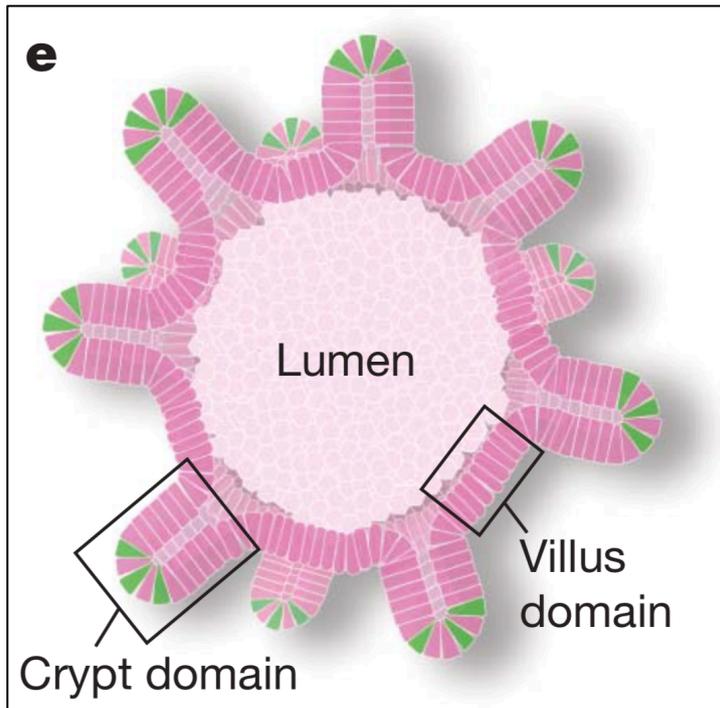


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Enteroids

Die Abbildung zeigt schematisch ein Enteroid. Man sieht den Aufbau aus Krypten und Villus mit einem zentralen Lumen. In grün sind die Stammzellen schematisch dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlages aus der Publikation von Sato et al. 2009 (Sato et al., 2009))

Das Modell der Enteroide ist nun für unterschiedliche Einsatzzwecke geeignet. Zu einen ist es ein optimales experimentelles Modell mit einer, im Hinblick auf die Morphologie, physiologischen und polarisierten Topologie und kann somit viele Zellkultur Ansätze ersetzen (Sato and Clevers, 2013). Im Einzelnen bleibt dabei herauszufinden, wie exakt sie die in vivo Vorgänge in vitro widerspiegeln und für welche Vorgänge sie ein geeignetes Modell darstellen. Zum anderen kann es als Krankheitsmodell bei Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes fungieren. So wurden intestinale Enteroide bereits aus Tumorpatienten (Sato et al., 2011b) und Patienten mit Cystischer Fibrose (Liu et al., 2012) generiert. Zu CED liegen solche Versuche nur vereinzelt vor. Insbesondere wurde nicht getestet, ob

Enteroide die aus Patienten mit CED generiert wurden ein geeignetes Modell sein könnten Veränderungen der Darmepithelbarriere bei dieser Erkrankung nachzuvollziehen und näher zu untersuchen.

1.6 Fragestellung

Für die vorliegende Arbeit wurden systematisch Gewebeproben von Patienten mit und ohne MC gesammelt. Die Proben sollten zum einen für eine biochemische und morphologische Analyse intestinaler Junktionsproteine verwendet werden, zum anderen wurden aus einigen dieser Proben Enteroide generiert.

Ziel dieser Arbeit war es, im ersten Schritt, eine Charakterisierung der Veränderungen des Schlussleistenkomplexes bei Patienten mit MC im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorzunehmen. Im zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob Enteroide ein geeignetes Modell sein könnten, um Veränderungen der Junktionsproteine bei MC gezielt zu untersuchen. Folgende Fragen sollten anhand dieser Analysen beantwortet werden:

1. Lassen sich die, in der Literatur beschriebenen, Veränderungen der intestinalen Junktionsproteine in Bezug auf Veränderungen der Occludenskontakte, der Adhaerenskontakte und besonders der Desmosomen in einer weiteren Patientenkohorte mit MC bestätigen?
2. Korreliert das Ausmaß der Veränderungen der Junktionsproteine mit der Ausprägung der Entzündung?
3. Wie stellt sich die Expression der Junktionsproteine in, aus diesen Proben, generierten Enteroiden mit und ohne Vorhandensein von MC dar?
4. Sind Enteroide ein geeignetes Modell, um Veränderungen der Junktionsproteine zu untersuchen?

2. Material und Methoden

Die hier beschriebene Sammlung von Geweben wurde durch Chirurgen der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantation-, Gefäß- und Kinderchirurgie vorgenommen. Die Asservierung für die Analysen erfolgte durch Dr. Michael Meir. Die Generierung der Enteroide erfolgt durch die Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. Metzger vom Institut für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg.

Im Rahmen der Dissertation erfolgte die hier beschriebene eigenständige Aufarbeitung der Patientenproben (Färbungen, Western Blots, Analysen und Auswertung) und der Enteroide (Färbungen, Western Blots, Analysen und Auswertung).

2.1 Material

2.1.1 Sammlung humaner Gewebeproben

Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einwilligung für die Teilnahme an der Studie vor der Operation und die Genehmigung wurde durch die Ethik Kommission der Universität Würzburg erteilt (Antrag Nummer: 113/13, 46/11, 42/16). Es erfolgte die Sammlung von Gewebeproben von Patienten mit und ohne MC. Hierbei wurde nur Restgewebe, welches für die Diagnostik nicht benötigt wurde, verwendet. Die Indikation zur Operation ist in Abbildung 9 für jede Probe im Detail dargestellt. Bei Patienten mit MC wurden immer zwei Proben aus unterschiedlichen Orten gewonnen: Zum einem aus dem Zentrum der Resektion, welche makroskopisch entzündet erschien (Entzündung = +), zum anderen aus dem Resektionsrand, welcher makroskopisch nicht entzündet erschien (keine Entzündung = -).

Gewebeproben für Kontrollen aus Patienten ohne CED wurden aus Patienten, welche sich einer rechtsseitigen Hemikolektomie, aufgrund eines Karzinoms oder Polypenbefalls, unterziehen mussten, gewonnen. Bei einer rechtsseitigen Hemikolektomie ist es notwendig aufgrund der Vaskularisierung des Darms einen kleinen Teil des terminalen Ileums mit zu reseziieren.

2.1.1.1 Gewebeprozessierung

Wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt wurde das Gewebe wie folgt weiter prozessiert: Ein Teil des Gewebes wurde zunächst für 24 Stunden in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (4g Paraformaldehyd (Thermo Fisher, Waltham, USA) in 100 ml destillierten Wasser) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Für den zweiten Teil des Gewebes erfolgte eine mechanische Isolierung der Mukosa und deren sofortiges Einfrieren in Flüssigstickstoff und Lagerung bis zur Aufarbeitung bei -80°C.

Der dritte Teil des entnommenen Gewebes wurde in kaltem PBS umgehend in das Institut für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg verbracht, um daraus Enteroide zu generieren.

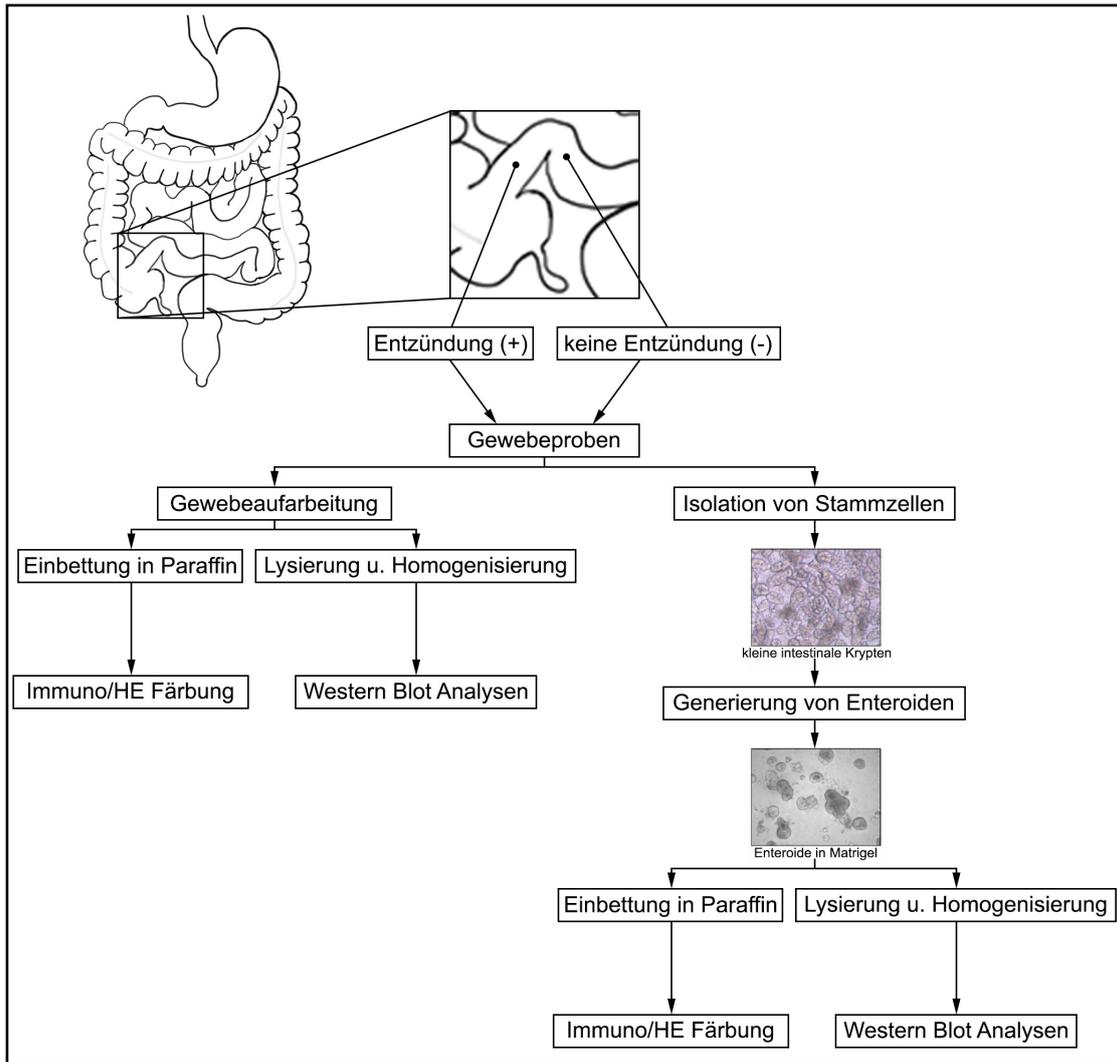


Abbildung 8: Gewinnung und Verarbeitung von Gewebeproben und Enteroiden

Schema der Gewinnung und Verarbeitung von Gewebeproben und Enteroiden. Alle so gewonnen Proben wurden nach den untenstehenden Methoden analysiert. Enterotide wurden dabei von Stammzellen aus Krypten der gleichen Proben generiert. Die Proben der Kontrollen wurden nach dem identischen Schema bearbeitet. (Bilder der Organoid-Generierung mit freundlicher Genehmigung von Schweinlin et al. 2016, Abbildung von Jonas Salm)

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

Tabelle 1 gibt Ausschluss über alle verwendeten Primärantikörper und ihre Hersteller. Des Weiteren sind ihr die Konzentrationen, in welchen sie für Western Blots und Immunfloreszenzen verwendet wurden, zu entnehmen.

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper

| Antikörper | Konzentration | | Hersteller und Bestellnummer | | |
|--|----------------------|------|--|-------------------|--------------------------------|
| | WB | IF | | | |
| Dsg 2 (Maus, monoklonal) | 1:1000 | 1:50 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts, USA | Thermo Fischer | Waltham, Massachusetts, USA |
| | | | Bestell-Nr.: 32-6100 | | |
| Dsc 2 (Kaninchen, polyklonal) | 1:500 | | Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, | | |
| | | | Bestell-Nr.: ab95967 | | |
| Dsc 2/3 (Maus, monoklonal) | | 1:30 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts USA | Thermo Fischer | Waltham, Massachusetts USA |
| | | | Bestell-Nr.: 32-62000 | | |
| Dsc 2 (Kaninchen, polyklonal) | | 1:50 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts, USA | Thermo Fischer | Waltham, Massachusetts, USA |
| | | | Bestell-Nr.: PA5-21986 | | |
| Claudin 1 (Kaninchen, polyklonal) | 1:500 | 1:50 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts USA | Thermo Fischer | Waltham, Massachusetts USA |
| | | | Bestell-Nr.: 51-9000 | | |

Material und Methoden

| Antikörper | Konzentration | | Hersteller und Bestellnummer | | |
|--|----------------------|-------|---|------------------------|----------------------------|
| | WB | IF | | | |
| Claudin 2 (Maus, monoklonal) | 1:500 | 1:50 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts Bestell-Nr.: 32-5600 | Thermo | Fischer Waltham, USA |
| Claudin 4 (Maus, monoklonal) | 1:500 | 1:50 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts Bestell-Nr.: 32-9400 | Thermo | Fischer Waltham, USA |
| Claudin 5 (Kaninchen, polyklonal) | 1:500 | 1:50 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts Bestell-Nr.: 34-1600 | Thermo | Fischer Waltham, USA |
| E-Cadherin (Maus, monoklonal) | 1:1000 | 1:100 | Becton, Company, Franklin Lakes, Bestell-Nr.: 610182 | Dickinson BD USA | and Bioscience, USA |
| Plakoglobin (Maus, monoklonal) | 1:250 | 1:40 | Progen Heidelberg D Bestell-Nr.: 61005 | Biotechnik | GmbH, |
| Occludin (Kaninchen, polyklonal) | 1:500 | 1:100 | Invitrogen, Scientific, Massachusetts Bestell-Nr.: 71-1500 | Thermo | Fischer Waltham, USA |
| β-Aktin (POX-gek.) | 1:5000 | | Sigma-Aldrich, Missouri, USA | St. | Louis, |

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2 gib Ausschluss über alle verwendeten Sekundärantikörper und ihre Hersteller. Des Weiteren sind ihr die Konzentrationen, in welchen sie für Western Blots und Immunfloreszenzen verwendet wurden, zu entnehmen.

Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper

| Antikörper | Konzentration | | Hersteller und Bestellnummer |
|---|---------------|-------|---|
| | WB | IF | |
| Ziege gegen Maus (gam, POX-gek.) | 1:3000 | | Dianova, Hamburg, Bestell-Nr.: 115-035-003 |
| Ziege gegen Maus (gam, Cy3-gek.) | | 1:600 | Dianova, Hamburg Bestell-Nr.: 115-165-003 |
| Ziege gegen Kaninchen (garb, POX-gek.) | 1:3000 | | Dianova, Hamnurg Bestell-Nr.: 111-035-003 |
| Esel gegen Kaninchen, (darb, Alexa Fluor 488 gek.) | | 1:200 | Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts USA Bestell-Nr.: A-21206 |

2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

2.1.3.1 DAPI

Zur Visualisierung der DNA in Zellkernen wird in der Fluoreszenzmikroskopie häufig 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Applichem, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Dabei lagert sich DAPI an Arginin-Thymidin reiche DNA-Sequenzen an (Kapuściński and Szer, 1979). Nach Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert DAPI blaues Licht im sichtbaren Bereich.

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung der Enteroide

Die Methodik der Kultivierung und Generierung der Enteroide wurde durch das Institut für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg, durchgeführt und wird hier der Vollständigkeit halber beschrieben.

Die intestinalen Epithelzellen wurden aus menschlichen Vollwandresektaten des Dünndarms gewonnen. Das Gewebe wurde dabei mehrere Male in kaltem HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gewaschen, um Blut und andere intestinale Bestandteile zu entfernen. Als nächstes wurde die Mukosa von den Muskelschichten mit Hilfe einer Schere abgetrennt und die Mukosa erneut mehrere Male in HBSS gewaschen. Nun wurden die Zotten des Dünndarms mit Hilfe eines sterilen Objektträgers abgekratzt. Das übrige Gewebe wurde dann gemeinsam mit 20 mL kaltem HBSS in ein 50 mL Falcon Röhrchen gegeben und für 5 Sekunden mittels eines Vortexmischers gemischt. Der entstandene Überstand wurde entfernt und dieser Schritt so oft wiederholt, bis der Überstand komplett klar und frei von Zellresten war. Danach wurde das Gewebe in einer 4°C kalten 2mM EDTA/HBSS Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 30 Minuten bei 4°C unter sanfter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe einmalig in 20mL HBSS gewaschen und dabei fünfmal manuell umgedreht, um dann in ein neues Falcon Röhrchen übertragen, mit 10 mL HBSS gemischt und per Hand fünfmalig geschüttelt zu werden. Dieser Schüttelvorgang wurde viermal mit je einem neuem Falcon-Röhrchen wiederholt. Unter einem Mikroskop wurde bei jeder Zellfraktion mit Hilfe eines kleinen Tropfens die Größe und Anzahl der Krypten untersucht. Die Überstände mit den mikroskopisch am besten aussehenden Krypten wurden zusammengefügt und anschließend bei Raumtemperatur mit 350g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Rückstand wurde anschließend wieder in 10 mL Basal Medium [DMEM-F12 Advanced (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ergänzt mit N2, B27, Anti-Anti, 10mM HEPES, 2 mM GlutaMAX-I (alle Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA), 1 mM N-Acetylcystein (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)] resuspendiert und die Krypten-Anzahl in einem 10 µL Tropfen

unter dem Mikroskop geschätzt. Die Krypten wurden nun in einem 1,5 mL großen antihafbeschichteten Röhrchen bei Raumtemperatur mit 350g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Der Zellrückstand wurde mit einer angemessenen Menge (≈ 5000 Krypten/mL) kaltem Matrigel (Corning, New York, USA) resuspendiert. Pro 24-Well-Platte wurden 50 μ L Tropfen aufgetragen und für 10-20 Minuten, bis das Matrigel gut verfestigt war, inkubiert. Das Kulturmedium bestand aus einer Mischung mit gleichen Anteilen von frischem basal Medium und Wnt3A angereichertem Medium. Des weiteren wurden 500 μ L einer Mischung der folgenden Wachstumsfaktoren pro Well hinzugefügt: 500 ng/mL hR-Spondin 1, 100 ng/mL mNoggin, 50ng/mL mEGF (alle PeproTech, Rocky Hill, New Jersey USA), 10 mM Y-27632 (Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), 10 nM Gastrin ([Leu15]-Gastrin I; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 mM Nikotinamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 500 nM A83-01 (Tocris Bioscience; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), 10 mM SB202190 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 500 nM LY2157299 (Axon MedChem, Groningen, Niederlande). Die Enteroide wurden geerntet, indem das Matrigel mithilfe von 500 μ L einer Zell-Wiederherstellungs-Lösung (Corning, New York, USA) pro Well resuspendiert und das Ganze für eine Stunde auf Eis inkubiert wurde. Für eine Einzel-Zell Expansion wurden die Enteroide mittels TrypLE Express (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) bei Raumtemperatur für 10 Minuten verdaut und erneut mit einer adjustierten Zellzahl (≈ 500 Zellen/Tropfen) in Matrigel ausgesät. Zusätzlich wurden 10 μ M JAG-1 (Anaspec, Fremont, Kalifornien, USA) und 10 μ M Y-27632 für die ersten zwei Tage hinzugefügt. Um die Stammzell-Population anzureichern wurden die Enteroide alle 5-7 Tage passagiert. Ein Teil der gewonnenen Enteroide wurde weiterverarbeitet, um Lysate für Western Blots zu gewinnen. Ein weiterer Teil wurde in Paraffin eingebettet, um für Histologische Färbemethoden verwendbar zu sein (Abbildung 8).

2.2.2 Herstellung von Gewebelysaten

Vor der Verwendung für Western Blots mussten die Proben aufgetaut und mit Hilfe eines Skalpell in ca. 20 mm² große Stücke geschnitten werden. Die

geschnittenen Proben wurden dann in ein mit einer Metallkugel gefülltes 2 mL großes Eppendorf-Gefäße (Sarsted, Nürnberg, Deutschland) gegeben. Nun wurde den Proben 500 µL Gewebelysepuffer [Tris ultrapure 1,212g; Natrium-Chlorid 4g, EDTA 0,3723g; Triton X 100 5mL; Glycerol 50 mL ad 500mL A. dest.; pH = 8] hinzugefügt. Damit die Proben bei Benutzung nicht durch Proteasen verdaut werden, wurde ihnen bereits hier ein Protease-Inhibitor (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in der Konzentration 1:100 hinzugegeben. Um die Probe nun zu zerkleinern und die Struktur zu zerstören, wurden die Eppendorf Gefäße für 10 Minuten bei einer Frequenz von 30 Hertz in eine Schüttelplatte (Tissuelyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) eingespannt. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (16089g bei 8,5 cm Radius) (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau). Die durch die Zentrifugation gewonnenen Überstände wurden abpipettiert und erneut in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimalig wiederholt. Die nun gewonnen Lysate konnten für Western Blots nach dem unten genannten Verfahren verwendet werden.

2.2.3 Western Blot

Durch Western Blots lassen sich Mengenveränderungen sowie die Präsenz von Proteinen in Zelllysaten analysieren. Das Zelllysate wird dabei mittels eines Probenpuffers gewonnen. (Renart et al., 1979)

2.2.3.1 Bicinchoninsäure-Test Proteinbestimmung

Essentiell für einen Western Blot ist eine Bestimmung der Proteinmenge pro Volumen Lysat, welches verwendet wird. Dieser Schritt ist notwendig, um sicherzustellen, dass während eines Western Blots nur gleiche Gesamtproteinmengen miteinander verglichen werden, sodass Aussagen über die vorhandene Menge einzelner Proteine getroffen werden können.

Eine gängige Methode hierzu ist ein Bicinchoninsäure(BCA)-Test. Hierbei binden zweiwertige Kupferionen an Peptidbindungen und werden im alkalischen pH zu einwertigen Kupferionen reduziert.

BCA bildet mit den einwertigen Kupferionen einen blau-violetten Komplex, welcher bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden kann. (Smith et al., 1985)

Für den BCA-Test wurde zuerst ein Albumin-Standard aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) als Proteinmengen Vergleich hergestellt. Hierfür wurden 10µl von 6 Proben in den Konzentrationen A=250, B=125, C=50, D=25, E=5, F=0 µg pro ml als Dublette in eine Zellkulturtestplatte mit 96 Fächern (Zellkulturtestplatte 96F, TPP Schweiz) nebeneinander aufgetragen. Als nächstes wurden neben die Standard-Dubletten 10µl der zu analysierenden Proben, ebenfalls als Dubletten, pro Feld aufgetragen.

Danach wurden pro Feld 200µl BCA-Reagenz [50:1 Mischung aus Reagenz A: Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1M Natriumhydroxid und Reagenz B: Kupfersulfat] zu den Proben bzw. Standards gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde die Extinktion der einzelnen Proben photometrisch gemessen und mittels der Eichgeraden des hergestellten BSA-Standards die Proteinmenge bestimmt.

2.2.3.2 SDS-Page Elektrophorese

Um quantifizierbare Aussagen über einzelne, spezifische Proteine in einem Proteingemisch eines Zelllysates machen zu können müssen die Proteine voneinander getrennt werden. Dieses Auftrennen funktioniert mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).

Das Prinzip der sogenannten SDS-Page Elektrophorese beruht auf den unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten, welche einheitlich geladene Moleküle beim Lauf durch eine Gelmatrix, dem Polyacrylamid-Gel, in einem elektrischen Feld besitzen.

Hierfür müssen zunächst alle Proteine eines Proteingemisches linear und mit einer einheitlichen Ladung vorliegen, sodass sie sich schlussendlich bei Anlage einer Spannung lediglich aufgrund ihres Massenunterschiedes beim Lauf durch die Gelmatrix auftrennen. Damit die Proteine ihre Quartär-, Tertiär- sowie Sekundär- Struktur verlieren werden sie mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einer anionischen Detergens, versetzt. Durch SDS wird erreicht, dass alle Proteine

eine einheitliche, negative, Ladung besitzen. Durch diese negative Ladung wird desweiteren erreicht, dass die Proteine linear vorliegen. Durch ein Erhitzen auf 95°C wird die Denaturierung noch weiter unterstützt.

Durch diese Schritte wird eine Beeinflussung der Laufgeschwindigkeiten, und damit der Ergebnisse, aufgrund von räumlichen Strukturen und Ladungen vermieden. Die Moleküle wandern somit lediglich basierend auf ihrer unterschiedlichen Molekülmasse unterschiedlich schnell zur Anode.

Für die Proteinauftrennung wurden vertikale Gelelektrophorese-Systeme (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Biorad München) benutzt. Als Gele wurden fertig gegossene Gele (Biorad München) verwendet. Dabei wurden Gele mit Taschengrößen von 50, 30, 20 µl benutzt (Mini Protean TGX Stain Free Gels).

Vor dem Auftragen der Proben auf die Gele wurden sie 1:1 mit einem dreifach konzentrierten Proben-Puffer mit DTT (Tris-HCL 1M pH 6,8 25ml, Glycerol 86% 40ml, SDS 8g, Aq. Ad inject. Ad 100ml + Bromphenolblau +DTT) gemischt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Erhöhung der Dichte enthielt der Probenpuffer des Weiteren Glycerin. Dadurch wurde erreicht, dass die Proben gleichmäßig in die Taschen sanken. Ebenfalls in dem Proben-Puffer enthalten war Bromphenolblau, um die Lauffront visuell sichtbar zu machen. In der ersten Tasche jedes Gels wurde zur Skalierung ein Größenmarker aufgetragen (PageRuler Plus Restained Protein Ladder; ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Die Elektrophorese wurde mit einem 1X Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 150V durchgeführt, bis die farblich markierte Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die Elektrophorese-Gele wurden nun anschließend für einen Immunoblot verwendet.

2.2.3.3 Immunoblot

Im Anschluss an die SDS-Page Elektrophorese wurden die Gele durch UV-Licht in einem Entwickler (Bio-Rad ChemiDoc Touch Imaging System) aktiviert. Dieser Schritt ist notwendig, um später die Gesamtprotein Menge bestimmen zu können.

Material und Methoden

Bei der Aktivierung des Gels mit UV Licht werden die in den Gelen enthaltenen Trihalogenmethane kovalent an die Aminosäure Tryptophan gebunden. Diese Tryptophan-Addukte emittieren nach Anregung Floreszenzen, und so können die enthaltenen Proteine auf dem Gel beziehungsweise später auf der Membran dargestellt werden.

Im Anschluss wurden die auf dem Gel der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Amershan Protran 0,45µm Nitrocellulose Blotting Membrane, GE Healthcare Life science; Marlborough, USA).

Für die Übertragung wurde ein halbtrockenes System nach Towbin (Towbin et al., 1979) gewählt. Hierbei wird das Laufgel und die Nitrozellulosemembran von zwei Filterpapieren umrahmt, welche in Transferpuffer [10X Puffer: Tris ultrapure (25mM) 30,3g; 125mM Glycin 144g; A. dest ad 1 L, pH 8,3] getränkt sind. Diese Anordnung wurde nun in eine Horizontal-Blot-Kammer (PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web; Peqlab, Erlangen) gespannt. Wobei das Gel auf Seite der Kathode und die Membran auf Seite der Anode lagert, da die negativ geladenen Proteine zur Anode, somit vom Gel auf die Nitrozellulosemembran, wandern. Der Transfer erfolgte bei 170mA über 40 Minuten.

Nun wurde als nächster Schritt die Gesamtprotein Menge, wie oben erwähnt, bestimmt.

Die Detektion der einzelnen Proteine erfolgte durch das Benutzen von primären Antikörper, welche gegen spezifische Epitope der Proteine gerichtet sind. Sowie dem Einsatz von sekundären Antikörpern, welche sich wiederum gegen den FC-Teil der primären Antikörper richten.

Zur Detektion wurden als erstes die Nitrozellulosemembranen in einer Suspension von 5% Magermilchpulver in TBS + 0,05% Tween für 1 Stunde geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 5°C mit den in

der oben genannten Suspension verdünnten Primärantikörpern mit den in Tabelle 1 genannten Konzentrationen inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen zunächst in TBS + 0,05% Tween dreimalig für je zehn Minuten gewaschen, um dann mit dem ebenfalls in 5%igen Magermilchpulver in TBS + 0,05% Tween verdünnten Sekundärantikörper mit den in Tabelle 2 genannten Konzentrationen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert zu werden.

An die Sekundärantikörper ist eine Meerrettichperoxidase (POX) gekoppelt, welche eine Reaktion von Luminol, in der Gegenwart von H_2O_2 , zu Carbonyl katalysiert. Die bei dieser Reaktion freiwerdenden Photonen können mittels eines photosensiblen Röntgenfilms detektiert und im Anschluss sichtbar gemacht werden. Hierfür wird zunächst der Überschüssige Sekundärantikörper von der Nitrozellulosemembran mittels dreimalig zehnminütigen Waschens in TBS + 0,05% Tween heruntergewaschen. Als nächstes wird die Membran für eine Minute in einer 1:1 Mischung aus ECL I Lösung (Mitbestandteil: Luminol) und ECL II Lösung (Mitbestandteil: H_2O_2) inkubiert.

In einem Foto-System (Bio-Rad ChemiDoc Touch Imaging System) wurde die Nitrozellulosemembran auf eine Platte gelegt, in das System hineingeschoben und dann je nach Intensität unterschiedlich lange belichtet.

Im Anschluss erfolgte dann die digitale Auswertung mittels eines Programms (Bio-Rad Image Lab Software). Dabei wurde die optische Dichte der detektierten Protein-Bande gegen das oben beschriebene Gesamtprotein ausgewertet, wodurch die Proteinmengen im Verhältnis zueinander quantifizierbar wurden.

2.2.4 Gewebe-Färbungen

2.2.4.1 H.E.-Färbungen

Die in der Mikroskopie angewandte Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) ist eine gute und einfache Färbung, um eine Übersicht über Gewebestrukturen zu bekommen. Dabei besteht die H.E.-Färbung aus zwei Einzel-Färbungen.

Zuerst wird das Gewebe mittels dem aus dem Blauholzbaum gewonnenen Hämatoxylin gefärbt. Zur Färbung wird allerdings nicht Hämatoxylin, sondern sein Oxidationsprodukt Hämatein verwendet. Die Oxidation kann dabei entweder natürlich durch Luft entstehen oder künstlich durch die Zugabe von Kaliumjodat. Da Hämatin als solches schlecht an Gewebe bindet, wird es mittels Zusatz von Alaunsalzen zu einer Komplexbildung mit Metallionen angeregt. Dabei entstehen sogenannte Hämatoxylinlacke. Bilden sich hierbei Komplexe mit Aluminiumionen, spricht man von sogenanntem Hämalaun. Das Hämalaun hat in einer sauren Lösung eine starke positive Ladung und eignet sich somit sehr gut, um an die negativ geladenen Zellkerne koordinativ zu binden und diese zu färben. Hämalaun färbt somit im wesentlichen Zellkerne eines Gewebes in einem blauen bis violetten Farbton an.

Als nächstes wird das Gewebe im Anschluss mit dem sauren Farbstoff Eosin gegengefärbt. Eosin geht dabei eine Ionenbindung mit den positiv geladenen Plasmaproteinen ein. Somit färbt Eosin vor allem das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern in einem kräftigen hellen Rot an.

Für eine H.E.-Färbung müssen zunächst Gewebeschnitte angefertigt werden. Hierfür wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben der Patienten und Kontrollen an einem Mikrotom (SM 2000R, Leica, Wetzlar) in 2µm dünne Schnitte geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger (Superfrost Plus, Thermo Fischer, Massachusetts, USA) gezogen, welche über Nacht bei 42°C in einem Trockenschrank (Memmert Schwabach) trockneten. Die nun getrockneten Schnitte wurden zunächst mittels Xylol (Xylene (mixture of isomers) VWR Xchemicals, Pennsylvania, USA) entparaffiniert sowie mittels einer absteigenden

Alkoholreihe (Ethanol absolut, Chemsolute, Renningen, Deutschland) mit den Konzentrationen 100, 90, 80, 70 % hydriert. Wobei die Schnitte zwei mal zehn Minuten in Xylol und je drei Minuten pro Alkoholkonzentration verblieben. Die nun entparaffinierten und hydrierten Schnitte wurden für 12 Minuten in Mayer's Hämalaun (Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) getaucht. Hierbei kommt es zu der oben beschriebenen Kernfärbung. Da Hämalaun in seiner sauren Lösung jedoch rotbraun erscheint, muss es, um seine charakteristische dunkelblaue Farbe zu erhalten, in eine schwach basische Umgebung geführt werden, sogenanntes „Bläuen“. Hierfür wurden die mit Hämalaun gefärbten Schnitte für 10 Minuten in Leitungswasser gewässert. Dieses „Bläuen“ hat den weiteren Nebeneffekt, dass hierdurch die Färbung fixiert wird, da sich die Hämatoxylinlacke in basischer Umgebung schwer von den Gewebestrukturen lösen.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte, für drei bis vier Minuten, in Eosin Y (Yellowish) (Sigma-Aldrich, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte, für dreimal je fünf Minuten, in Leitungswasser gewaschen, um die kräftige Eosin Y Färbung zu differenzieren.

Abschließend wurde das Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 70, 80, 90, 100 % entwässert und in Xylol geklärt, wobei die Schnitte je drei Minuten pro Alkoholkonzentration und je zwei mal fünf Minuten in Xylol verweilten. Im Anschluss wurden die Schnitte mittels Entellan (Merck, Darmstadt) mit einem Deckglas eingedeckt.

Die H.E.-Färbungen wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (BZ 9000, Biorevo, Keyence, Osaka, Japan) aufgenommen.

2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, in einem Gewebe durch spezifische Bindung von Antikörpern an Proteine, solche darzustellen. Somit sind Rückschlüsse auf die Lokalisation und Menge einzelner Proteine in einem Gewebe möglich. Zu unterscheiden gilt dabei das Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie.

Das angewandte Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie beruht dabei auf einem gegen ein spezifisches Protein gerichteten Primärantikörper, welcher an die Epitope des Zielproteins bindet. Um diese Bindung visuell sichtbar zu machen, setzt man einen gegen den Fc-Teil des Primärantikörper gerichteten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper ein.

Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann nun mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und dadurch dazu gebracht werden, selber Licht einer sichtbaren und, abhängig vom eingesetzten Sekundärantikörper, bestimmten Wellenlänge zu emittieren: der Cyanfarbstoff Cy3 leuchtet rot, Alexa Fluor 488 grün und DAPI blau.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden zunächst 1µm dünne Schnitte der in Paraffin eingebetteten Gewebeproben angefertigt und diese für zwei Nächte in einem Trockenschrank bei 50°C getrocknet. Nach diesem Trocknen wurden die Proben für zwei mal zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe, gleich zu der oben genannten, für je 3 Minuten pro Konzentration hydriert.

Nach anschließendem zweimaligem fünfminütigem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mittels einer Hitze induzierten Methode in Kombination mit einem Zitronensäure-Natrium-Citrat-Puffer mit einem pH von 6,0 demaskiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die Antigene nach der Paraffineinbettung für den Primärantikörper wieder zugänglich zu machen (Shi et al., 1991). Die Gründe für die Maskierung von Antigenen nach Paraffineinbettungen sind bis heute nicht abschließend geklärt. Man geht davon aus, dass die Maskierung auf mehrere Effekten beruht. Verantwortlich gemacht werden dafür unter anderem die Quervernetzung von Molekülen und die Depurinierung von DNA (Dapson, 2007). Um die Schnitte zu demaskieren, wurde ein Schnellkochtopf mit 1000mL destilliertem Wasser gefüllt. In diesen Schnellkochtopf wurde dann auf einem Gestell mit einer Höhe von ca. 10cm eine Schale, welche mit 950mL des oben genannten Zitronensäure-Puffers gefüllt wurde, gestellt. Nach Erhitzen des Schnellkochtopfes auf einer Herdplatte auf über 100°C wurden die Schnitte in den Puffer gestellt und der Topf mit einem

Deckel verschlossen. Sobald sich in dem Topf ein adäquater Überdruck eingestellt hatte, wurden die Schnitte für 5 Minuten im Topf belassen. Nach anschließendem Druckabbau unter fließendem kaltem Wasser für 5 Minuten wurden die Schnitte in destilliertem Wasser für zwei mal fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten in einer 0,1%igen Triton Lösung permeabilisiert. Dieser Schritt ist notwendig, um Zutritt zu intrazellulären und intraorganellären Antigenen zu bekommen (Jamur and Oliver, 2010).

Nach dreimaligem Waschen in PBS für je fünf Minuten wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit je 300 μ L BSA-NGS (0,1% (w/v) Rinderserumalbumin mit 10% (w/v) Ziegen Serum in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur gesättigt. Nach entfernen des BSA-NGS wurden die Schnitte mit entsprechenden Primärantikörpern, in oben genannten Konzentrationen, über Nacht bei 5°C mit je 300 μ L BSA-NGS/Antikörper Mischung inkubiert. Am Nächsten Tag wurden die nicht gebundenen und somit überschüssigen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in PBS entfernt und die Schnitte anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper gelöst in PBS, in oben genannten Konzentrationen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit ebenfalls je 300 μ L inkubiert. Wenn nötig erfolgte nach dieser Stunde zur Visualisierung der Kernstrukturen die Inkubation mit DAPI (1 μ g/ml PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach letztem dreimaligem Waschen in PBS für je fünf Minuten wurde das Gewebe abschließend mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe mit der oben genannten Methode entwässert und in Xylol geklärt. Im Anschluss wurden die Schnitte mittels Entellan (Merck, Darmstadt) mit einem Deckglas eingedeckt.

Die Immunfluoreszenzen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (LSM, Zeiss, Jena) mikroskopiert und die Bilder abschließend mit Adobe Photoshop CC (Adobe Systems Incorporated, San Jose, Kalifornien, USA) bearbeitet.

2.2.5 Klassifikation des Entzündungsausmasses

Die Klassifikation des Entzündungsausmasses erfolgte an H.E.-gefärbten Schnitten durch einen unabhängigen und verblindeten Untersucher anhand eines modifizierten Klassierungssystems nach Truelove und Richards (Truelove

and Richards, 1956). Es erfolgte basierend auf dieser Publikation eine Modifikation des Systems, so dass die Gewebeproben nach einem Wert von null (keine Entzündung) bis drei (schwere Entzündung) eingeteilt wurden. Die Kategorisierung in diese Werte erfolgte dabei nach folgenden Kriterien. (Tabelle 3). Bei Grad 0 ist die Zahl der inflammatorischen Zellen nicht erhöht, es sind keine Granulozyten vorhanden und das Epithel ist intakt - es liegt keine Entzündung vor. Bei Grad I ist die Zahl der inflammatorischen Zellen leicht erhöht, es sind wie bei Grad 0 keine Granulozyten vorhanden und das Epithel ist ebenfalls intakt - es liegt eine milde Entzündung vor. Bei Grad II ist die Zahl der Lymphozyten und Plasmazellen hingegen, ohne Vorhandensein von Granulozyten und ohne Epithelschädigung, stark erhöht - es liegt eine moderate Entzündung vor. Ab Grad III kommt additiv zur Situation in Grad II das Vorhandensein von Granulozyten, Kryptenabszessen und erosiven Defekten im Epithel dazu - es liegt eine schwere Entzündung vor.

Tabelle 3: Kriterien der histologischen Klassifikation

| Grad | Histologische Kriterien | | |
|------------|--------------------------|---------------|--------------------|
| | Inflammatorische Zellen? | Granulozyten? | Epithelschädigung? |
| 0 | Nein | Nein | Nein |
| I | Leicht erhöht | Nein | Nein |
| II | Stark erhöht | Nein | Nein |
| III | Stark erhöht | Ja | Ja |

Die Tabelle gibt Aufschluss über das im Text erwähnte und angewandte Schema zur Beurteilung und Klassierung der Schwere der Entzündung von Gewebeproben von Patienten mit MC und Kontrollen. Nicht als Kriterium in der Tabelle aufgeführt sind die ab Grad III vorkommenden Kryptenabszesse.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Einteilung der Entzündungsgrade der Studienpatienten erfolgte auf einem ordinalskalierten Niveau. Sie wurden somit mittels des Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei wurde die U-Statistik II mit folgender Formel benutzt.

$$U = n_1 * n_2 + \frac{n_1 * (n_1 + 1)}{2} - R_2$$

Dabei gilt:

$n_1 =$ Stichprobengröße nicht entzündet

$n_2 =$ Stichprobengröße entzündet

$R_2 =$ Rangsumme entzündet

Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ergibt sich der Nichtablehnungsbereich der Nullhypothese laut der Standardnormalverteilungstabelle für z-Werte zwischen -1,96 und +1,96. Ein signifikanter Unterschied der Gruppe mit größerer Rangsumme (entzündet) zu der Gruppe mit kleinerer Rangsumme (nicht entzündet) wurde somit für $|z| > 1,96$ angenommen.

Der z-Wert wurde dabei, nach Bortz; Statistik für Human- und Sozialwissenschaften; 7. Auflage, mit folgender Formel berechnet:

$$z = \frac{U - \frac{n_1 * n_2}{2}}{\sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n * (n - 1)} * \left(\frac{n^3 - n}{12} - \sum_{i=1}^k \frac{t_i^3 - t_i}{12} \right)}}$$

Dabei gilt:

$n = n_1 + n_2$

$t_i =$ Anzahl Personen, welche sich Rangplatz i teilen

$k =$ Anzahl verbundener Ränge überhaupt

Die Effektstärke des Ergebnisses des Mann-Whitney-U-Tests wurde durch den Korrelationskoeffizienten r von Pearson ausgedrückt und mittels folgender Formel berechnet:

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right|$$

Nach Cohen wurden dabei folgende Aussagen zur Effektstärke in Abhängigkeit zum Zahlenwert r getätigt (Cohen, 1988):

Material und Methoden

$r = 0,1 \rightarrow$ schwacher Effekt

$r = 0,3 \rightarrow$ mittelstarker Effekt

$r = 0,5 \rightarrow$ starker Effekt

Die statistische Auswertung der Daten der Western Blots wurden mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA) vorgenommen. Bei den vorliegenden Daten der Western Blots wurde eine Nicht-Normalverteilung angenommen und aufgrund dessen ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Signifikanz wurde dabei für $p < 0,05$ angenommen. Die Streuungen aller Zahlenergebnisse um ihren Endwert wurden, wenn nicht anders angegeben, als Standardfehler (SEM) aufgeführt. Zur Auswertung der Western Blots wurde mithilfe der Software ImageLab (Biorad, München, Deutschland) die optische Dichte der Banden gemessen und die Dichte dieser bei Proben und Kontrollen im Verhältnis verglichen. Hierfür wurden die Kontrollen durch sich selbst dividiert, um einen Referenzwert gleich eins zu erhalten und anschließend jede Probe durch den Wert der jeweiligen Kontrolle dividiert, um einen Vergleich anstellen zu können. Formell ausgedrückt galt dabei folgendes:

$$\frac{OD_{K_n}}{OD_{K_n}} = 1$$

Dabei gilt:

$OD =$ Optische Dichte der Bande

$K_n =$ Kontrollprobe n

$$\frac{OD_{P_n}}{OD_{K_n}} = y$$

Dabei gilt:

$P_n =$ Patientenprobe n

$y =$ Verhältnisswert

Die Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen (LSM, Zeiss, Jena, Deutschland). Die Bearbeitung und Zusammenstellung der Bilder entstand mittels Adobe Photoshop CC (Adobe

Systems Incorporated, San Jose, Kalifornien, USA). Die Übersichtsaufnahmen sowie die vergrößerten Bilder der H.E.-Färbung wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 (BIOREVO, Keyence, Osaka, Japan) aufgenommen und ebenfalls anschließend mithilfe von Adobe Photoshop CC bearbeitet und zusammengestellt.

3. Ergebnisse

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Enteroids Generated from Patients with Severe Inflammation in Crohn's Disease Maintain Alterations of Junctional Proteins. Journal of Crohn's and Colitis.

Meir, M., Salm, J., Fey, C., Schweinlin, M., Kollmann, C., Kannapin, F., Germer, C.-T., Waschke, J., Beck, C., Burkard, N., et al. (2020).

Zur Veröffentlichung eingereicht bei Journal of Crohn's and Colitis / Juli 2019.

Zur Veröffentlichung angenommen bei Journal of Crohn's and Colitis / April 2020.

3.1 Charakterisierung der Studienpatienten

Die in der Studie inkludierten Patienten hatten alle durch klinisch und histologische Diagnostik bestätigten MC. In die Studie aufgenommen wurden insgesamt 16 Patienten (8 Frauen und 8 Männer), welche aufgrund der in der Abbildung 9 dargestellten Indikation operiert werden mussten (Abbildung 9). Die Indikation zur Operation war bei allen Patienten ein therapierefraktärer MC. Als weitere Komplikation litten zwei Patienten an einer subtotalen bis totalen Stenose des Dünndarms, drei Patienten an einer Stenose der Anastomose bei Zustand nach Ileozäkalresektion, weitere zehn litten unter Fistelbildung und ein Patient hatte Fistel- und Stenosenbildung. Als operatives Verfahren wurde bei acht Patienten eine laparoskopische Ileozäkalresektion, bei zwei Patienten eine offene Ileozäkalresektion, bei drei eine Anastomosennachresektion mit Ileoascendostomie, bei einem Patienten eine Resektion der Ileoascendostomie, bei einem Patienten eine offene Sigma- und Ileozäkal- Resektion sowie bei einem weiteren Patienten eine Rektumresektion mit rechtsseitiger Hemikolektomie durchgeführt. Die Patienten erhielten zur Zeit der Operation unterschiedliche Medikationen im Rahmen ihrer Grunderkrankung. So erhielt ein Patient ausschließlich Zytostatika zur Therapie, fünf erhielten Glukokortikoide, zwei Patienten andere entzündungshemmende Medikamente, ein Patient Immunsuppressiva, ein Patient eine Antikörpertherapie, drei Patienten Zytostatika und entzündungshemmende Medikamente, ein Patient Immunsuppressiva und entzündungshemmende Medikamente sowie zwei Patienten Antikörper

Ergebnisse

Therapien kombiniert mit Glukokortikoiden (Abbildung 9). Das Alter der Studienpatienten reichte von 22 bis 63 Jahre (Abbildung 9) mit einem Durchschnittsalter von $40 \pm 3,5$ Jahren.

Als Kontrollpatienten wurden Insgesamt 14 Patienten (6 Frauen und 8 Männer) in die Studie aufgenommen, welche entweder an einem bösartigen Tumor oder an Polypen litten und deshalb wie oben erwähnt im Rahmen einer Hemikolektomie rechts, beziehungsweise einer Ileumteilresektion, operiert wurden (Abbildung 9). Keiner dieser Patienten hatte eine CED. Vier Patienten hatten ein Caecum Karzinom, drei ein Colon ascendens Karzinom, einer Caecum Polypen, zwei Colon ascendens Polypen, drei Neuroendokrine Kolorektale Tumore sowie einer eine traumatische Perforation des Colon descendens mit Ileostoma Anlage. Die Kontrollpatienten nahmen keine für eine CED relevante Medikation ein. Das Alter der Kontrollpatienten reichte von 47 bis 92 Jahre (Abbildung 9) mit einem Durchschnittsalter von 73 ± 3 Jahren. Für die CED Patientin wurde intraoperativ durch den Operateur eine makroskopische semiquantative Einschätzung der Ausprägung der Entzündung des Resektats vorgenommen. Wie in „Material und Methoden“ beschrieben wurden im Rahmen der Gewebeprozessierung je eine Probe aus dem Zentrum des Resektats, welches makroskopisch entzündet erschien, und eine von den Resektaträndern, welche makroskopisch in der Regel wenig oder nicht entzündet erschienen gewonnen.

Für die Kontrollpatienten, die keine CED hatten, wurde analog Gewebe für die histologische und biochemische Aufarbeitung und die Generierung von Enteroiden gewonnen.

Ergebnisse

| Pat. Nr. | Klinische Daten | | | | |
|----------|-----------------|-------|----------------------------------|---|--|
| | Geschlecht | Alter | MC relevante Medikation | Operationsgrund | Operation |
| Pat01 | W | 51 | 6-Mercaptopurin | Dünndarmileus | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat02 | M | 57 | Glukokortikoide | Interenterische Fistelbildung | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat03 | W | 59 | Methotrexat, Sulfasalazin | Interenterische Fistelbildung | Ileozäkalsektion, Strikturoplastik (offen) |
| Pat04 | W | 30 | 6-Mercaptopurin, Glukokortikoide | Fistulierende Proktitis | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat05 | M | 33 | Glukokortikoide | Subtotale Stenose terminales Ileum | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat06 | M | 26 | Adalimumab | Interenterische Fistelbildung | Sigma- und Ileozäkal- Resektion (offen) |
| Pat07 | W | 53 | Azathioprin, Glukokortikoide | Chronische Stenosierung mit interenterischer Fistulierung | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat08 | W | 29 | Glukokortikoide | Interenterische Fistelbildung | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat09 | W | 28 | 6-Mercaptopurin, Glukokortikoide | Fistulierende Proktitis | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat10 | M | 22 | Vedolizumab, Glukokortikoide | Fistulierende Proktitis | Rektumsresektion und Hemikolektomie rechts |
| Pat11 | M | 27 | Azathioprin | Interenterische Fistelbildung | Ileozäkalsektion (laparoskopisch) |
| Pat12 | M | 44 | Glukokortikoide | Entero-Sigmoidale Fistel | Ileozäkalsektion (offen) |
| Pat13 | W | 63 | Mesalazin | Z.n. Ileozäkalsektion, Anasotomsstenose | Anastomosennachresektion |
| Pat14 | M | 46 | Mesalazin | Z.n. Ileozäkalsektion, Anasotomsstenose | Anastomosennachresektion |
| Pat15 | M | 44 | Glukokortikoide | Retroperitoneale und interenterische Fistelbildung | Ileoascendostomie |
| Pat16 | W | 23 | Infliximab, Glukokortikoide | Z.n. Ileozäkalsektion, Anasotomsstenose | Anastomosennachresektion |
| Kont01 | W | 74 | - | Caecum Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont02 | W | 79 | - | Caecum Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont03 | M | 47 | - | Perforation C. descendens | Z.n. Ileostoma mit Ileumsegmentresektion |
| Kont04 | W | 92 | - | Caecum Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont05 | M | 74 | - | C. ascendens Polypen | Hemikolektomie |
| Kont06 | M | 86 | - | C. ascendens Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont07 | M | 62 | - | Caecum Polypen | Hemikolektomie |
| Kont08 | M | 72 | - | C. ascendens Polypen | Hemikolektomie |
| Kont09 | W | 78 | - | Caecum Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont10 | M | 68 | - | NET | Hemikolektomie |
| Kont11 | M | 84 | - | C. ascendens Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont12 | M | 76 | - | NET | Hemikolektomie |
| Kont13 | W | 68 | - | C. ascendens Carcinom | Hemikolektomie |
| Kont14 | W | 61 | - | NET | Hemikolektomie |

Abbildung 9: Charakteristika der Studienpatienten

Tabelle der wichtigsten klinischen Daten aller in der Studie enthaltenen Patienten. **MC** = Morbus Crohn; **W** = weiblich; **M** = männlich; **Z.n.** = Zustand nach; **C.** = Colon; **-** = keine MC relevante Medikation; **NET** = Neuroendokriner Tumor; **Kont** = Kontrolle; **Pat** = Patient.

3.1.1 Histomorphologische Untersuchung der Gewebeproben

Die H.E.-gefärbten Schnitte aus den Resektaten der Studienpatienten wurden im nächsten Schritt mikroskopisch analysiert, um eine histologische Bestätigung der klinischen Diagnose MC zu erlangen. Des Weiteren wurde histologisch und somit mikroskopisch die makroskopische Zuteilung des Operators in entzündete- (Inflammation) und nicht entzündete- (keine Inflammation) Resektate verifiziert. Ebenfalls histologisch untersucht wurden die Gewebeproben der Kontrollpatienten, um ein inflammatorisches Geschehen im Sinne einer CED auszuschließen und somit ihren Einsatz als Kontrollgewebe zu verifizieren (Abbildung 10).

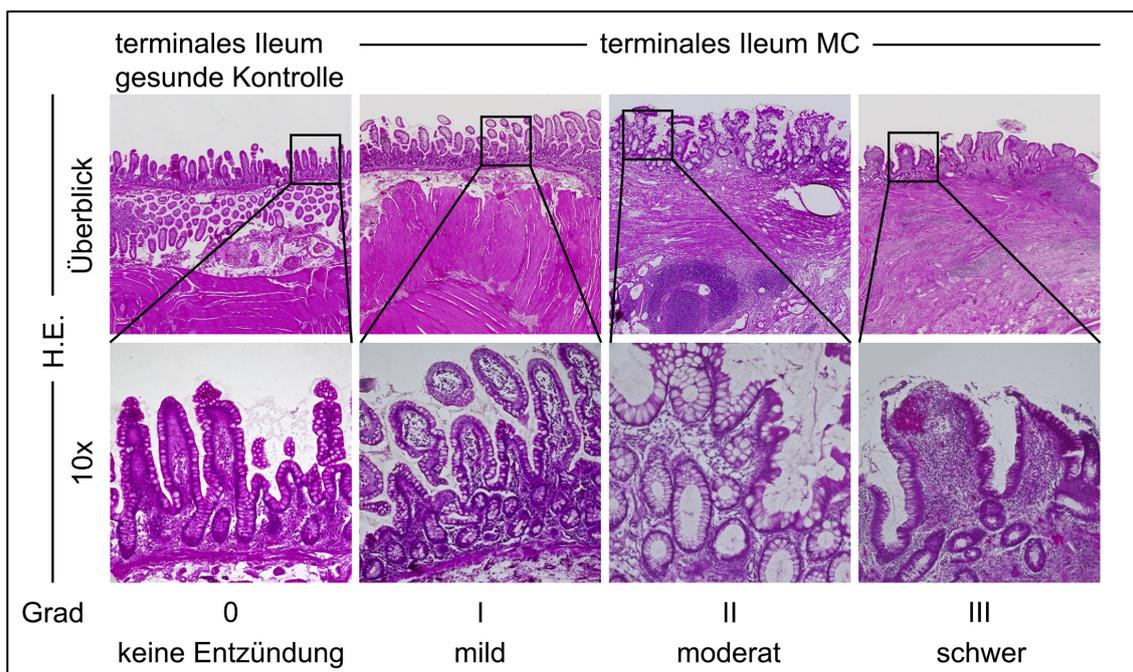


Abbildung 10: Histomorphologische Untersuchung der Gewebeproben

Die Abbildung zeigt exemplarische Beispiele der Einteilung der Gewebeproben von Studienpatienten und Kontrollpatienten in unterschiedliche Grade (Grad 0 – III) nach Abhängigkeit der histologisch festgestellten Schwere der Entzündung. **H.E.** = Haematoxylin-Eosin-Färbung; **10x** = 10fache Vergrößerung.

3.1.1.1 Einstufung/Klassierung des Grades der Entzündung

Die Proben aus den makroskopisch als entzündet gewerteten Bereichen wiesen dabei einen medianen Punktwert von 3 (Spannweite 1-3) auf, wohingegen die Proben aus den makroskopisch nicht entzündeten Bereichen einen Median von

Ergebnisse

2 aufwiesen (Spannweite 1-3). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte dabei einen U-Wert von 56 und einen z-Wert von -2,93. Somit galt $p < 0,05$ und es lag ein signifikantes Ergebnis mit einer Effektstärke r von 0,52 vor (Tabelle 4). Das Ergebnis dieser Untersuchung bestätigt somit die makroskopisch vorgenommene Zuteilung in moderate und schwere Entzündung bei Proben aus unterschiedlichen Arealen von Patienten mit MC, sodass wir in den weiteren Analysen eine mögliche Korrelation des Ausmaßes der Entzündung mit möglichen Veränderungen der Junktionsproteine untersuchen konnten.

Erwartungsgemäß bestätigte die histologische Untersuchung der Kontrollgewebeproben den makroskopischen Aspekt, nachwelchem diese Patienten an keiner CED litten und auch mikroskopisch keinerlei Entzündungszeichen aufwiesen. Entsprechend wurden alle Kontrollgewebeschnitte mit einem Wert von 0 (keine Entzündung) durch den unabhängigen Untersucher bewertet.

Tabelle 4: Mann-Whitney-U-Statistik

| | Rangsumme | Anzahl | U-Statistik |
|----------------------------------|------------------|---------------|--------------------|
| Nicht entzündet | 192 | 16 | 200 |
| entzündet | 336 | 16 | 56 |
| Minimum | | | 56 |
| z-Wert | | | -2,93 |
| Korrelationskoeffizient r | | | 0,52 |

Die Tabelle gibt Auskunft über die Ergebnisse und Teilergebnisse der Mann-Whitney-U-Statistik angewandt für die Entzündungsgrade der Patientenproben. Bei einem z-Wert von -2,93 können wir dabei mit einem $p < 0,05$ von einem signifikanten Ergebnis ausgehen. Der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson von 0,52 zeigt uns dabei einen starken Effekt an. Die makroskopisch aus entzündeten und nicht entzündeten Arealen entnommenen Proben unterscheiden sich somit signifikant in ihrem histologisch untersuchtem Entzündungsgrad, wobei Proben aus makroskopisch entzündeten Arealen signifikant stärker entzündet erscheinen als solche aus nicht entzündeten Bereichen.

3.2 Der Schlussleistenkomplex in Patientenproben

Nach den Analysen zur Ausprägung der Entzündung und der Morphologie des Gewebes wurde die Proteinexpression sowie die Struktur der Hauptbestandteile des Schlussleistenkomplexes in den unterschiedlichen Anteilen der Resektate untersucht. Hierzu erfolgten immunfluoreszenzmikroskopische Analysen und Western Blots aus den Gewebelysaten.

3.2.1 Occludenskontakte in Patientenproben

Die Bestandteile der am weitesten apikal gelegenen Occludenskontakte unterliegen verschiedenen Veränderungen während einer Inflammation. Als Vertreter der Transmembranproteine der Occludenskontakte untersuchten wir Claudin 1, 2, 4, 5 sowie Occludin zunächst in den Immunfärbungen im Hinblick auf das Verteilungsmuster und quantitativ auf Veränderungen im Western Blot. In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten sich an den Zellgrenzen deutliche Verluste von Claudin 1 bei Färbungen des als schwer entzündet klassifizierten Gewebes. Bei Färbungen des als moderat klassifizierten Gewebes zeigte sich ebenfalls ein Verlust von Claudin 1, jedoch war dieser morphologisch weniger stark ausgeprägt (Abbildung 11A). In Western Blot Analysen war die Proteinmenge von Claudin 1 in entzündeten Proben verglichen mit gesunden Kontrollen signifikant reduziert, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen moderate und schwere Entzündung gab (Abbildung 11B).

Ergebnisse

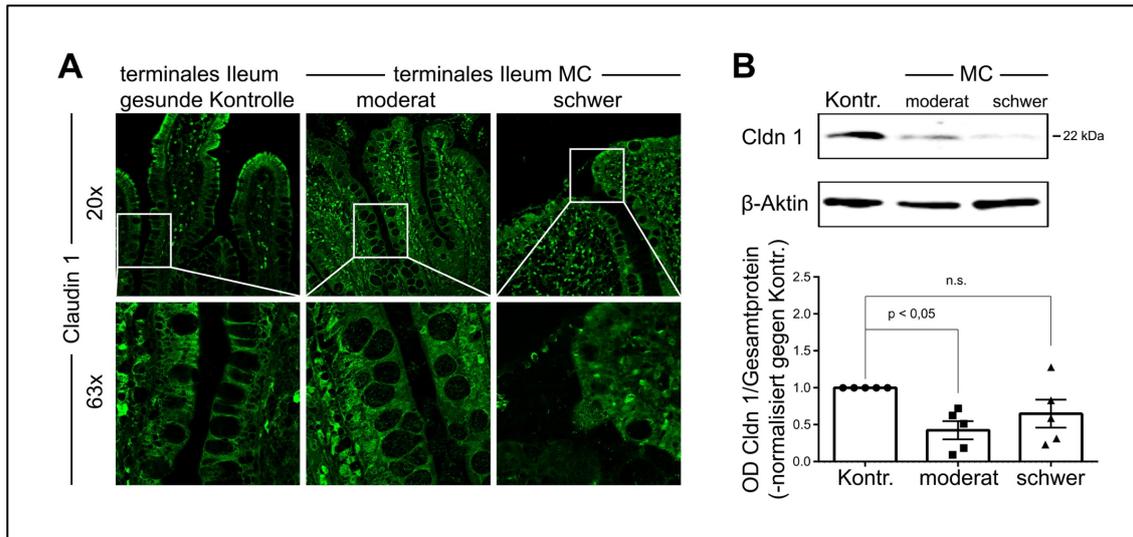


Abbildung 11: Reduktion der Proteinexpression von Claudin 1 in CED

Die Abbildung zeigt in **A** die Immunfluoreszenzfärbung gegen Claudin 1 sowie in **B** die Western Blot Analysen mit der quantitativen Auswertung der Proteinexpression von Claudin 1 unten im Bild sowie einem Beispiel Western Blot oben. Für die Aufnahmen der Färbungen in **A** wurden in 20fachen Vergrößerung zur Übersicht (obere Reihe) und in 63fachen Vergrößerung (untere Reihe) Fotos desselben Areals gemacht. Es zeigt sich dabei eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen. Die unten in **B** zu sehenden Western Blot Analysen wurden quantifiziert durch die Messung der optischen Dichte der einzelnen Banden je eines Triplets bestehend aus Proben der Gruppen: Kontrolle; moderat und schwer, wobei die Ergebnisse gegen die pro Triplet vorhandene Kontrollprobe normalisiert und ins Verhältnis gesetzt wurden ($OD_{Kontrolle1}/OD_{Kontrolle1}$ = Wert y-Achse Kontrolle1; $OD_{moderat1}/OD_{Kontrolle1}$ = Wert y-Achse Probe moderat1; $OD_{schwer1}/OD_{Kontrolle1}$ = Wert y-Achse Probe schwer1; fortlaufend nach diesem Schema für weitere Proben Triplets). Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. Dabei zeigt die Auswertung eine signifikante Reduktion der Proteinexpression in der moderat entzündeten Gruppe verglichen zur Kontrolle, sowie eine deutliche, aber nicht signifikante, Reduktion der Expression in der schwer entzündeten Gruppe verglichen zur Kontrolle und nahezu keine Unterschiede der Expression in den entzündeten Geweben untereinander. Das oben in **B** zusehende Bild eines Beispiel Western Blots stellt ein repräsentatives Triplet mit β -Aktin als Ladungskontrolle dar. **moderat** = Probe aus moderat entzündetem Gewebe; **schwer** = Probe aus schwer entzündetem Gewebe; **MC** = Morbus Crohn; **Kontr.** = Kontrolle; **Cldn** = Claudin; **OD** = optische Dichte; **n.s.** = nicht signifikant; **kDa** = kilo Dalton.

Ähnliche Veränderungen zeigten sich bei den Transmembranproteinen Claudin 4 und 5. So zeigte Claudin 4 eine signifikante Reduktion der Proteinexpression in den Western Blot Analysen der moderat und schwer entzündeten Proben (Abbildung 12B). Es gab hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen schwer und moderat entzündetem Gewebe untereinander. Auch die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte an den Zellgrenzen einen Verlust des Proteins Claudin 4 in Form eines abgeschwächten Fluoreszenzsignals. Hierbei

Ergebnisse

war, ähnlich zu Claudin 1, ein morphologischer Unterschied der Stärke des Verlustes des Proteins an den Zellgrenzen der unterschiedlichen Gruppen moderate und schwere Entzündung zu sehen. So scheint visuell der Verlust stärker in den schwer entzündeten als in den moderat entzündeten Geweben (Abbildung 12A).

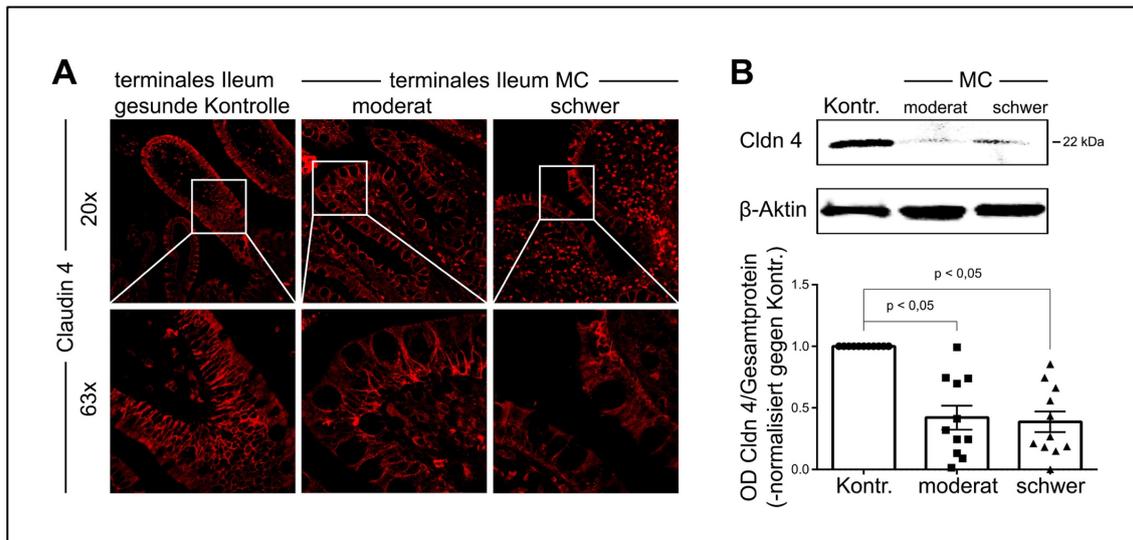


Abbildung 12: Reduktion der Proteinexpression von Claudin 4 in CED

Zu sehen ist eine deutliche, stufenförmige, Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen Claudin 4 (**A**), sowie ein quantitativ signifikanter Rückgang der Proteinexpression von Claudin 4 in den moderat und schwer entzündeten Fraktionen in Western Blot Analysen (**B** unten). Passend dazu zeigt sich ein Rückgang des Signals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ in einem repräsentativen Beispiel Western Blot (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Claudin 5 zeigte kongruente Verteilungsmuster. So ergab sich in den Western-Blot Analysen ebenfalls eine signifikante Reduktion der Proteinexpression der Gruppen „moderat“ und „schwer“, wobei die Reduktion quantitativ in der Gruppe der schwer entzündeten Gewebe stärker ausfiel als in den moderat entzündeten Geweben (Abbildung 13B). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten auch hier einen Verlust des Proteins an den Zellgrenzen, mit stärkerer Ausprägung des Verlustes in den schwer entzündeten Geweben (Abbildung 13A).

Ergebnisse

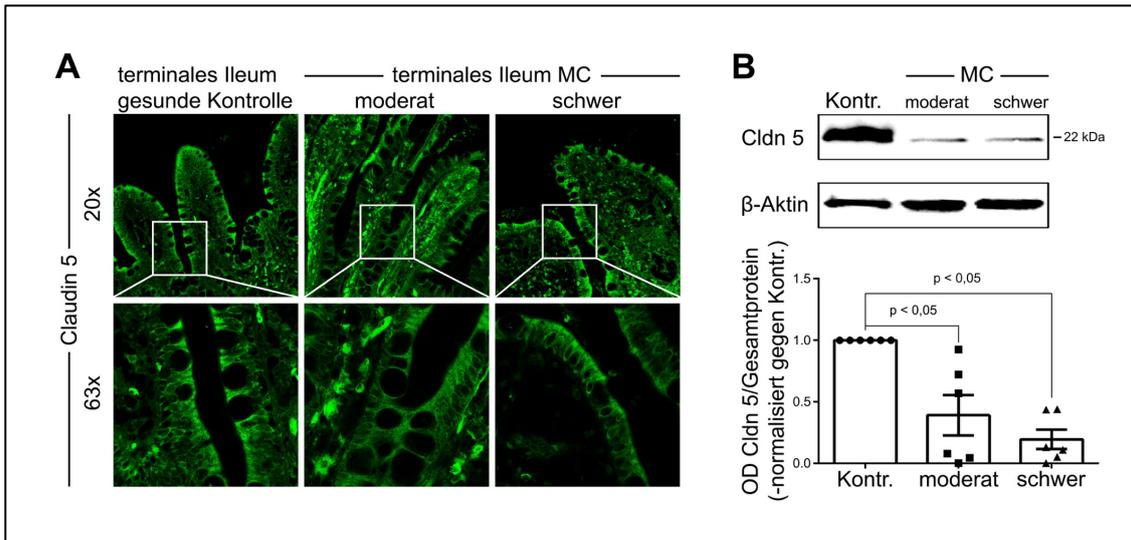


Abbildung 13: Reduktion der Proteinexpression von Claudin 5 in CED

Zu sehen ist ebenfalls eine deutliche, stufenförmige, Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen Claudin 5 (**A**), sowie ein quantitativ signifikanter Rückgang der Proteinexpression von Claudin 5 in der moderat und schwer entzündeten Fraktion in Western Blot Analysen (**B** unten). Passend hierzu zeigt sich ein Rückgang des Signals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ in einem repräsentativen Beispiel Western Blot (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Von den untersuchten Claudinen zeigte einzig Claudin 2 andere Verteilungsmuster. Das als porenbildendes Protein bekannte Claudin 2 durchlief im Verlauf einer chronischen Inflammation eine Hochregulation. Dies konnten wir in Western Blot Analysen mit einem signifikanten Anstieg der Quantität innerhalb der Gruppe der schwer entzündeten Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Dieser Anstieg vollzog sich nicht in den moderat entzündeten Geweben (Abbildung 14B). In den Immunfluoreszenzmikroskopie Untersuchungen zeigte sich dieser Anstieg ebenfalls in Form einer Verstärkung und Ausbildung eines klaren linienförmigen Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen in der Gruppe der schwer entzündeten Gewebeproben. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte bei einer Immunfärbung gegen Claudin 2 keinerlei Systematik im Verteilungsmuster des Proteins an den Zellgrenzen sowie ein insgesamt schwächeres Fluoreszenzsignal. Erste Anstiege der Signalstärke sowie Bildung einer Systematik der Anordnung von Claudin 2 an den Zellgrenzen zeigte sich in den moderat entzündeten Geweberesektaten (Abbildung 14A).

Ergebnisse

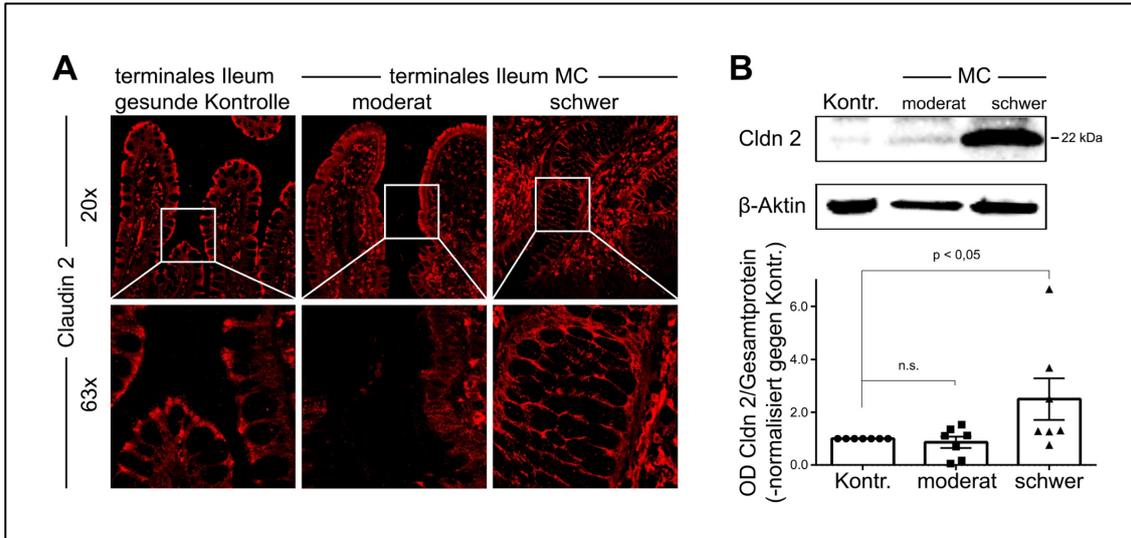


Abbildung 14: Hochregulation der Proteinexpression von Claudin 2 in CED

Zu sehen ist eine deutliche, stufenförmige, Zunahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen Claudin 2 (**A**), sowie ein quantitativ signifikanter Anstieg der Proteinexpression von Claudin 2 in der Fraktion der schwer entzündeten Gewebe in Western Blot Analysen ohne Anstieg der Expression in den moderat entzündeten Gewebe (**B** unten). In einem repräsentivem Western Blot ist die Zunahme des Signals ebenfalls nur in der Gruppe „schwer“ zu sehen (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Neben den Claudinen untersuchten wir ebenfalls Occludin morphologisch und quantitativ. Hierbei ergaben sich keinerlei signifikante Änderungen des Proteinexpressionsmusters in den Western Blot Analysen (Abbildung 15B) sowie keine Veränderungen des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen (Abbildung 15A).

Ergebnisse

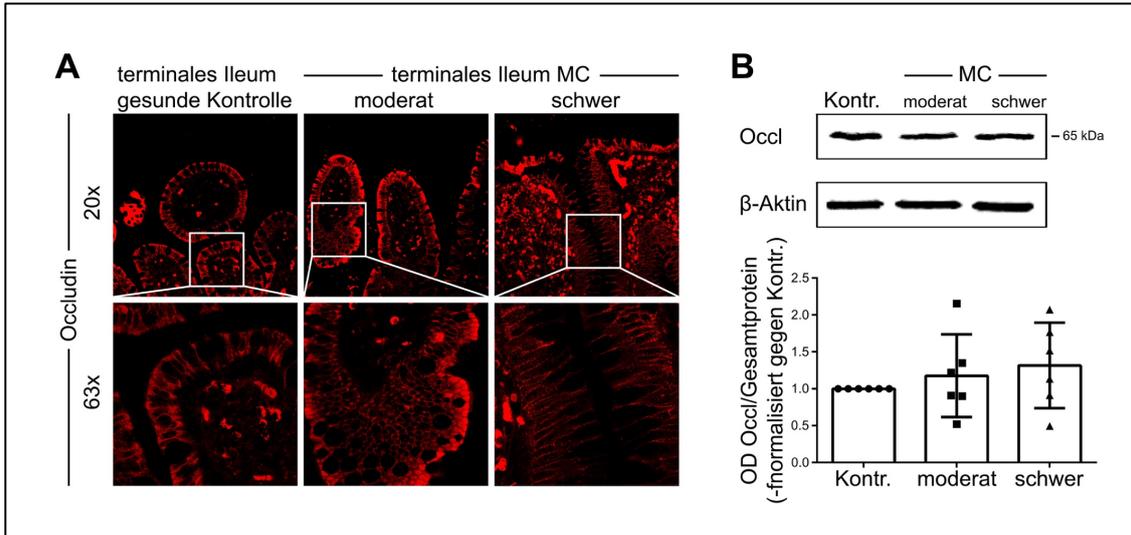


Abbildung 15: Occludin zeigt keine Änderungen in CED

Die in Abbildung 15 zu sehende Immunfluoreszenzmikroskopie (A) und Western Blot Analysen (B) zeigen keine signifikanten Änderungen im Protein- verteilungs- und expressions- muster. Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung. **Occl** = Occludin.

3.2.2 Adhaerenskontakte in Patientenproben

Als Vertreter der Adhaerenskontakte untersuchten wir E-Cadherin. Wie auch bei den Occludenskontakten analysierten wir hierbei zunächst Immunfluoreszenzfärbungen sowie Western Blots. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine Reduktion der Proteinexpression in den moderat und schwer entzündeten Gewebeproben im Vergleich zu den nicht entzündeten Kontrollproben. Dies zeigte sich in den Western Blot Analysen mit einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Reduktion der optischen Dichte der Signale in den moderat und schwer entzündeten Proben. Des Weiteren zeigte sich eine weitere Reduktion der Expression in der Gruppe der schwer entzündeten Gewebe im Vergleich zur moderat entzündeten Gruppe, wobei diese Veränderung keine Signifikanz aufwies (Abbildung 16B).

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten bei Färbungen gegen E-Cadherin einen Rückgang des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen in beiden entzündeten Gruppen, wobei sich visuell ein stufenförmiger Verlust des Signals mit einer deutlichen Reduktion zwischen moderater und schwer entzündeter Gruppe zeigte (Abbildung 16A).

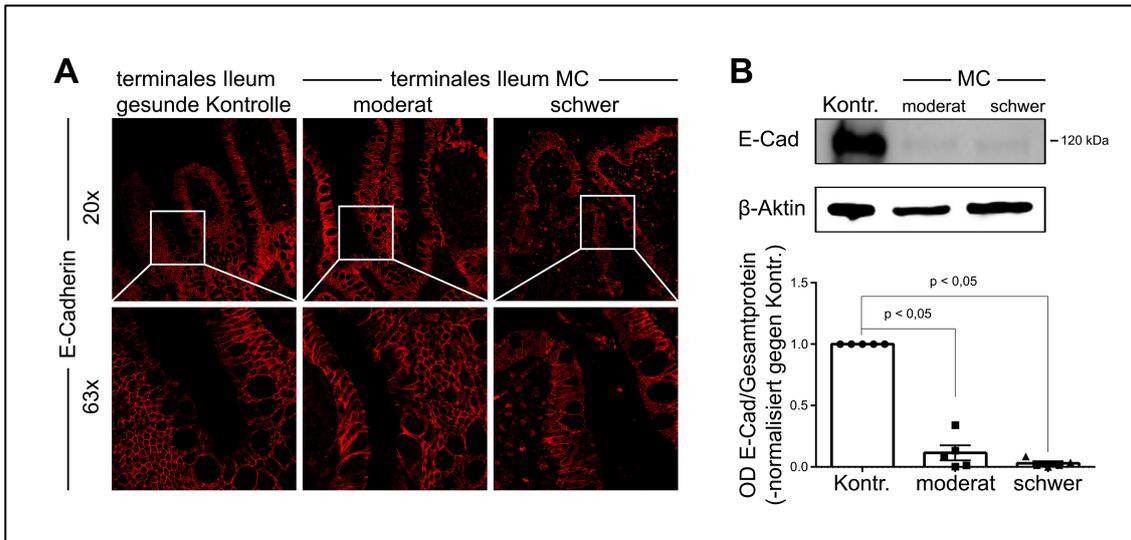


Abbildung 16: Reduktion der Proteinexpression von E-Cadherin in CED

Zu sehen ist eine deutliche, stufenförmige, Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen E-Cadherin (**A**), sowie ein quantitativ signifikanter Rückgang der Proteinexpression von E-Cadherin in der moderat und schwer entzündeten Fraktion in Western Blot Analysen (**B** unten). Passend hierzu zeigt sich ein Rückgang des Signals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ in einem repräsentativen Beispiel Western Blot (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung. **E-Cad** = E-Cadherin.

3.2.3 Desmosomen in Patientenproben

Als nächstes erfolgte die Untersuchung möglicher Veränderungen desmosomaler Proteine. Hierbei legten wir unser Augenmerk auf die beiden Cadherine Desmoglein 2 (Dsg 2) und Desmocollin 2 (Dsc 2) sowie das Armadillo-Protein α -Plakoglobin.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie bei gegen Dsg 2 gerichteter Färbung zeigte an den Zellgrenzen eine deutliche Reduktion der Signalstärke in den moderat entzündeten Gewebeproben bis hin zu einem fast vollständigen Verlust des Signals in den schwer entzündeten Geweben (Abbildung 17A). Die Western Blot Analysen zeigten und bestätigten diese Beobachtung durch eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikante Reduktion der optischen Dichte des Signals in den moderat und schwer entzündeten Gewebeproben. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den beiden Gruppen entzündeten Gewebes (Abbildung 17B).

Ergebnisse

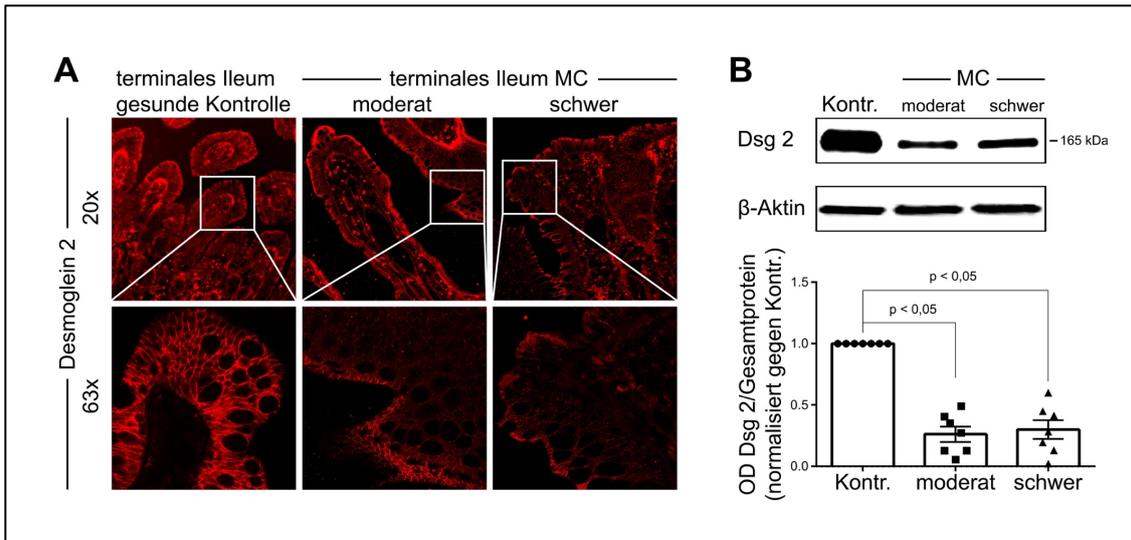


Abbildung 17: Reduktion der Proteinexpression von Desmoglein 2 in CED

Zu sehen ist eine deutliche, stufenförmige, Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen Desmoglein 2 (**A**), sowie ein quantitativ signifikanter Rückgang der Proteinexpression von Desmoglein 2 in der moderat und schwer entzündeten Fraktion in Western Blot Analysen (**B** unten). Passend hierzu zeigt sich ein Rückgang des Signals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ in einem repräsentativen Beispiel Western Blot (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung. **Dsg 2** = Desmoglein 2.

Dsc 2 zeigte in den Experimenten ähnliche Ergebnisse bezüglich der in der Immunfluoreszenzmikroskopie zu sehenden Morphologie (Abbildung 18A) sowie der Proteinexpressions-Analyse mittels Western Blot (Abbildung 18B).

Ergebnisse

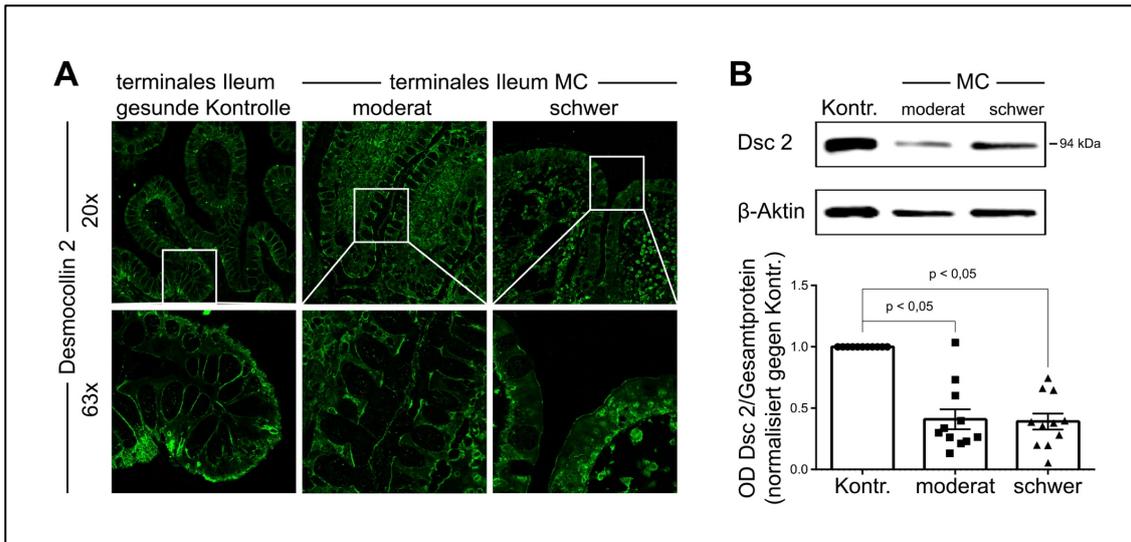


Abbildung 18: Reduktion der Proteinexpression von Desmocollin 2 in CED

Zu sehen ist wie bei Dsg 2 eine deutliche, stufenförmige, Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen Desmocollin 2 (**A**), sowie ein quantitativ signifikanter Rückgang der Proteinexpression von Desmocollin 2 in der moderat und schwer entzündeten Fraktion in Western Blot Analysen (**B** unten). Es ist jedoch kein Unterschied innerhalb dieser beiden Fraktionen zu sehen. Passend hierzu zeigt sich ein Rückgang des Signals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ in einem repräsentativen Beispiel Western Blot (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung. **Dsc 2** = Desmocollin 2.

Die für α -Plakoglobin angefertigten Untersuchungen ergaben ebenfalls eine deutliche Reduktion des Gehaltes an α -Plakoglobin an den Zellgrenzen. Dies ist in der Immunfluoreszenzmikroskopie durch eine Abnahme des Signals an den Zellgrenzen zu sehen. Im Vergleich kommt es hierbei zu einer kontinuierlichen Reduktion des Signals von den Kontrollproben bis zu den schwer entzündeten Proben (Abbildung 19A). Die angefertigten Western Blot Analysen bestätigten dieses Bild und zeigen eine signifikante Reduktion der Proteinexpression in den Gruppen der schwer und moderat entzündeten Gewebe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 19B).

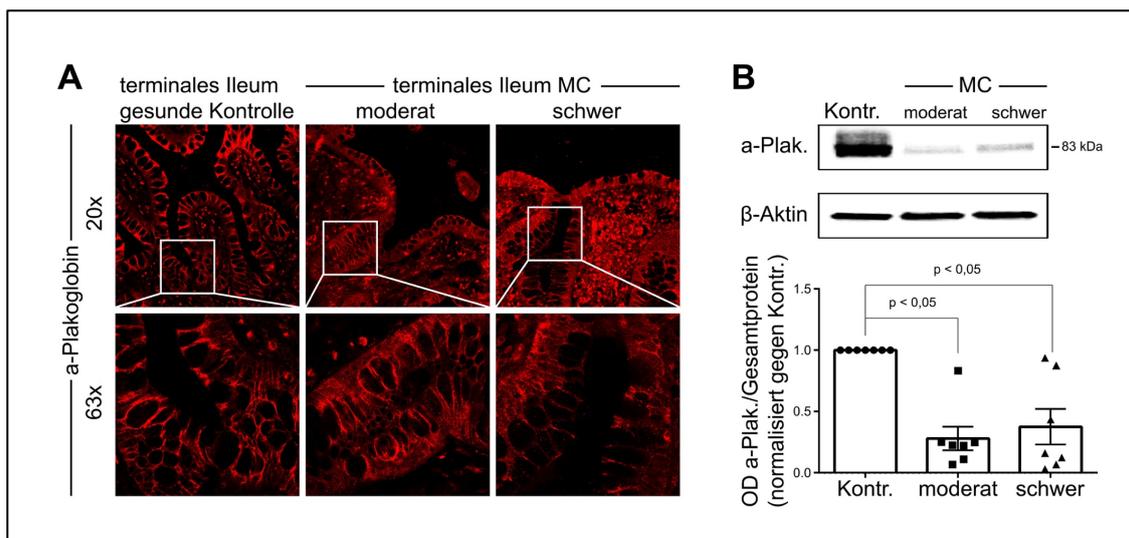


Abbildung 19: Reduktion der Proteinexpression von α -Plakoglobin in CED

Abbildung 19 zeigt eine deutliche, stufenförmige, Abnahme des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen von Kontrollgewebe zu schwer entzündetem Gewebe bei Immunfluoreszenzfärbungen gegen Desmocollin 2 (**A**), sowie ein, im Vergleich zum Kontrollgewebe, quantitativ signifikanten Rückgang der Proteinexpression von Desmocollin 2 in der moderat und schwer entzündeten Fraktion in Western Blot Analysen (**B** unten). Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied innerhalb dieser beiden Fraktionen zu sehen. Passend hierzu zeigt sich ein Rückgang des Signals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ in einem repräsentativen Beispiel Western Blot (**B** oben). Siehe Abbildung 11 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung. **a-Plak.** = α -Plakoglobin.

Zusammenfassend waren, ähnlich wie bereits in der Literatur beschrieben, in allen Patientenproben tiefgreifende Veränderungen der Junctionsproteine in den Patienten mit MC zu beobachten. Das Ausmaß der Veränderungen erschien abhängig vom Ausmaß der Entzündung und ist in den Tabelle 5:5Tabelle 66 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 5: Proteinexpressionsmuster in humanen Proben

| Grad der Entzündung | Analysierte Proteine | | |
|---------------------|----------------------|----------------|---------------|
| | Claudin 1 | Claudin 2 | Claudin 4 |
| II | 42,6% ± 12,3% | 75,2% ± 21,9% | 42,2% ± 9,7% |
| | ↓ | ↔ | ↓ |
| III | 64,8% ± 19% | 278,5% ± 86,7% | 38,7% ± 8,5% |
| | ↔ | ↑ | ↓ |
| II | Claudin 5 | Occludin | E-Cadherin |
| | 39,1% ± 16,3% | 117,6% ± 22,9% | 11,5% ± 6,1% |
| III | 19,6% ± 7,9% | 131,6% ± 23,7% | 3% ± 1,5% |
| | ↓ | ↔ | ↓ |
| II | Desmoglein 2 | Desmocollin 2 | α-Plakoglobin |
| | 26,2% ± 6,2% | 41% ± 8,2% | 27,9% ± 9,6% |
| III | 29,9% ± 7,6% | 39,2% ± 6,5% | 37,6% ± 14,6% |
| | ↓ | ↓ | ↓ |

Die Tabelle zeigt uns eine Zusammenfassung aller analysierten Proteine und die Änderungen ihrer Proteinexpression in den Western Blot Analysen verglichen mit gesunden Kontrollproben. Die Tabelle stellt dafür die Mittelwerte der optischen Dichte der Banden der humanen Proben im Vergleich zu derer der Kontrollproben in Prozent ± SEM dar. Die linke Spalte zeigt den Grad der Entzündung mit II = moderat und III = schwer an. ↑ = signifikante Hochregulation der Proteinexpression; ↓ = signifikante Herunterregulation der Proteinexpression; ↔ = keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression.

Ergebnisse

Tabelle 6: Immunfluoreszenzanalysen in humanen Proben

| Grad | Analysierte Proteine | | | | | | | | |
|------------|----------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|-------|
| | Cldn1 | Cldn2 | Cldn4 | Cldn5 | Occl | E-Cad | Dsg2 | Dsc2 | aPlak |
| II | ↓ | ↔ | ↓ | ↓↓ | ↔ | ↔/↓ | ↓ | ↓↓ | ↓ |
| III | ↓↓ | ↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↔ | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ |

Die Tabelle zeigt uns eine Zusammenfassung aller analysierten Proteine und die morphologisch sichtbaren Änderungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Die linke Spalte zeigt den Grad der Entzündungen mit **II** = moderat und **III** = schwer an. Ausgewertet wurden die Änderungen nach Beurteilung des Immunfluoreszenzsignals an den Zellgrenzen auf seine Stärke, Kontinuität und Ordnung hin, wobei für jedes dieser Parameter bis ein Punkt in halbzahligen Schritten vergeben wurde (somit maximal 3 Punkte bei voller Punktzahl erreichbar). ↓↓ = mehr als 2 Punkte weniger als Kontrollprobe; ↓ = 1-2 Punkte weniger als Kontrollprobe; ↑↑ = mehr als 2 Punkte mehr als Kontrollprobe; ↑ = 1-2 Punkte mehr als Kontrollprobe; ↔ = weniger als 1 Punkt unterschied zur Kontrollprobe. **Cldn** = Claudin; **Occl** = Occludin; **E-Cad** = E-Cadherin; **Dsg2** = Desmoglein 2; **Dsc2** = Desmocollin 2; **aPlak** = α-Plakoglobin.

3.3 Charakterisierung der Enteroide

Die Generierung der Enteroide erfolgte aus mehreren Proben. In fünf Fällen gelang es hieraus Enteroidkulturen stabil zu züchten. Die Generierung der Enteroide wurde oben im Detail erläutert. Es erfolgte nun analog zum Patientenmaterial eine detaillierte Untersuchung der Junctionsproteine.

3.3.1 Histomorphologische Untersuchung der Enteroide

Zunächst erfolgte der histomorphologische Vergleich der Enteroide, die aus gesunden Patienten und aus MC Patienten aus den Arealen mit niedriger bzw. mit hoher Entzündungsaktivität generiert worden waren. Hierfür wurden, wie bei den Patientenproben, ebenfalls H.E.-Färbungen aus Gewebeschnitten der in Paraffin eingebetteten Enteroide angefertigt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte uns in allen Fällen intakte Enteroide, die eine zirkuläre Struktur mit teilweise erkennbarem Bürstensaum aufwiesen. In den H.E.-Färbungen war kein mikroskopisch sichtbarer Unterschied im Aufbau der Mukosa zwischen den aus schwer, moderat oder nicht entzündeten Gewebeproben generierten Enteroiden zu erkennen (Abbildung 20).

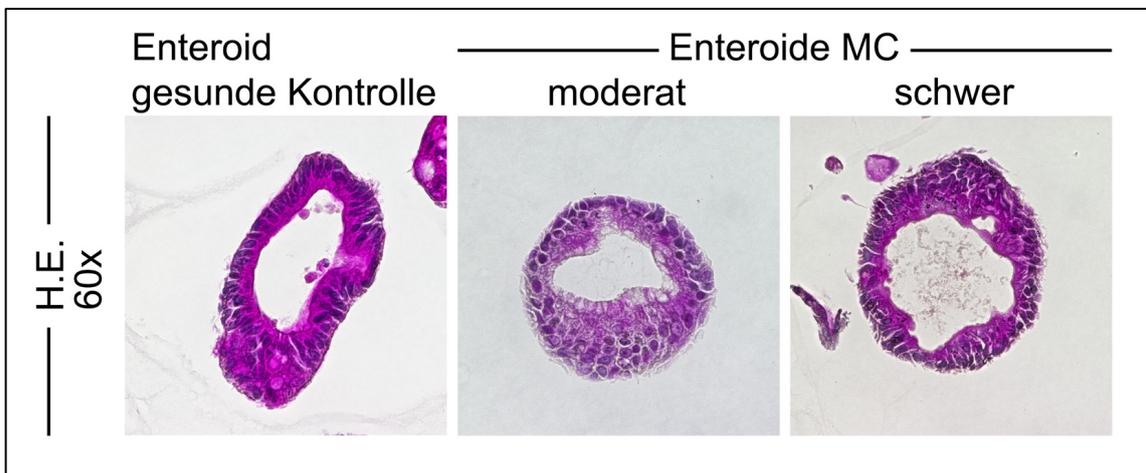


Abbildung 20: Histomorphologische Untersuchung der Enteroide

Die Abbildung zeigt H.E.-Färbungen der Enteroide in 60facher Vergrößerung. Zu sehen ist die Enteroid-typische rund-ovale Form, mit Bildung einzelner Krypten und vollständiger Ausbildung eines hochprismatischen Epithels. Von links nach rechts zu sehen sind aus gesunden sowie moderat bzw. schwer entzündeten Gewebeproben generierte Enteroide, wobei visuell kein Unterschied im Aufbau und Struktur der Epithelien erkennbar ist. **H.E.** = Haematoxylin-Eosin-Färbung; **MC** = Morbus Crohn; **60x** = 60fache Vergrößerung.

3.4 Der Schlussleistenkomplex in Enteroiden

Im nächsten Schritt erfolgt die Untersuchung der junctionalen Proteine des Schlussleistenkomplexes in den Enteroiden, um die Frage zu beantworten ob diese ein geeignetes Modell für die Barriereveränderungen bei MC sein könnten. Hierfür wurden, wie für die Gewebeproben der Patienten, Western Blots und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt.

3.4.1 Occludenskontakte in Enteroiden

Die Occludenskontakte in den Enteroiden zeigten für Claudin 1 eine regelmäßige Färbung an den Zellgrenzen in den Immunfärbungen sowie eine vergleichbare Proteinexpression in den Western Blots. Diese Verteilung war sowohl in den Enteroiden aus den gesunden Kontrollen als auch in den Enteroiden der MC Patienten vergleichbar. (Abbildung 21).

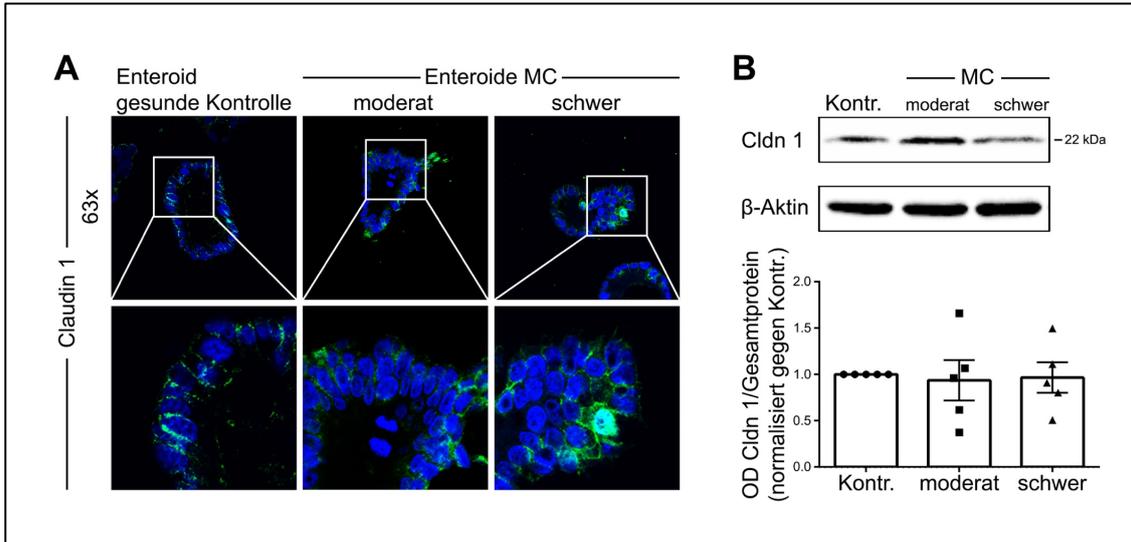


Abbildung 21: Proteinexpression von Claudin 1 in Enteroiden

Die Abbildung stellt das Proteinexpressionsmuster von Claudin 1 in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden dar. Zu sehen sind in **A** die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 63facher Vergrößerung oben sowie den markierten Bereich digital vergrößert unten. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt uns morphologisch keine Veränderungen des Fluoreszenzsignals in den aus gesundem, moderat- und schwer- entzündetem Gewebe generierten Enteroiden. Ebenfalls keine signifikanten und visuell sichtbaren Änderungen sind in **B** in den Western Blot Analysen, welche nach oben genannten Schema ausgewertet wurden (siehe Abbildung 11), und dem in **B** oben gezeigten Beispielblot zu sehen. **Enteroid gesunde Kontrolle** = aus gesundem Kontrollgewebe generierte Enteroiden; **moderat** = aus moderat entzündetem Gewebe generierte Enteroiden; **schwer** = aus schwer entzündetem Gewebe generierte Enteroiden. Für weitere Informationen zur Beschriftung siehe Abbildung 11.

Für die Claudine Claudin 4 und 5 (Abbildung 22) war das Verteilungsmuster im Vergleich zwischen den Enteroiden aus gesunden Patienten und den Enteroiden der MC Patienten unterschiedlich: Während bei den Enteroiden gesunder Patienten beide Claudine gleichmäßig an den Zellgrenzen zu sehen waren und eine kräftige Bande im Western Blot zeigten war sowohl die Immunfärbung an den Zellgrenzen als auch die Proteinmenge in den Enteroiden aus den MC Patienten signifikant reduziert. Diese Reduktion war unter Ruhebedingungen zu finden, das heißt dass keine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen unter diesen Bedingungen erfolgt war.

Ergebnisse

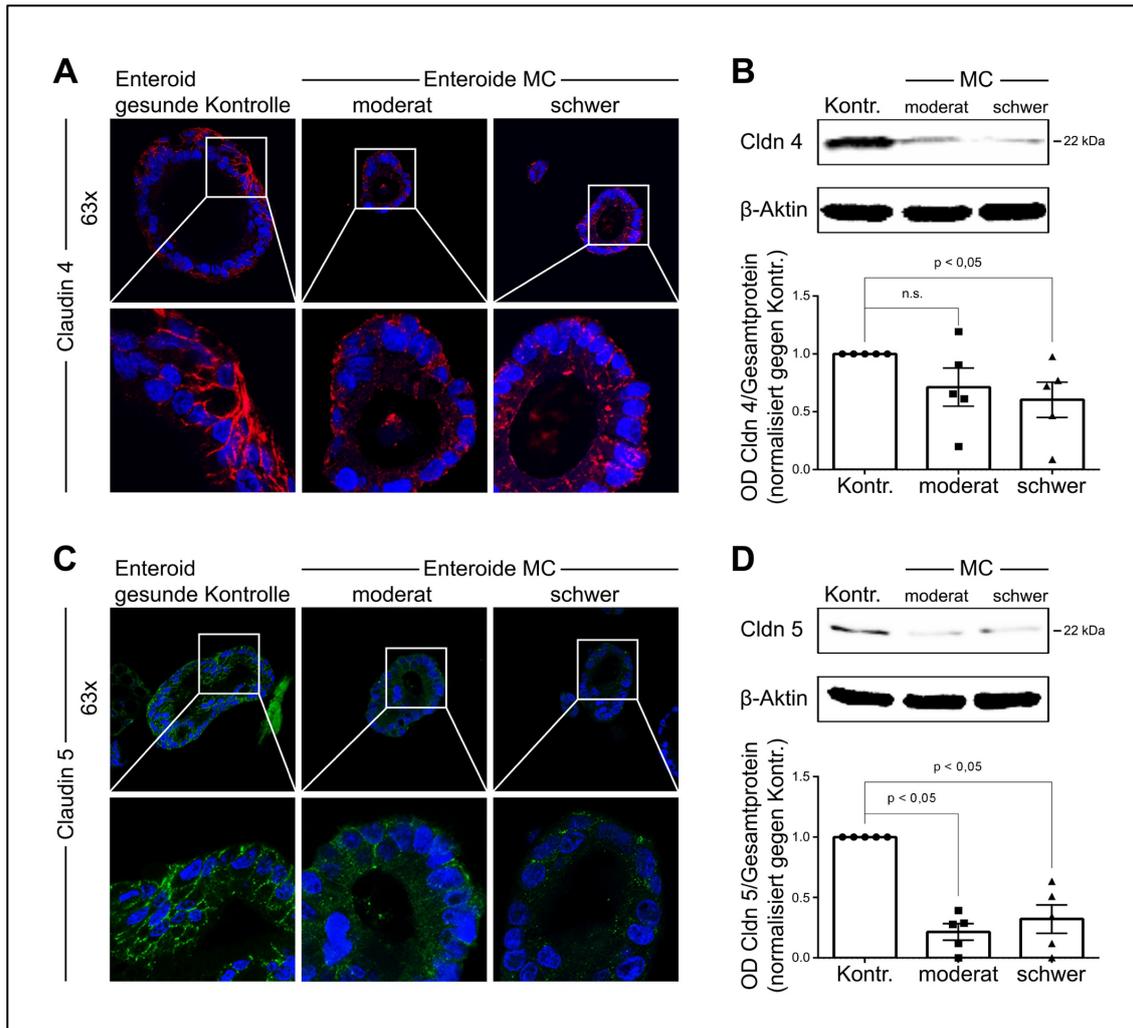


Abbildung 22: Proteinexpression von Claudin 4 und 5 in Enteroiden

Die Abbildung stellt das Proteinexpressionsmuster von Claudin 4 (**A** und **B**) und 5 (**C** und **D**) in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden dar. Zu sehen sind in **A** und **C** die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 63facher Vergrößerung oben sowie den markierten Bereich digital vergrößert unten. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt für Claudin 4 sowie 5 eine klare Reduktion der Intensität und der Klarheit des Fluoreszenzsignals in den aus MC Patientengewebe generierten Enteroiden im Vergleich zu denen aus gesundem Kontrollgewebe. Die in **B** und **D** zu sehenden Western Blot Analysen bestätigen uns diesen morphologischen Eindruck. Die in **B** unten zu sehende statistische Auswertung für Claudin 4 zeigt für die aus schwer entzündeten Gewebeproben generierten Enteroide eine signifikante Reduktion der Proteinexpression. Verdeutlicht wird dies durch den oben in **B** gezeigten Beispielblot für Claudin 4. Die in **D** unten zu sehende statistische Auswertung der Western Blot Analysen von Claudin 5 sowie der in **D** oben dargestellte Beispielblot zeigen in den aus moderat und schwer entzündeten Gewebe generierten Enteroiden eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von Claudin 5 verglichen zu den aus gesunden Gewebe generierten Kontrollenteroiden. Siehe Abbildung 11 und 21 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Ergebnisse

Für das Porenbildende Claudin 2 war in den Enteroiden aus gesunden Kontrollen nur eine minimale Immunfärbung sowie Expression im Western Blot zu sehen. Es zeigte sich jedoch in den Enteroiden aus MC Patientenproben eine sichtbare Hochregulation von Claudin 2, die bei den Enteroiden aus den Arealen schwerer Entzündung am stärksten ausgeprägt war. (Abbildung 23).

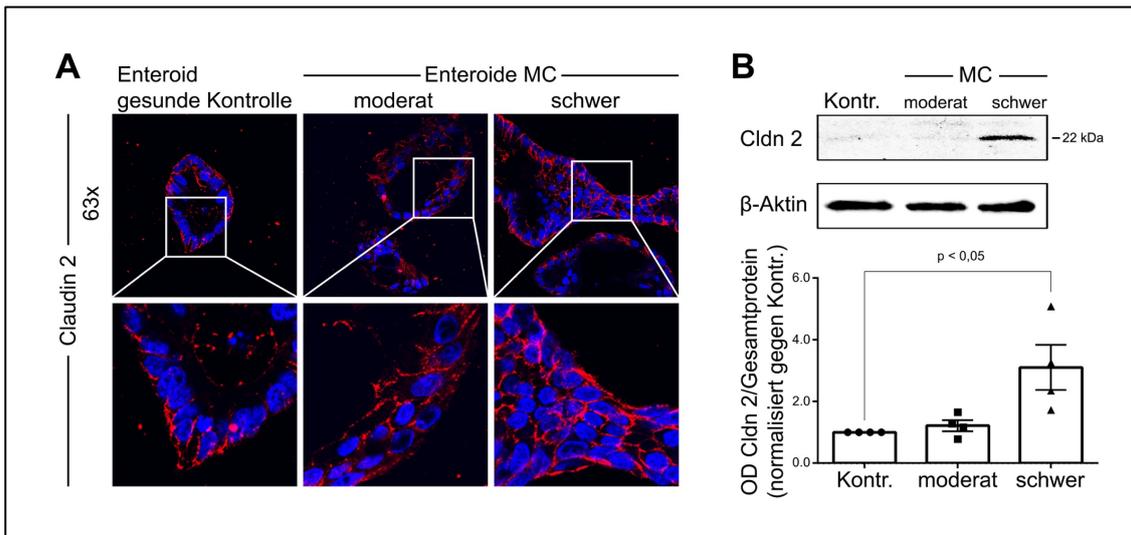


Abbildung 23: Proteinexpression von Claudin 2 in Enteroiden

Die Abbildung stellt das Proteinexpressionsmuster von Claudin 2 in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden dar. Zu sehen sind in **A** die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 63facher Vergrößerung oben sowie den markierten Bereich digital vergrößert unten. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt uns die im Text beschriebene Hochregulation in Form von verstärkten und verstärkt geordneten Fluoreszenzsignalen an den Zellgrenzen in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Hochregulation ist ebenfalls in den in **B** gezeigten Western Blot Analysen zu sehen. Die Hochregulation der Gruppe „schwer“ zeigte sich, auch zu sehen anhand der im Beispielblot sichtbaren starken Zunahme des Signals, im Vergleich zu den Kontrollgeweben in der statistischen Auswertung als deutlich signifikant. Siehe Abbildung 11 und 21 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Als zuletzt analysiertes Protein der Occludenskontakte zeigte Occludin in den Enteroiden aus gesunden Patienten und den Enteroiden aus MC Patienten ein regelmäßiges Verteilungsmuster an den Zellgrenzen in der Immunfärbung, sowie eine kräftige Proteinexpression im Western Blot. Unterschiede zwischen den Enteroiden waren hier nicht zu beobachten. (Abbildung 24).

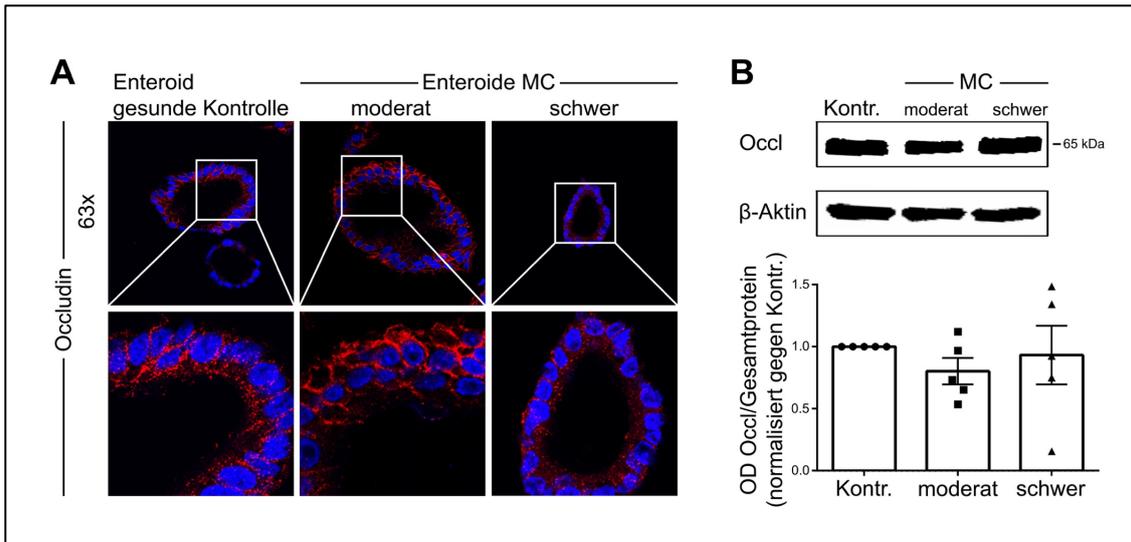


Abbildung 24: Proteinexpression von Occludin in Enteroiden

Die Abbildung stellt das Proteinexpressionsmuster von Occludin in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden dar. Zu sehen sind in **A** die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 63facher Vergrößerung oben sowie den markierten Bereich digital vergrößert unten. In der Immunfluoreszenz ist, wie im Text beschrieben, keine Änderung der Signalintensität und Lokalisation zwischen der Kontrolle und den Gruppen „moderat“ und „schwer“ entzündet zu sehen. Ebenfalls keine Änderungen zeigten uns die in **B** aufgezeigten Western Blot Analysen. Siehe Abbildung 11 und 21 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Enteroide aus gesunden Patienten alle hier getesteten Occludenskontaktproteine exprimieren und diese an den Zellgrenzen lokalisiert sind. Unerwartet zeigen die Occludensk kontakte aus Patienten mit MC unter Kulturbedingungen persistierende Veränderungen, vergleichbar mit den Veränderungen die in den ursprünglichen Patientenproben beobachtet wurden.

3.4.2 Adhaerenskontakte in Enteroiden

In gleicher Weise wurde das Adhaerenskontaktprotein E-Cadherin untersucht. Hierbei war E-Cadherin sowohl bei den Enteroiden aus gesunden Patienten als auch bei den Enteroiden aus Patienten mit MC gleichartig an den Zellgrenzen verteilt mit kräftiger Proteinexpression im Western Blot. Unterschiede zwischen den Enteroiden zeigten sich in diesen Untersuchungen für E-Cadherin nicht (Abbildung 25).

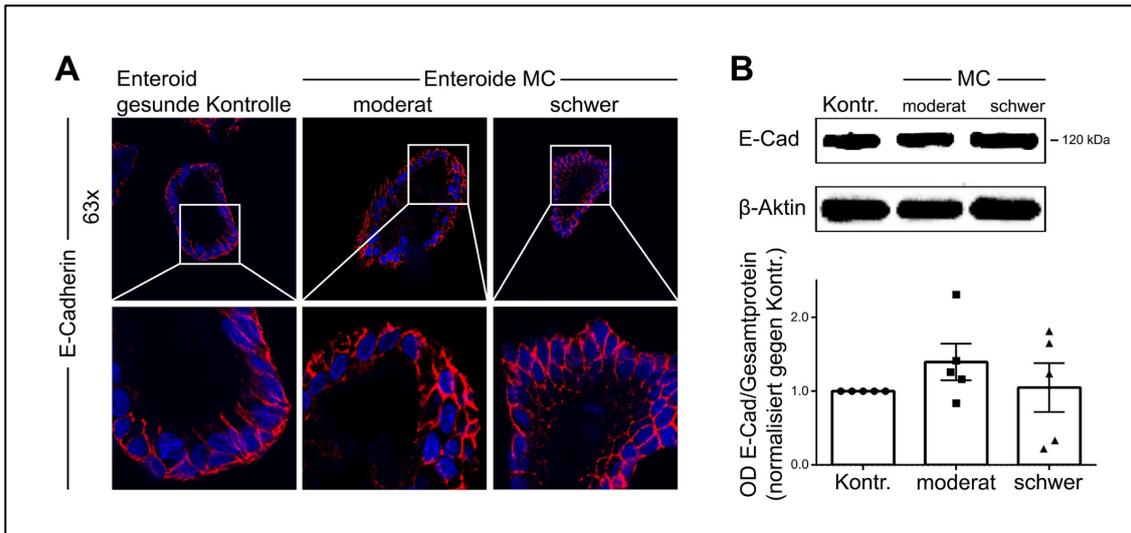


Abbildung 25: Proteinexpression von E-Cadherin in Enteroiden

Die Abbildung stellt das Proteinexpressionsmuster von E-Cadherin in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden dar. Zu sehen sind in **A** die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 63facher Vergrößerung oben sowie den markierten Bereich digital vergrößert unten. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt uns, wie im Text beschrieben, keine morphologisch sichtbaren Veränderungen in Stärke und Ordnung des Fluoreszenzsignals in den Gruppen „moderat“ und „schwer“ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls keine sichtbaren und signifikanten Änderungen zeigten sich in den in **B** gezeigten Western Blot Analysen. Siehe Abbildung 11 und 21 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

In den Analysen der Adhaerenskontakte zeigte sich, dass alle untersuchten Proteine in den Enteroiden aus gesunden Patienten sowie MC Patienten exprimiert werden. Im Gegensatz zu den ursprünglichen Patientenproben zeigten sich jedoch keine fixierten Änderungen der Expression von E-Cadherin zwischen den Enteroiden aus MC Patienten und gesunden Patienten.

3.4.3 Desmosomen in Enteroiden

Die desmosomalen Proteine Dsg 2, Dsc 2 und α -Plakoglobin waren in den Enteroiden aus gesunden Patienten wieder gleichmäßig an den Zellgrenzen verteilt. Bei den aus MC Patienten generierten Enteroiden waren in den Immunfärbungen eine deutliche Reduktion von Dsg 2, Dsc 2 und α -Plakoglobin zu beobachten. Dies zeigte sich auch in den Western Blot Analysen, in welchen sich die Proteinmenge aller drei Proteine deutlich reduziert zeigt. (Abbildung 26 A und B). (Abbildung 26 E und F).

Ergebnisse

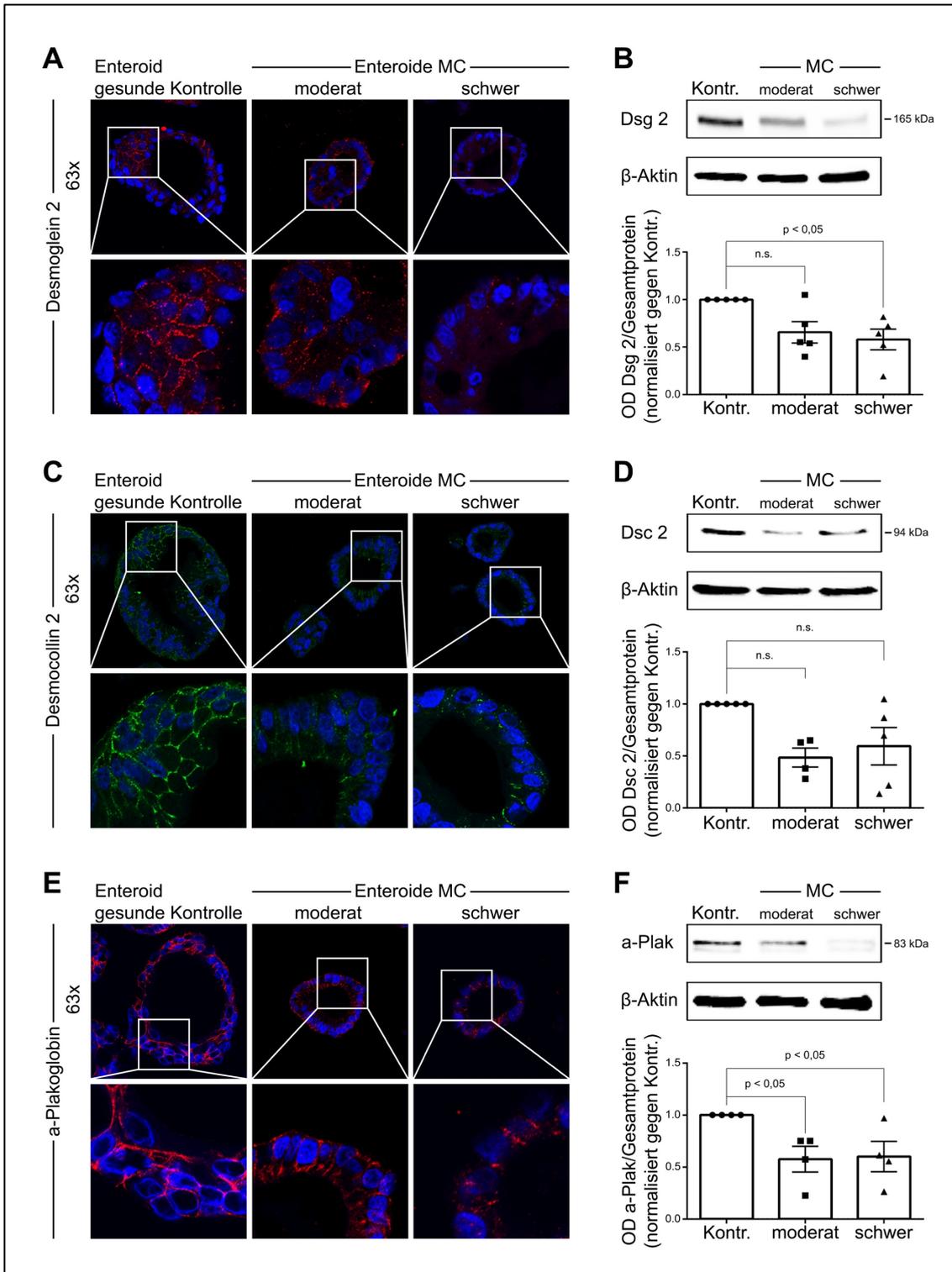


Abbildung 26: Proteinexpression von Dsg 2, Dsc 2 und α -Plakoglobin in Enteroiden

Die Abbildung stellt das Proteinexpressionsmuster von Dsg 2 (A und B), Dsc 2 (C und D) und α -Plakoglobin (E und F) in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden dar. Zu sehen sind in A, C und E die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 63facher Vergrößerung oben sowie den markierten Bereich digital vergrößert unten. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt für Dsg 2, Dsc 2 sowie α -

Ergebnisse

Plakoglobin eine klare Reduktion der Intensität und der Klarheit des Fluoreszenzsignals in den aus Patientengewebe generierten Enteroiden im Vergleich zu denen aus gesundem Kontrollgewebe. Die in **B**, **D** und **F** zu sehenden Western Blot Analysen bestätigen uns diesen morphologischen Eindruck. Die in **B** unten zu sehende statistische Auswertung für Dsg 2 zeigt für die aus schwer entzündeten Gewebeproben generierten Enteroide eine signifikante Reduktion der Proteinexpression. Verdeutlicht wird dies durch den in **B** oben gezeigten Beispielblot für Dsg 2. Die in **D** unten zu sehende statistische Auswertung der Western Blot Analysen von Dsc 2 sowie der in **D** oben dargestellte Beispielblot zeigen in den aus moderat und schwer entzündeten Gewebe generierten Enteroiden eine starke, aber nicht signifikante, Reduktion der Proteinexpression von Dsc 2 beider Gruppen. Die in **F** dargestellten Western Blot Analysen von α -Plakoglobin zeigen in der unten zu sehenden statistischen Auswertung in den aus moderat sowie aus schwer entzündeten Gewebeproben generierten Enteroiden eine signifikante Reduktion in der Proteinexpression, was durch den in **F** oben zu sehenden Beispielblot verdeutlicht wird. Siehe Abbildung 11 und 21 für nähere Erklärungen zur Beschriftung und Auswertung.

Zusammenfassend zeigte sich, dass alle untersuchten Junktionsproteine in den Enteroiden exprimiert werden. Darüber hinaus kam es in den Analysen zu persistierenden Veränderungen der Expressionsmuster der Junktionsproteine in Enteroiden aus MC Patienten. Die Tabellen 7 und 8 geben hierbei eine Übersicht über die oben aufgeführten Veränderungen in den Schlussleistenkomplexen der aus Patientengewebe generierten Enteroide im Vergleich zur Situation in aus gesundem Gewebe generierten Enteroiden.

Ergebnisse

Tabelle 7 Proteinexpressionsmuster in Enteroiden

| Grad der Entzündung | Analysierte Proteine | | |
|---------------------|----------------------|----------------|----------------|
| | Claudin 1 | Claudin 2 | Claudin 4 |
| II | 93,6% ± 21,9% | 121,9% ± 18,1% | 71,3% ± 16,5% |
| | ↔ | ↔ | ↔ |
| III | 96,6% ± 16,5% | 310,2% ± 73,1% | 60,5% ± 15,3% |
| | ↔ | ↑ | ↓ |
| | | | |
| II | Claudin 5 | Occludin | E-Cadherin |
| | 21,6% ± 6,9% | 80,2% ± 10,7% | 139,6% ± 24,7% |
| | ↓ | ↔ | ↔ |
| III | 32,1% ± 11,8% | 93,2% ± 23,5% | 105% ± 33% |
| | ↓ | ↔ | ↔ |
| | | | |
| II | Desmoglein 2 | Desmocollin 2 | α-Plakoglobin |
| | 65,7% ± 11,2% | 87,5% ± 39,7% | 57,6% ± 12,4% |
| | ↔ | ↔ | ↓ |
| III | 58% ± 10,8% | 59,4% ± 17,9% | 60,1% ± 14,5% |
| | ↓ | ↔ | ↓ |

Die Tabelle zeigt uns eine Zusammenfassung aller analysierten Proteine und die Änderungen ihrer Proteinexpression in den Western Blot Analysen verglichen mit Kontrollenteroiden. Die Tabelle stellt dafür die Mittelwerte der optischen Dichte der Banden der Enteroide aus entzündeten Proben im Vergleich zu denen der Kontrollenteroide in Prozent ± SEM dar. Die linke Spalte zeigt den Grad der Entzündung mit II = moderat und III = schwer an. ↑ = signifikante Hochregulation der Proteinexpression; ↓ = signifikante Runterregulation der Proteinexpression; ↔ = keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression.

Tabelle 8: Immunfluoreszenzanalysen in Enteroiden

| Grad | Analysierte Proteine | | | | | | | | |
|------------|----------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|-------|
| | Cldn1 | Cldn2 | Cldn4 | Cldn5 | Occl | E-Cad | Dsg2 | Dsc2 | aPlak |
| II | ↔ | ↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↔ | ↔ | ↓ | ↓↓ | ↓ |
| III | ↔ | ↑↑ | ↓↓ | ↓↓ | ↔ | ↔ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ |

Die Tabelle zeigt uns eine Zusammenfassung aller analysierten Proteine und die morphologisch sichtbaren Änderungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Die linke Spalte zeigt den Grad der Entzündungen mit **II** = moderat und **III** = schwer an. Ausgewertet wurden die Änderungen nach Beurteilung des Immunfluoreszenzsignals an den Zellgrenzen auf seine Stärke, Kontinuität und Ordnung hin, wobei für jedes dieser Parameter bis ein Punkt in halbzahligen Schritten vergeben wurde (somit maximal 3 Punkte bei voller Punktzahl erreichbar). ↓↓ = mehr als 2 Punkte weniger als Kontrollprobe; ↓ = 1-2 Punkte weniger als Kontrollprobe; ↑↑ = mehr als 2 Punkte mehr als Kontrollprobe; ↑ = 1-2 Punkte mehr als Kontrollprobe; ↔ = weniger als 1 Punkt unterschied zur Kontrollprobe. **Cldn** = Claudin; **Occl** = Occludin; **E-Cad** = E-Cadherin; **Dsg2** = Desmoglein 2; **Dsc2** = Desmocollin 2; **aPlak** = α-Plakoglobin.

3.5 Vergleich der Junctionsproteine in Vollwandproben und Enteroiden

Zusammenfassend ist das Verteilungsmuster der Junctionsproteine sowohl in den Immunfluoreszenzanalysen als auch in den Western Blots zwischen den gesunden Patientenproben und den Enteroiden aus diesen Proben vergleichbar. Unerwartet zeigt sich, dass auch die Verteilungsmuster der Junctionsproteine, vor allem für die Occludenskontakte und für die desmosomalen Proteine, in den Vollwandproben der MC Patienten und der daraus generierten Enteroiden fast identisch sind. Lediglich E-Cadherin und Claudin 1 verhielten sich nicht kongruent in Vollwandresektaten und Enteroiden. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass die bei den Patienten beobachteten Veränderungen in den Enteroiden memoriert sind.

Um diesen Eindruck besser zu veranschaulichen erfolgte in Tabelle 99 abschließend eine zusammenfassende und vergleichende Analyse zwischen den Vollwandresektaten und den Enteroiden.

Ergebnisse

Tabelle 9: Vergleich der Verteilungsmuster analysierter Junktionsproteine

| Protein | Gesunde Kontrolle | | Moderate Entzündung | | Schwere Entzündung | |
|---------|-------------------|-----|---------------------|-----|--------------------|-----|
| | Res | Ent | Res | Ent | Res | Ent |
| Cldn1 | • | • | ↓ | ↔ | ↔ | ↔ |
| Cldn2 | ◦ | ◦ | ↔ | ↔ | ↑ | ↑ |
| Cldn4 | • | • | ↓ | ↔ | ↓ | ↓ |
| Cldn5 | • | • | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Occl | • | • | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ |
| E-Cad | • | • | ↓ | ↔ | ↓ | ↔ |
| Dsg2 | • | • | ↓ | ↔ | ↓ | ↓ |
| Dsc2 | • | • | ↓ | ↔ | ↓ | ↔ |
| aPlak | • | • | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |

Die Tabelle zeigt eine zusammenfassende und vergleichende Analyse der Verteilungsmuster der Junktionsproteine zwischen Vollwandresektaten und Enteroiden. Der Vergleich wurde quantitativ anhand der ausgewerteten Western Blot Analysen vollzogen und berücksichtigt somit nicht den morphologischen Eindruck der Immunfluoreszenzanalysen. Zu sehen ist, dass in Enteroiden aus Kontrollpatienten alle Junktionsproteine unter basalen Bedingungen identisch zu den korrespondierenden Vollwandresektaten exprimiert werden. Darüber hinaus sind einige der in den Vollwandresektaten vollzogenen Veränderungen ebenfalls in den korrespondierenden Enteroiden persistierend zu sehen. Dies ist insbesondere im Zustand der schweren Entzündung sowie bei Occludenskontakt- und desmosomalen Proteinen der Fall. **Cldn** = Claudin; **Occl** = Occludin; **E-Cad** = E-Cadherin; **Dsg2** = Desmoglein 2; **Dsc2** = Desmocollin 2; **aPlak** = α -Plakoglobin; **Res** = Vollwandresektat; **Ent** = Enteroid.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Charakterisierung der Veränderungen des Schlussleistenkomplexes und damit der Darmepithelbarriere bei Patienten mit MC im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorgenommen. Diese Analyse wurde ergänzt durch eine Charakterisierung der gleichen Junctionsproteine an den aus identischen Patientenproben generierten Enteroidkulturen. Ziel war es zu untersuchen, ob Enteroide ein geeignetes Modell zur Charakterisierung der bei MC beobachteten Veränderungen sein könnten.

Es wurde im ersten Schritt in der histopathologischen Untersuchung nachgewiesen, dass es sich bei allen Proben aus den Humanen Vollwandresektaten der Patienten mit MC um Proben aus schwer (Median = 3) sowie moderat (Median = 2) entzündetem Gewebe handelte. Somit bestätigte sich in der mikroskopischen Untersuchung der intraoperativ makroskopisch sichtbare Unterschied in der Schwere der Entzündung im Zentrum des Resektates von derer im Rande des Resektates. Als nächstes wurde dargestellt, dass als Korrelat zum klinisch beobachtbaren Verlust der Integrität der Darmbarriere Veränderungen in der Quantität der epithelialen Junctionsproteine in den humanen Vollwandresektaten zu sehen sind. Dies wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot Analysen gegen Claudin 1, 2, 4, 5, Occludin, E-Cadherin, Dsg 2, Dsc 2 und α -Plakoglobin untersucht. Claudin 1,4,5, E-Cadherin, Dsg 2, Dsc 2 und α -Plakoglobin durchliefen dabei in den humanen Vollwandproben eine signifikante Herunterregulation, was für Dsc 2 und α -Plakoglobin in MC dabei erstmals gezeigt wurde. Einzig Claudin 2 durchlief eine signifikante Hochregulation. Occludin hingegen durchlief keine Veränderungen.

Diese in den humanen Proben durchgeführten Untersuchungen wurden in gleicher Weise in Enteroiden durchgeführt. Dabei zeigten sich für alle genannten Proteine, bis auf Claudin 1 und E-Cadherin, identische Verteilungsmuster

bezüglich der Herunter- wie Hoch- Regulation. Claudin 1 sowie E-Cadherin vollzogen hingegen, wie auch Occludin, in den Enterozyten keine Änderungen. Diese Beobachtung zeigte zum einen, dass der Verlust der Integrität der Darmbarriere ein auf Proteinebene beobachtbares Korrelat besitzt, sowie zum anderen, dass dieses Korrelat auf nahezu gleiche Weise in den unstimulierten Enterozyten zu sehen ist. Somit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass Enterozyten als adäquates Modell zur Abbildung der Darmbarriere mitsamt ihren Änderungen während chronisch-inflammatorischer Stimuli dienen. Interessanterweise zeigt sich bei diesen Untersuchungen auch, dass die meisten Veränderungen in den Enterozyten unter Kulturbedingungen persistieren und damit die Junctionalproteine bei Patienten mit MC auch ohne die anhaltende Präsenz proinflammatorischer Stimuli nachhaltig verändert sind.

4.1 Die Entzündungsaktivität unterscheidet sich in Gewebeproben unterschiedlicher Lokalisation

Zum besseren Verständnis und zur genauen Analyse der Veränderungen der Quantität der Junctionalproteine ist eine Objektivierung der lokalen Entzündungsstärke des untersuchten Darmabschnitts essentiell. Bei Patienten mit MC ist das terminale Ileum, genauer der Ileozäkale Übergang, als Hauptentzündungsort sowie Ort der maximalen Entzündung bekannt (Crohn et al., 1952). Die für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen verwendeten Proben stammten demnach allesamt aus dem terminalen Ileum. Ebenfalls ist bekannt, dass die Entzündungsstärke bei MC segmental verläuft, und somit schon Proben der Resektionsränder des punctum maximum der Entzündung weniger starke Entzündungszeichen aufweisen können (Crohn et al., 1952).

Durch die Gegenüberstellung der Proben aus dem Zentrum sowie den Resektaträndern tätigten wir eine Unterteilung der Proben in schwer und moderat entzündete Gewebe. Um diese Unterteilung zu verifizieren und die Entzündungsstärke aller unserer Proben zu objektivieren, modifizierten wir ein Bewertungssystem zur Objektivierung der Entzündungsstärke von Colitis Ulcerosa von Truelove und Richards (Truelove and Richards, 1956) und

analysierten die Proben nach oben genanntem Schema durch einen verblindeten Untersucher. Die ermittelte mediane Entzündungsstärke von 3 in den Resektaten des Entzündungszentrums zeugten von einem schweren lokalen Entzündungsgeschehen. Der Median von 2 in den Proben der Resektatränder zeigte uns eine deutlich abgeschwächte, moderate Entzündungsaktivität in diesen Proben. Nachdem in der Literatur mehrfach die Proben-Gruppen moderat und schwer beziehungsweise entzündet und nicht-entzündet bei Untersuchungen der Darmbarriere bei Patienten mit MC genutzt wurden (Gassler et al., 2001; Poritz et al., 2011; Prasad et al., 2005; Weber et al., 2008), belegte diese, durch das angewandte Klassierungssystem histologisch gewonnene, Einteilung nun die Richtigkeit dieser Gruppierung der unterschiedlich schwer entzündeten Gewebe.

Zusammenfassend lässt sich dabei sagen, dass in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen der intestinalen Junktionsproteine an Proben untersucht wurden, welche sich signifikant in ihrer Entzündungsaktivität unterscheiden. Somit sind die gewonnen und genutzten Proben geeignet, um eine detaillierte Darstellung des Verlustes der Darmbarriere zu generieren, sowie um Korrelationen zwischen Entzündungsstärke und Morphologie sowie Proteinexpression der Junktionsproteine nachzuvollziehen.

4.2 Die Junktionsproteine durchlaufen quantitative Veränderungen während einer chronischen Inflammation

In der bisherigen Literatur wurden die Veränderungen der intestinalen Junktionsproteine bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Individuen ausführlich beschrieben. Hierbei war der Fokus vor allem auf die Occludenskontakte gelegt. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Occludenskontakte zeigen in der Literatur jedoch kein homogenes Bild. So zeigen sich für Claudin 1 kontroverse Daten. Steigerung wie Senkungen der Expression wurden beschrieben. So berichten Weber et al. von einer Steigerung der Expression im Darmgewebe von Patienten (Weber et al., 2008). Poritz et al. untermauern dies durch eine Steigerung der Expression von Claudin 1 in IEC-18

Dündermzell-Kulturen bei einer Stimulation mit dem Zytokin TNF- α (Poritz et al., 2011). Allerdings wurden darüber hinaus auch Senkungen der Expression beschrieben, wie beispielhaft durch Spindler et al. 2015 gezeigt (Spindler et al., 2015). Die aktuellen Untersuchungen zeigten im Vergleich eine signifikante Reduktion der Expression von Claudin 1 sowie Reduktion der Intensität des Fluoreszenzsignals an den Zellgrenzen der Enterozyten in schwer sowie moderat entzündeten Gewebeproben (Abbildung 11). Die Occludenskante Claudin 2, 4 und 5 scheinen dabei einem konstanten Muster in chronischen Inflammationen zu folgen. So zeigten Heller et al. für Claudin 2 eine deutlichen Zunahme der Expression (Heller et al., 2005), sowie Prasad et al. und Zeissig et al. eine Reduktion der Expression von Claudin 4 und 5 (Prasad et al., 2005; Zeissig et al., 2007). Die beobachtbare Reduktion der Expression von Claudin 4 und 5 (Abbildung 12 und Abbildung 13), sowie die Steigerung der Expression von Claudin 2 während einer CED zeigte sich dabei in unseren Experimenten wie in der Literatur signifikant (Abbildung 14). Claudin 2 zeigt dabei jedoch erst ab der Gruppe „schwer entzündet“ einen Anstieg. In der Gruppe „moderat“ entzündet wie in der Kontrollgruppe ist dagegen nahezu keine Expression von Claudin 2 feststellbar, was uns zeigt, dass für die vermehrte Expression von Claudin 2 eine starke Entzündung von Nöten ist. Einzig Occludin zeigte keine Änderungen in der Expression, weder in unseren Experimenten (Abbildung 15) noch in bereits publizierten Daten (Weber et al., 2008).

Ein weiteres Junktionsprotein, für welches es widersprüchliche Daten bezüglich möglicher Veränderungen im Rahmen der Inflammation gibt ist E-Cadherin. Die Arbeitsgruppe um Gassler et al. zeigte in ihren Studien für die mRNA Expression von E-Cadherin eine nicht signifikante Änderung (Gassler et al., 2001). In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen mit den humanen Vollwandresektaten zeigte sich für E-Cadherin jedoch eine starke und signifikante Reduktion in allen Gruppen, wobei es je nach Ausprägung der Entzündung zu unterschiedlich starken Verlusten kam (Abbildung 16).

Die für die desmosomalen Proteine gezeigte Reduktion ihrer Expression verhält sich ebenfalls kongruent zu bereits publizierten Daten. So vollzieht Desmoglein 2 eine Reduktion (Abbildung 17), was auch Meir et. al und Spindler et. al zeigten

(Meir et al., 2019; Spindler et al., 2015). α -Plakoglobin und Desmocollin 2 hingegen sind bis jetzt wenig untersuchte Junktionsproteine. Für Desmocollin 2 zeigten aktuell publizierte Daten widersprüchliche Ergebnisse. So konnte zu einem in Dsc 2 defizienten Mäusen mit einem permanenten Knockout weder eine erhöhte Permeabilität des Darms noch eine erhöhte Anfälligkeit für die durch DSS ausgelöste Kolitis festgestellt werden (Gross et al., 2018). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einem induzierbaren Knockout von Dsc 2 in den Enterozyten eine beeinträchtigte und verlangsamte mukosale Wundheilung nach einer durch Biopsie induzierten Dickdarm-Schädigung. Darüber hinaus zeigten diese Mäuse eine langsamere Erholung von einer durch DSS ausgelösten Kolitis als die Kontroll-Tiere (Flemming et al., 2020). Diese Beobachtungen konnten durch in-Vitro Analysen an humanen intestinalen Zellkulturen bestätigt werden. Hier zeigte sich nach induziertem Dsc 2 Knockout eine verzögerte Zell-Migration und Wundheilung in einem sogenannten scratch wound-healing-assay (deut.: kratz Wundheilungstest). Dies ging in der Zellkultur mit verminderter Expression von Integrin β_1 und β_4 sowie verminderten Aktivität der kleinen GTPase Rap1 einher. Diese Analysen lassen vermuten, dass der dauerhafte Verlust von Dsc 2, im Gegensatz zum Verlust von Dsg 2, gut kompensiert werden kann. Der akute Verlust von Dsc 2 die intestinale Barrierefunktion und insbesondere die mukosale Heilung jedoch beeinträchtigt (Flemming et al., 2020; Schlegel et al., 2020).

Unsere Ergebnisse zeigten signifikante Reduktionen der Expression von Desmocollin 2 in den Gruppen „moderate“ und „schwere“ Entzündung (Abbildung 18). Die Rolle von α -Plakoglobin für den Erhalt der Darmbarriere ist noch unklar. Einzig die von Gassler et. al publizierte Daten zeigten Änderung der Expression von α -Plakoglobin während einer CED, mit dem Fokus auf CU. Sie stellten eine Reduktion der Expression in den schwer entzündeten Gewebeproben dar (Gassler et al., 2001). Diese Reduktion zeigten wir nun erstmals in einer größeren Serie von Patienten mit MC im terminalen Ileum (Abbildung 19), wobei die Folgen des Verlustes für die Darmbarriere noch abschließend geklärt werden müssen. α -Plakoglobin ist als Mitglied der Armadillo-Proteine, wie β -Catenin ebenfalls, wichtig für die Zell-Zell-Kommunikation (Aktary et al., 2017; Peifer et al., 1992).

α -Plakoglobin übernimmt jedoch im Vergleich zu β -Catenin andere Aufgaben. So ist β -Catenin, als Mitglied des Wnt-Signalwegs, bekannt durch sein Onkogenes-Potential und somit Teil der Pathogenese von kolorektalen Karzinomen (Aktary and Pasdar, 2012). α -Plakoglobin hingegen übernimmt antagonistische Funktionen und wirkt folglich als Tumorsuppressor (Simcha et al., 1996). Diese Erkenntnisse und die erhöhten Tumorinzidenzen (Inzidenzrate für kolorektale Karzinome = 1,69, Inzidenzrate für Dünndarm Karzinome = 17,4) bei Patienten mit MC (Bernstein et al., 2001), sowie die signifikante Reduktion des antagonistisch wirkenden Proteins in Gewebeproben von Patienten mit aktivem MC, lassen mögliche Rückschlüsse auf die Ursache dieser hohen Inzidenzen zu. Gestärkt wird diese Hypothese dadurch, dass neben den in Patienten mit CU im Vergleich zu MC noch höheren Tumorinzidenzen für kolorektale Karzinome (Inzidenzrate = 2,75) (Bernstein et al., 2001) die in der Literatur beschriebenen Verluste für α -Plakoglobin in Proben von Patienten mit CU ebenfalls stärker ausgeprägt sind (Gassler et al., 2001). Da die von uns benutzten Kontrollpatienten zu einem großen Anteil an einem kolorektalem Karzinom litten (10 von 14) muss, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen und für eine genauere Betrachtung dieses möglichen Pathomechanismus, eine Kontrollgruppe generiert werden, welche weder an einer CED noch an einem kolorektalem Karzinom leidet. Des Weiteren wäre es wichtig, die Expression von β -Catenin in Patienten mit MC und CU zu untersuchen.

Letztendlich lässt sich zusammenfassen, dass eine chronische Entzündung, wie sie bei einem MC vorliegt, als Korrelat Änderungen in der Expression der Junctionsproteine des Schlussleistenkomplexes aufzeigt.

4.2.1 Enteroide bilden histomorphologisch kleine Duplikate des Magen-Darmtraktes

Der Mangel an etablierten Modellen des MDT kann deutlich vor Augen geführt werden anhand der Zahl von 1,5 Millionen Todesfällen im Jahr 2000 aufgrund von Durchfall Erkrankungen (Victoria et al., 2000; Yu et al., 2017). Ein Grund für diese immer noch hohe Zahl ist die Schwierigkeit in der Entwicklung von neuen Medikamenten aufgrund von schlechten Darmbarriere-Modellen. Erst 2009

durch die Entwicklung von Enteroiden durch Clevers und sein Forschungsteam gelang die Erzeugung eines neuen vielversprechenden Modells (Sato et al., 2009). Enteroide werden aus LGR5+ Stammzellen generiert und bilden kleine Duplikate des Magen-Darmtraktes mit einer voll funktionsfähigen Mukosa (Sato and Clevers, 2013). Seit der Entwicklung und Etablierung von Enteroiden als Modell des MDT erfreuen sie sich großer Beliebtheit. So wurden bereits intestinale Enteroide aus Geweben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Sato et al., 2011b) sowie Cystischer Fibrose (Liu et al., 2012) generiert. Die Histomorphologische Betrachtung des Schlussleistenkomplexes in den Enteroiden sowie das Verhalten der Junktionsproteine in Enteroiden aus Patienten mit MC, somit während einer chronischen Inflammation, blieb bis jetzt jedoch aus. Wir konnten in der Arbeit erstmals zeigen, dass Enteroide alle die in der Arbeit untersuchten und für einen Schlussleistenkomplex relevanten Proteine exprimieren. So zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen, in den aus Patienten ohne CED generierten Enteroiden, gegen die Proteine Claudin 1, 4, 5, Occludin, E-Cadherin, Desmoglein 2, Desmocollin 2 sowie α -Plakoglobin alle deutliche und klare Fluoreszenzsignale (siehe Abbildung 11 bis Abbildung 26), sodass man von einem Vorhandensein der genannten Proteine ausgehen kann. Somit bilden Enteroide nicht nur eine voll funktionsfähige Mukosa aus (Sato and Clevers, 2013; Yui et al., 2012), sondern bilden auch eine, im Aufbau, dem menschlichen Darm gleichende Darmbarriere aus. Diese Erkenntnis über die Junktionsproteine passt dabei zu den Ergebnissen aktuelle publizierter Daten, welche zeigen, dass Enteroide die spezifischen basalen Protein-Expressionsmuster ihres Entnahmeortes beibehalten (In et al., 2016).

4.2.2 Die Verteilung der Junktionsproteine in den Enteroiden gleicht derer in den humanen Vollwandresektaten während einer CED.

Die oben aufgeführten Änderungen in der Expression und Verteilung der Junktionsproteine während einer chronischen Inflammation in humanen Gewebeproben zeigen sich größtenteils auf gleiche Art und Weise in den korrespondierenden Enteroiden (Abbildung 21 bis Abbildung 26). Wichtig zu erwähnen dabei ist, dass die Enteroide nicht mit proinflammatorischen Zytokinen

stimuliert wurden. Dies deutet an, dass die Veränderungen der Junctionsproteine, welche Gewebeproben aus Patienten mit CED aufweisen und in den korrespondierenden Enteroiden auch auffindbar sind, nicht nur unter dem akuten Einfluss proinflammatorischer Zytokine sichtbar sind. Vielmehr eröffnen sich aus dieser Beobachtung zwei Hypothesen. Zum einen, könnte der dauerhafte Einfluss proinflammatorischer Stimuli zu einer Änderung auf organ-spezifischen Stammzell-Niveau führen. Zum anderen könnte die veränderte Expression von Junctionsproteinen embryonal determiniert sein, somit seinerseits zu der chronischen Entzündung führen und der Einfluss von Zytokinen lediglich der Auslöser der Entzündung sein.

Die in der Arbeit untersuchten Proteine zeigten in den Enteroiden nicht alle identische Verteilungsmuster. So zeigte sich für Claudin 1 und für E-Cadherin in den humanen Gewebeproben und den korrespondierenden Enteroiden unterschiedliche Expressionsmuster. Claudin 1 vollzog eine signifikante Reduktion in den humanen Gewebeproben (Abbildung 11), wohingegen die Analysen der Enteroide keine signifikanten Änderungen zeigte (Abbildung 21). E-Cadherin vollzog ebenfalls eine signifikante Reduktion in den humanen Gewebeproben (Abbildung 16), wo hingegen auch hier die Enteroide keine signifikanten Änderungen zeigten (Abbildung 25). Diese beiden Proteine sind ebenfalls die Proteine, zu welchen die aktuell publizierten Daten kontroverse Ergebnisse aufzeigen. So zeigt Claudin 1 wie oben erwähnt in den Publikationen von Spindler et al. eine signifikante Runterregulation, ähnlich zu unseren Daten. Die Ergebnisse von Poritz et al. und Weber et al. hingegen zeigen Hochregulationen des Proteins während einer Inflammation. Diese Kontroverse in der Beschreibung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Verbleib und die Änderungen von Claudin 1 während einer Inflammation deutlich von der Stärke und Dauer der Entzündung abhängen. So ist eine Erklärung dafür, dass Enteroide und Gewebeprobe für das Junctionsprotein nicht das gleiche Ergebnis anzeigen, dass das inflammatorische Geschehen in den Gewebeproben teilweise so hoch ist, dass epitheliale Schäden nicht auszuschließen sind. Somit der Verlust von Claudin 1 durch einen Verlust von Enterozyten zu erklären ist. Hierfür spricht, dass Enteroide diesen Verlust nicht zeigen. Da alle in der Studie

enthaltenen Enteroide ein intaktes Epithel ausbilden, entsteht nicht die Gefahr, dass Junctionsproteine artifiziell verloren gehen. Für die beobachtete Differenz in der Expression von E-Cadherin in Gewebeproben und Enteroiden ist das gleiche Erklärungsprinzip anwendbar. Als Schlussfolgerung dieser Theorie nehmen wir an, dass Enteroide die Situation einer chronisch intestinalen Inflammation besser abbilden als Gewebeproben, da für sie nicht die Gefahr von artifiziellen Verlusten besteht.

Die Änderungen der intestinalen Junctionsproteine während einer chronischen Inflammation in Enteroiden bleiben eine Moment-Aufnahme. Enteroide in Kultur sind ein stetig wachsendes und sich veränderndes Konstrukt (Sato et al., 2011b). Die Kulturen werden nach 4-5 Tagen zu Anreicherung der Stammzellpopulation geteilt (engl. splitting) und wieder in Kultur genommen, wodurch neue Passagen erzeugt werden. Anhand dieser unterschiedlichen Passagen sind interessante Effekte zu erkennen. So nimmt der Wnt Gradient von Passage zu Passage ab (Farin et al., 2016). Ob solche Effekte auch in den Enteroiden bezüglich der Junctionsproteine zu sehen sind, bleibt Gegenstand aktueller Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurden Enteroide der MC Patienten mit einer medianen Passagezahl von 9 und Enteroide der Kontroll-Patienten mit einer medianen Passagezahl von 7,5 benutzt. Diese geringen Passagezahlen machen es unwahrscheinlich, dass solche „Verdünnungseffekte“ sichtbar werden. Somit müssen, um solche Effekte untersuchen zu können, Versuche mit einer hohen Passagezahl durchgeführt werden. Wären die beobachteten Veränderungen der Expression der Junctionsproteine dann im Folgenden rückläufig, wäre es ein Hinweis dafür, dass die Ursachen, welche zu den Änderungen der Junctionsproteine und damit der Integrität der Darmbarriere führen, unter langem Ausschluss von Zytokinen und anderen entzündungsfördernden Stoffen rückläufig sind. Würden die Änderungen jedoch konstant und weiter bestehen bleiben, wäre es ein Hinweis für die frühe genetische Determiniertheit der Expressionsmuster der Junctionsproteine.

4.2.3 Unterschiedliche Entzündungsaktivität erbringt keinen signifikanten Unterschied in der Quantität der Junktionsproteine in den humanen Vollwandlysaten und Enteroiden

Die in der vorliegenden Arbeit getätigte Gegenüberstellung von schwer und moderat entzündet erbrachte in den Western Blot Analysen keine signifikanten Unterschiede in der Quantität der Junktionsproteine. Dies kann mehrere Gründe haben. Primär ist es möglich, dass es bei Patienten mit MC innerhalb eines schwer befallenen Abschnittes des terminalen Ileums keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Junktionsproteine gibt. So zeigten Weber et al. in ihrer Publikation von 2008 ebenfalls keine Unterschiede in der Expression von Claudin 1 und 2 zwischen den unterschiedliche schwer entzündeten Crohn-Proben (Weber et al., 2008). In unserer Studie unterscheidet sich lediglich die Entzündungsstärke, bei gleichbleibend schlechter Funktion der Darmbarriere im Sinne von reduzierter oder verstärkter Expression der genannten Junktionsproteine. Diese Beobachtung wird durch die Daten der Arbeiten gestützt, welche zeigen, dass der MDT von Patienten mit MC sowohl in entzündeten als auch in nicht entzündeten Arealen eine erhöhte intestinale Permeabilität besitzt (Jäger et al., 2013; Söderholm et al., 1999a, 1999b). Aus dieser Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass die Änderungen der Expression und Quantität der Junktionsproteine nicht direkt mit der Entzündungsstärke korrelieren, sondern sie viel mehr Grundlage einer Entzündung sind – ihr somit vorausgehen könnten. Für diese Theorie sprechen die Ergebnisse in den Western Blot Analysen der korrespondierenden Enteroide. Sie zeigen ohne die vorherige Stimulation mit Zytokinen, bis auf die Proteine Claudin 1 und E-Cadherin, die gleichen Verteilungsmuster in Hoch- wie Runterregulation und ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Junktionsproteine in den Gruppen moderat wie schwer entzündet. Im Gegensatz zu der Publikation von Weber et al. widersprechen dieser Theorie allerdings viele der aktuellen Publikationen und vorausgehende Arbeiten, in welchen Unterschiede zwischen zwei definierten Gruppen unterschiedliche starker Entzündungsaktivität aufgezeigt werden (Gassler et al., 2001; Prasad et al., 2005). Eine andere Erklärung beruht auf der Aufteilung in mild, moderat und

schwer entzündet. Diese Gruppierung wurde zwar nach einem semiquantitativen Klassierungssystem getätigt. Die Einteilung letztlich wurde jedoch durch einen menschlichen Untersucher vollzogen und unterliegt dadurch subjektiven Eindrücken. Es ist somit möglich, dass die Einteilung in die Gruppen moderat und schwer entzündet nicht die absolut korrekte Entzündungsstärke des Gewebes widerspiegelt und sich aufgrund dessen in den Auswertungen keine Unterschiede in der Expression der Junktionsproteine zeigen. Zum anderen ist der Unterschied zwischen der Gruppe moderat und schwer entzündet zwar signifikant, jedoch möglicherweise nicht stark genug, um Unterschiede in der Expression der Proteine wahrzunehmen.

Die Immunfluoreszenzanalysen zeigen im Vergleich dazu häufiger Unterschiede in der Signalstärke und Ordnung zwischen den Gruppen moderat und schwer entzündet auf - sowohl in den Gewebeproben als auch in den Enteroiden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Auswertung der Immunfluoreszenzen ebenfalls von den subjektiven Eindrücken des Untersuchers abhängig ist. Eine Analyse der Immunfluoreszenzen mit Hilfe einer maschinellen Auswertung der Signalintensität würde dieses Problem umgehen und besser belastbare Daten erbringen.

4.2.4 Starker Altersunterschied in der Kontrollgruppe und Patientengruppe mit MC

Der sichtbare Altersunterschied in der Kontrollgruppe (durchschnittliches Alter = $40 \pm 3,5$) und der Patientengruppe (durchschnittliches Alter = 73 ± 3 Jahren) ist für die Arbeit von Bedeutung. Durch diesen starken Unterschied ist normalerweise die Vergleichbarkeit der zwei Gruppen untereinander geschmälert, können doch vor allem Gruppen mit gleichen biometrischen Daten gut untereinander verglichen werden. Aufgrund des Forschungsziels der vorliegenden Arbeit besteht eine andere Situation. Der untersuchte Parameter, die Junktionsproteine und ihre Änderungen während einer chronischen Inflammation, sind vor dem Hintergrund des starken Altersunterschiedes gesondert zu betrachten. Die Bedeutung des Älterwerdens in Bezug auf die Darmbarriere muss in diesem Fall hervorgehoben werden. So zeigte die Arbeit

von Tran und Greenwood-Van Meerveld von 2013, dass es im Alter zu einer Reduktion der in der Arbeit untersuchten Junktionsproteine und zu einer erhöhten Permeabilität des MDT kommt (Tran and Greenwood-Van Meerveld, 2013). In der Arbeit wurde die Permeabilität des MDT und die Quantität der Junktionsproteine ZO-1, Occludin, JAM-A und Claudin 2 in Gewebeproben von alten Pavianen (18 Jahre und älter), mit derer in Gewebeproben von jungen Pavianen (4-10 Jahre) verglichen. Das Ergebnis zeigte Verluste der Junktionsproteine ZO-1, Occludin und JAM-A sowie erhöhte Expression des porenbildenden Claudins Claudin 2. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der Permeabilität mittels einer Senkung der TEER sowie einer Erhöhung des transepithelialen Flux dargelegt werden. Die Arbeit zeigt somit, dass ein höheres Alter mit einem Verlust der Integrität der Darmbarriere einhergeht, ähnlich zu den Veränderungen während einer CED. Somit mindert das hohe Durchschnittsalter der Kontrollgruppe die Aussagekraft der Ergebnisse der Arbeit nicht. Es ist eher anzunehmen, dass bei einer jüngeren Kontrollgruppe die Ergebnisse noch eindeutiger ausfallen würden.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass aus Stammzellen von Patienten mit MC generierte Enteroide vergleichbare Veränderungen der Junktionsproteine zu den Gewebeproben der Patienten selber aufweisen. Die Veränderungen zeigen sich somit, ohne akuten Einfluss proinflammatorischer Stimuli, in einem auf Stammzellen basierenden Primärzell-Modell wieder.

5. Ausblick

Die durch diese Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse, in Bezug auf die Charakterisierung intestinaler Barriereveränderungen in Gewebeproben und korrespondierenden Enteroiden aus Patienten mit MC, leisten einen Beitrag zur Etablierung eines neuen Primärzell-Modells. Durch dieses Modell ist es möglich neue Erkenntnisse über die Pathogenese von CED sowie möglicher Behandlungsstrategien zu erlangen. So ist das sogenannte mucosal-healing (deut.: mukosale Heilung) in der momentanen Behandlung von MC eines der vorrangigen Ziele. Um diesen Prozess am besten zu unterstützen und zu fördern gilt es die Ursachen des Verlustes der Darmbarriere nachzuvollziehen und zu verstehen. Hierfür ist das im Rahmen dieser Arbeit validierte Modell der Enteroide optimal geeignet.

Zur weiteren Untersuchung und Etablierung des Modells stehen jedoch noch Funktionstest an den Enteroiden aus. So ist es wichtig die Permeabilität, somit die Funktionalität der untersuchten Schlussleistenkomplexe in Enteroiden, beispielsweise mittels TEER-Messungen sowie Flux-Messungen mit 4 kDa FITC-Dextran zu untersuchen.

Eine zentrale Erkenntnis der Arbeit ist die Veränderung in der Expression der Junctionsproteine in den unstimulierten Enteroiden, die aus Patienten mit MC generiert wurden. Sie zeigt sich überwiegend kongruent zu den Veränderungen in den Gewebeproben, obgleich Enteroide in erster Linie aus organspezifischen LGR5+ Stammzellen unter Zugabe von Wachstumsfaktoren generiert sind. Dies lässt vermuten, dass die Informationen über die Expression der Junctionsproteine auf organspezifischem Stammzell-Niveau gespeichert sind. Um diesen Sachzusammenhang genauer zu untersuchen ist es ein weiterer Schritt, Organoide aus induzierten pluripotenten Stammzellen, nach dem Protokoll von Spence et al. (Spence et al., 2011), von Patienten mit MC zu generieren. Mit diesen Organoiden müssten identische Experimente bezüglich der Expression der Junctionsproteine durchgeführt werden. Somit ließ sich

feststellen, ob die Änderungen der Expression bereits auf embryonalem Stammzell-Niveau oder erst bei Experimenten mit Organspezifischen Stammzellen sichtbar sind. Diese Unterscheidung ist wichtig, da bei einem Auftreten der Änderungen bei organspezifischen Stammzellen eine epigenetische oder anderweitig im Laufe des Lebens erworbene Veränderung der Stammzelle in Betracht kommt. Bei Experimenten mit induzierten pluripotenten Stammzellen fällt der Fokus jedoch auf eine angeborene Ursache.

6. Zusammenfassung

Der Zusammenbruch der intestinalen Epithelbarriere ist ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese von Morbus Crohn. Die Mechanismen dahinter sind jedoch noch immer ungeklärt. In dieser Arbeit wurden Enteroide dahingehend untersucht, ob sie als geeignetes In-vitro-Modell zur Analyse, der in Patientenproben beobachteten Veränderungen der intestinalen Epithelbarriere dienen.

Zunächst wurden Darmproben aus Patienten mit Morbus Crohn sowie gesunden Patienten gesammelt und Enteroide aus Stammzellen der Intestinalen Krypten einiger Patientenproben generiert. Abschließend wurden die Veränderungen der intestinalen Epithelbarriere auf proteinbiochemischer Ebene in humanen Gewebeproben und Enteroiden vergleichend untersucht und analysiert.

Die Diagnose Morbus Crohn wurde histomorphologisch bestätigt. Western Blots und Immunfluoreszenzen der Patientenproben zeigten eine signifikante Reduktion der Occludenskontakt-Proteine Claudin 1,4 und 5. Das porenbildende Claudin 2 hingegen zeigte eine erhöhte Quantität. Occludin zeigte keine Veränderung. Die desmosomalen Cadherine Desmoglein 2 und Desmocollin 2, das Armadillo-Protein α -Plakoglobin sowie das Adhaerenskontakt-Protein E-Cadherin offenbarten eine signifikante Reduktion. Es kam somit zu tiefgreifenden Veränderungen der Expressionsmuster der analysierten Junctionsproteine in den Patientenproben. Überraschenderweise spiegelten sich diese Änderungen für alle Junctionsproteine bis auf Claudin 1 und E-Cadherin, in den aus schwer entzündetem Gewebe generierten und unstimulierten Enteroiden, wider.

Die Arbeit zeigt, dass Enteroide scheinbar einige der Veränderungen der intestinalen Epithelbarriere bei Morbus Crohn auf Proteinebene in vitro beibehalten und widerspiegeln. Auf Grundlage dieses Enteroid-Modells ist es nun möglich, neue Erkenntnisse über die Pathomechanismen des Verlusts der Integrität der intestinalen Epithelbarriere zu erlangen und neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* *361*, 2066–2078.

Adachi, M., Inoko, A., Hata, M., Furuse, K., Umeda, K., Itoh, M., and Tsukita, S. (2006). Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9003–9015.

Adler, J., Rangwalla, S.C., Dwamena, B.A., and Higgins, P.D. (2011). The Prognostic Power of the NOD2 Genotype for Complicated Crohn's Disease: A Meta-Analysis. *The American Journal of Gastroenterology* *106*, 699–712.

Aktary, Z., and Pasdar, M. (2012). Plakoglobin: Role in Tumorigenesis and Metastasis. *Int J Cell Biol* *2012*.

Aktary, Z., Alaei, M., and Pasdar, M. (2017). Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget* *8*, 32270–32291.

Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K.J., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1995). Antigen-Specific Immunoabsorption of Pathogenic Autoantibodies in Pemphigus Foliaceus. *Journal of Investigative Dermatology* *104*, 895–901.

Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science* *115*, 4969–4976.

Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J. Cell Sci.* *113*, 1319.

Anastasiadis, P.Z., Moon, S.Y., Thoreson, M.A., Mariner, D.J., Crawford, H.C., Zheng, Y., and Reynolds, A.B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nature Cell Biology* *2*, 637.

Antoniou, E., Margonis, G.A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., Papalois, A., and Pikoulis, E. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann Med Surg (Lond)* *11*, 9–15.

Balda, M.S., and Matter, K. (2008). Tight junctions at a glance. *Journal of Cell Science* *121*, 3677–3682.

Balimane, P.V., and Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov. Today* *10*, 335–343.

- Barker, N., Es, J.H. van, Kuipers, J., Kujala, P., Born, M. van den, Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., et al. (2010). *Lgr5*+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell* 6, 25–36.
- Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 525–530.
- Berg, R.D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4, 430–435.
- Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D., and Hecht, G. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52, 439–451.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliever, E., and Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 91, 854–862.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9, 356–368.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7–14.
- Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C.A., Madara, J.L., Hopkins, A.M., and Nusrat, A. (2003). Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology* 171, 6164–6172.
- Buxton, R.S., Cowin, P., Franke, W.W., Garrod, D.R., Green, K.J., King, I.A., Koch, P.J., Magee, A.I., Rees, D.A., Stanley, J.R., et al. (1993). Nomenclature of the desmosomal cadherins. *The Journal of Cell Biology* 121, 481–483.
- Carmon, K.S., Lin, Q., Gong, X., Thomas, A., and Liu, Q. (2012). LGR5 Interacts and Cointernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/ β -Catenin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2054.
- Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D., and Larre, I. (2008). Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 770–793.

- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* *104*, 15.25.1-15.25.14.
- Chen, Y.-T., Stewart, D.B., and Nelson, W.J. (1999). Coupling Assembly of the E-Cadherin/ β -Catenin Complex to Efficient Endoplasmic Reticulum Exit and Basal-lateral Membrane Targeting of E-Cadherin in Polarized MDCK Cells. *J Cell Biol* *144*, 687.
- Clark, J.A., Doelle, S.M., Halpern, M.D., Saunders, T.A., Holubec, H., Dvorak, K., Boitano, S.A., and Dvorak, B. (2006). Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* *291*, G938–G949.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (Hillsdale, N.J: L. Erlbaum Associates).
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1952). Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *The American Journal of Medicine* *13*, 583–590.
- Dapson, R.W. (2007). Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotechnic & Histochemistry* *82*, 133–140.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* *163*, 525–534.
- Devriese, S., Bossche, L.V. den, Welden, S.V., Holvoet, T., Pinheiro, I., Hindryckx, P., Vos, M.D., and Laukens, D. (2017). T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem Cell Biol* *148*, 85–93.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2005). α -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* *123*, 903–915.
- 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., et al. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* *435*, 959–963.
- Fanning, A.S., Lapierre, L.A., Brecher, A.R., Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (1996). Chapter 11 Protein Interactions in the Tight Junction: The Role of MAGUK Proteins in Regulating Tight Junction Organization and Function. In *Current Topics in Membranes*, W.J. Nelson, ed. (Academic Press), pp. 211–235.
- Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells. *Gastroenterology* *143*, 1518-1529.e7.

Farin, H.F., Jordens, I., Mosa, M.H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D.V.F., de Punder, K., Angers, S., Peters, P.J., Maurice, M.M., et al. (2016). Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* 530, 340–343.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional Complexes in Various Epithelia. *The Journal of Cell Biology* 17, 375–412.

Flemming, S., Luissint, A.-C., Kusters, D.H.M., Raya-Sandino, A., Fan, S., Zhou, D.W., Hasegawa, M., Garcia-Hernandez, V., García, A.J., Parkos, C.A., et al. (2020). Desmocollin-2 promotes intestinal mucosal repair by controlling integrin-dependent cell adhesion and migration. *Mol Biol Cell* 31, 407–418.

Fujita, K., Katahira, J., Horiguchi, Y., Sonoda, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2000). Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Letters* 476, 258–261.

Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology* 16, 181–188.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology* 123, 1777–1788.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156, 1099–1111.

Garrod, D., and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 572–587.

Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermüller, N., Otto, H.F., and Autschbach, F. (2001). Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 281, G216–G228.

Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., and Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews* 13, 3–10.

Green, K.J., and Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: New Perspectives on a Classic. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 2499–2515.

Gross, A., Pack, L.A.P., Schacht, G.M., Kant, S., Ungewiss, H., Meir, M., Schlegel, N., Preisinger, C., Boor, P., Guldiken, N., et al. (2018). Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunology*.

Guindi, M., and Riddell, R.H. (2004). Indeterminate colitis. *J Clin Pathol* 57, 1233–1244.

Hampe, J., Grebe, J., Nikolaus, S., Solberg, C., Croucher, P.J., Mascheretti, S., Jahnsen, J., Moum, B., Klump, B., Krawczak, M., et al. (2002). Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *The Lancet* 359, 1661–1665.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., and Stevenson, B.R. (1998). ZO-3, a Novel Member of the MAGUK Protein Family Found at the Tight Junction, Interacts with ZO-1 and Occludin. *J Cell Biol* 141, 199.

Hatsell, S., and Cowin, P. (2001). Deconstructing desmoplakin. *Nature Cell Biology* 3, E270–E272.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37, 614–636.

Heiskala, M., Peterson, P.A., and Yang, Y. (2001). The Roles of Claudin Superfamily Proteins in Paracellular Transport. *Traffic* 2, 92–98.

Helander, H.F., and Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., et al. (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.

Herold, G. (2017). *INNERE MEDIZIN*.

Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2008). Pemphigus Vulgaris IgG Directly Inhibit Desmoglein 3-Mediated Transinteraction. *The Journal of Immunology* 181, 1825–1834.

Hollander, D. (1986). Increased Intestinal Permeability in Patients with Crohn's Disease and Their Relatives: A Possible Etiologic Factor. *Annals of Internal Medicine* 105, 883.

Horiguchi, Y., Akai, T., and Sakaguchi, G. (1987). Isolation and function of a *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment. *Infect Immun* 55, 2912–2915.

Huber, O. (2003). Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1872–1890.

Huber, A.H., Stewart, D.B., Laurents, D.V., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2001). The Cadherin Cytoplasmic Domain Is Unstructured in the Absence of β -Catenin A POSSIBLE MECHANISM FOR REGULATING CADHERIN TURNOVER. *J. Biol. Chem.* 276, 12301–12309.

Hunziker, W., Kiener, T.K., and Xu, J. (2009). Vertebrate Animal Models Unravel Physiological Roles for Zonula Occludens Tight Junction Adaptor Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 28–33.

In, J.G., Foulke-Abel, J., Estes, M.K., Zachos, N.C., Kovbasnjuk, O., and Donowitz, M. (2016). Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host–pathogen interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 633–642.

Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W., and Takai, Y. (2004). Roles and modes of action of nectins in cell–cell adhesion. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15, 643–656.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct Binding of Three Tight Junction-Associated Maguks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the CooH Termini of Claudins. *The Journal of Cell Biology* 147, 1351–1363.

Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg* 398, 1–12.

Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., and Toftgård, R. (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature Genetics* 40, 1291.

Jamur, M.C., and Oliver, C. (2010). Permeabilization of Cell Membranes. In *Immunocytochemical Methods and Protocols*, C. Oliver, and M.C. Jamur, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 63–66.

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and 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.

Kapuściński, J., and Szer, W. (1979). Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res* 6, 3519–3534.

Karayiannakis, A.J., Syrigos, K.N., Efstathiou, J., Valizadeh, A., Noda, M., Playford, R.J., Kmiot, W., and Pignatelli, M. (1998). Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *The Journal of Pathology* 185, 413–418.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., et al. (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 2465–2475.

Kim, K.-A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., et al. (2005). Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium. *Science* 309, 1256.

Koch, P.J., and Franke, W.W. (1994). Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 682–687.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics* 19, 379.

Kostrewa, D., Brockhaus, M., D'Arcy, A., Dale, G.E., Nelboeck, P., Schmid, G., Mueller, F., Bazzoni, G., Dejana, E., Bartfai, T., et al. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *The EMBO Journal* 20, 4391–4398.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293.

Laukoetter, M.G., Nava, P., Lee, W.Y., Severson, E.A., Capaldo, C.T., Babbin, B.A., Williams, I.R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J.A., et al. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 3067–3076.

Laukoetter, M.G., Nava, P., and Nusrat, A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14, 401–407.

Liu, J., Walker, N.M., Cook, M.T., Ootani, A., and Clarke, L.L. (2012). Functional Cftr in crypt epithelium of organotypic enteroid cultures from murine small intestine. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 302, C1492–C1503.

Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 113, 2363.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie: Verstehen, Lernen, Nachschlagen* (Stuttgart: Georg Thieme).

Madara, J.L. (1987). Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 253, C171–C175.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., et al. (1998). Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *The Journal of Cell Biology* 142, 117–127.

Meir, M., Flemming, S., Burkard, N., Bergauer, L., Metzger, M., Germer, C.-T., and Schlegel, N. (2015). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes barrier maturation and wound healing in intestinal epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309, G613–G624.

Meir, M., Burkard, N., Ungewiß, H., Diefenbacher, M., Flemming, S., Kannapin, F., Germer, C.-T., Schweinlin, M., Metzger, M., Waschke, J., et al. (2019). Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 129, 2824–2840.

Mitic, L.L., and Anderson, J.M. (1998). Molecular Architecture of Tight Junctions. *Annual Review of Physiology* 60, 121–142.

Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2000). Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279, G250–G254.

Morampudi, V., Bhinder, G., Wu, X., Dai, C., Sham, H.P., Vallance, B.A., and Jacobson, K. (2014). DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat. *J Vis Exp* e51297–e51297.

Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795–803.

Mustata, R.C., Loy, T.V., Lefort, A., Libert, F., Strollo, S., Vassart, G., and Garcia, M.-I. (2011). Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells ex vivo. *EMBO Reports* 12, 558–564.

Nava, P., Laukoetter, M.G., Hopkins, A.M., Laur, O., Gerner-Smidt, K., Green, K.J., Parkos, C.A., Nusrat, A., and Omary, M.B. (2007). Desmoglein-2: A Novel Regulator of Apoptosis in the Intestinal Epithelium. *MBoC* 18, 4565–4578.

Niessen, C.M., and Gottardi, C.J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 562–571.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653–660.

OECD (2010). Test No. 417: Toxicokinetics | READ online.

Oh, S., Youn, Cho, K.-A., Kang, J., Lee, Kim, K., Ho, and Woo, S.-Y. (2014). Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 33, 333–340.

- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
- Ott, C., Obermeier, F., Thieler, S., Kemptner, D., Bauer, A., Schölmerich, J., Rogler, G., and Timmer, A. (2008). The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 917–923.
- Ou, G., Baranov, V., Lundmark, E., Hammarström, S., and Hammarström, M.-L. (2009). Contribution of Intestinal Epithelial Cells to Innate Immunity of the Human Gut – Studies on Polarized Monolayers of Colon Carcinoma Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 69, 150–161.
- Ozawa, M., and Kemler, R. (1992). Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *The Journal of Cell Biology* 116, 989–996.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8, 1711–1717.
- Peifer, M., McCrea, P.D., Green, K.J., Wieschaus, E., and Gumbiner, B.M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* 118, 681.
- Perrais, M., Chen, X., Perez-Moreno, M., and Gumbiner, B.M. (2007). E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Mol. Biol. Cell* 18, 2013–2025.
- Poritz, L.S., Harris, L.R., Kelly, A.A., and Koltun, W.A. (2011). Increase in the Tight Junction Protein Claudin-1 in Intestinal Inflammation. *Dig Dis Sci* 56, 2802.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K.L., Powell, R.M., MacDonald, T.T., and Collins, J.E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory Investigation* 85, 1139–1162.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116–3120.
- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D., and Morrow, J.S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8813.

- Rousset, M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68, 1035–1040.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* 141, 397–408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol Biol Cell* 11, 4131–4142.
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., and Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 108.
- Sanders, D.S.A. (2005). Mucosal integrity and barrier function in the pathogenesis of early lesions in Crohn's disease. *J. Clin. Pathol.* 58, 568–572.
- Sarker, S., and Gyr, K. (1992). Non-Immunological defence mechanisms of the gut. *Gut* 33, 987–993.
- Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science* 340, 1190.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., Wetering, M. van de, Barker, N., Stange, D.E., Es, J.H. van, Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Sato, T., Es, J.H. van, Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., Born, M. van den, Barker, N., Shroyer, N.F., Wetering, M. van de, and Clevers, H. (2011a). Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.
- Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., van Es, J.H., van den Brink, S., van Houdt, W.J., Pronk, A., van Gorp, J., Siersema, P.D., et al. (2011b). Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772.
- Schlegel, N., Meir, M., Heupel, W.-M., Holthöfer, B., Leube, R.E., and Waschke, J. (2010). Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, G774–G783.
- Schlegel, N., Boerner, K., and Waschke, J. (2020). Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases—Lessons from experimental models and patients. *Acta Physiologica n/a*, e13492.

Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trülzsch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., et al. (2010). A Key Role for E-cadherin in Intestinal Homeostasis and Paneth Cell Maturation. *PLOS ONE* 5, e14325.

Shao, M., Ghosh, A., Cooke, V.G., Naik, U.P., and Martin-DeLeon, P.A. (2008). JAM-A is present in Mammalian Spermatozoa where it is Essential for Normal Motility. *Dev Biol* 313, 246–255.

Shay, J.W., Wright, W.E., and Werbin, H. (1991). Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 1–7.

Shi, S.R., Key, M.E., and Kalra, K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 39, 741–748.

Simcha, I., Geiger, B., Yehuda-Levenberg, S., Salomon, D., and Ben-Ze'ev, A. (1996). Suppression of tumorigenicity by plakoglobin: an augmenting effect of N-cadherin. *J. Cell Biol.* 133, 199–209.

Sjöberg, Å., Lutz, M., Tannergren, C., Wingolf, C., Borde, A., and Ungell, A.-L. (2013). Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48, 166–180.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.

Söderholm, J.D., Olaison, G., Lindberg, E., Hannestad, U., Vindels, A., Tysk, C., Järnerot, G., and Sjö Dahl, R. (1999a). Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut* 44, 96–100.

Söderholm, J.D., Peterson, K.H., Olaison, G., Franzén, L.E., Weström, B., Magnusson, K.E., and Sjö Dahl, R. (1999b). Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117, 65–72.

Spence, J.R. (2017). Taming the Wild West of Organoids, Enteroids, and Mini-Guts. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5, 159–160.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* 470, 105–109.

Spindler, V., Meir, M., Vigh, B., Flemming, S., Hütz, K., Germer, C.-T., Waschke, J., and Schlegel, N. (2015). Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 21, 2349–2359.

Staddon, J.M., Smales, C., Schulze, C., Esch, F.S., and Rubin, L.L. (1995). p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol* 130, 369.

Stanley, J.R., Yaar, M., Hawley-Nelson, P., and Katz, S.I. (1982). Pemphigus Antibodies Identify a Cell Surface Glycoprotein Synthesized by Human and Mouse Keratinocytes. *J Clin Invest* 70, 281–288.

Swank, G.M., and Deitch, E.A. (1996). Role of the Gut in Multiple Organ Failure: Bacterial Translocation and Permeability Changes. *World Journal of Surgery* 20, 411–417.

Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., et al. (1999). Nectin/PRR: An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-containing Protein. *The Journal of Cell Biology* 145, 539–549.

Takai, Y., and Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 116, 17–27.

Teahon, K., Smethurst, P., Levi, A.J., Menzies, I.S., and Bjarnason, I. (1992). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 33, 320.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354.

Tran, L., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2013). Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 68, 1045–1056.

Truelove, S.C., and Richards, W.C.D. (1956). Biopsy Studies in Ulcerative Colitis. *Br Med J* 1, 1315-1322.2.

Tsukita, S., and Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends in Cell Biology* 9, 268–273.

Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 799–809.

Ungewiß, H., Vielmuth, F., Suzuki, S.T., Maiser, A., Harz, H., Leonhardt, H., Kugelmann, D., Schlegel, N., and Waschke, J. (2017). Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Scientific Reports* 7, 6329.

Victora, C.G., Bryce, J., Fontaine, O., and Monasch, R. (2000). Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. *Bull. World Health Organ.* 78, 1246–1255.

Waschke, J., Bruggeman, P., Baumgartner, W., Zillikens, D., and Drenckhahn, D. (2005). Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest* 115, 3157–3165.

Weber, C.R., Nalle, S.C., Tretiakova, M., Rubin, D.T., and Turner, J.R. (2008). Claudin-1 and claudin-2 expression are elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest* 88, 1110–1120.

Williams, L.A., Martin-Padura, I., Dejana, E., Hogg, N., and Simmons, D.L. (1999). Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Molecular Immunology* 36, 1175–1188.

Yu, H., Hasan, N.M., In, J.G., Estes, M.K., Kovbasnjuk, O., Zachos, N.C., and Donowitz, M. (2017). The Contributions of Human Mini-Intestines to the Study of Intestinal Physiology and Pathophysiology. *Annu Rev Physiol* 79, 291–312.

Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., et al. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nature Medicine* 18, 618–623.

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72.

Zhadanov, A.B., Provance, D.W., Speer, C.A., Coffin, J.D., Goss, D., Blixt, J.A., Reichert, C.M., and Mercer, J.A. (1999). Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell–cell junctions and cell polarity during mouse development. *Current Biology* 9, 880-S2.

Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J.-L., and Rousset, M. (1985). Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of Cellular Physiology* 122, 21–29.

7.2. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: verwendete Primärantikörper | 33 |
| Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper..... | 35 |
| Tabelle 3: Kriterien der histologischen Klassifikation | 47 |
| Tabelle 4: Mann-Whitney-U-Statistik..... | 55 |
| Tabelle 5: Proteinexpressionsmuster in humanen Proben..... | 66 |
| Tabelle 6: Immunfluoreszenzanalysen in humanen Proben | 67 |
| Tabelle 7 Proteinexpressionsmuster in Enteroiden..... | 77 |
| Tabelle 8: Immunfluoreszenzanalysen in Enteroiden..... | 78 |
| Tabelle 9: Vergleich der Verteilungsmuster analysierter Junktionsproteine..... | 79 |

7.3. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Wandaufbau des Magendarmtraktes | 3 |
| Abbildung 2: Aufbau der Dünndarmwand | 4 |
| Abbildung 3: Skizze eines Schlussleistenkomplexes | 7 |
| Abbildung 4: Histologie des Morbus Crohn | 16 |
| Abbildung 5: Endoskopie-Befund Morbus Crohn | 17 |
| Abbildung 6: Der Kryptengrund | 25 |
| Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Enteroids | 28 |
| Abbildung 8: Gewinnung und Verarbeitung von Gewebeproben und Enteroiden | 32 |
| Abbildung 9: Charakteristika der Studienpatienten | 53 |
| Abbildung 10: Histomorphologische Untersuchung der Gewebeproben..... | 54 |
| Abbildung 11: Reduktion der Proteinexpression von Claudin 1 in CED..... | 57 |
| Abbildung 12: Reduktion der Proteinexpression von Claudin 4 in CED..... | 58 |
| Abbildung 13: Reduktion der Proteinexpression von Claudin 5 in CED..... | 59 |
| Abbildung 14: Hochregulation der Proteinexpression von Claudin 2 in CED.... | 60 |
| Abbildung 15: Occludin zeigt keine Änderungen in CED | 61 |
| Abbildung 16: Reduktion der Proteinexpression von E-Cadherin in CED..... | 62 |
| Abbildung 17: Reduktion der Proteinexpression von Desmoglein 2 in CED | 63 |
| Abbildung 18: Reduktion der Proteinexpression von Desmocollin 2 in CED ... | 64 |
| Abbildung 19: Reduktion der Proteinexpression von α -Plakoglobin in CED | 65 |
| Abbildung 20: Histomorphologische Untersuchung der Enteroide..... | 68 |
| Abbildung 21: Proteinexpression von Claudin 1 in Enteroiden | 70 |
| Abbildung 22: Proteinexpression von Claudin 4 und 5 in Enteroiden | 71 |
| Abbildung 23: Proteinexpression von Claudin 2 in Enteroiden | 72 |
| Abbildung 24: Proteinexpression von Occludin in Enteroiden..... | 73 |
| Abbildung 25: Proteinexpression von E-Cadherin in Enteroiden | 74 |
| Abbildung 26: Proteinexpression von Dsg 2, Dsc 2 und α -Plakoglobin in Enteroiden | 75 |

7.4. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| Ω | Ohm |
| μg | Mikrogramm |
| μL | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| μM | Mikromol |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| A. dest. | Aqua destillata |
| AF -6 | Afadin |
| APC | Adenomatosis Polyposis Coli |
| Aq. | Aqua |
| Inject. | injectabilia |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BSA | Rinder-Serum-Albumin |
| CBD | Catenin-Bindungs-Domäne |
| CED | Chronisch-entzündliche Darmerkrankung |
| cm | Zentimeter |
| cm^2 | Quadratcentimeter |
| CU | Colitis Ulcerosa |
| Cy3 | Cyanin 3 |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| darb | Donkey anti-rabbit |
| Dsc | Desmocollin |
| Dsg | Desmoglein |
| DSS | Dextran-Sodium-Sulfat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| Fc | Kristallisierbares Fragment |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| g | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| gam | Goat anti-mouse |
| garb | Goat anti-rabbit |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H.E. | Hämatoxylin-Eosin |
| HBSS | Hank's gepufferte Salz Lösung |
| IgA | Immunglobulin A |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| JAM | Junktionales Adhäsionsmolekül |
| JMD | Juxtamembranäre Domäne |
| kDa | kilo Dalton |
| L | Liter |
| LGR5+ | G-Protein gekoppelter Rezeptor 5 mit Leucin reicher Sequenz |

Anhang

| | |
|------------------|---|
| m | Meter |
| m ² | Quadratmeter |
| mA | Milliampere |
| MAGUK | Membran-assoziierten-Guanylat-Kinasen |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase |
| MC | Morbus Crohn |
| MDT | Magen-Darm-Trakt |
| mL | Milliliter |
| MLCK | Myosin-Leichtketten-Kinase |
| mM | Milimol |
| mm | Millimeter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| mRNA | Boten Ribonukleinsäure |
| ng | Nanogramm |
| NGS | Normales Ziegenserum |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomol |
| NOD2 | Nucleotid Oligomerisation Domäne 2 |
| OECD | Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung |
| p | Signifikanzniveau |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| pH | potentia Hydrogenii |
| POX | Meerrettichperoxidase |
| POX-gek. | Meerrettichperoxidase gekoppelt |
| RT-PCR | Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion |
| SDS-Page | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| SEM | Standardfehler |
| SYBR-Green | Cyanin Farbstoff |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung |
| TEER | Transepitheliale elektrische Widerstand |
| TER | Transepitheliale Widerstand |
| TNBS | 2,4,6-trinitrobenzolsulfonsäure |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TH1 | Typ-1-T-Helferzelle |
| T _{Reg} | Regulatorische T-Zellen |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| ZO | Zonula Occludens |

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Nicolas Schlegel für das Vertrauen in mich, das Überlassen des Themas sowie die tatkräftige Unterstützung und Motivation. Ohne seine Anleitung und ansteckende Begeisterung wäre das Verfassen der Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Michael Meir. Seine Hingabe zur Forschung und Unterstützung, insbesondere in der Gewebeasservierung, haben dieses Projekt überhaupt erst möglich gemacht. Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Natalie Burkhard. Insbesondere gilt dieser Dank für Ihre Einführung in die Methodik sowie Ihr offenes Ohr bei Problemen in den Versuchsreihen.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der Forschungsabteilung der experimentellen Viszeralchirurgie. Hierbei danke ich besonders Frau Veronika Heimbach für die umfassenden Antworten auf meine technischen Fragen sowie die Verkürzung der unzähligen Stunden im Labor durch Ihre herzliche Art. An dieser Stelle möchte ich weiterhin meinem „Mitdoktoranden“ Felix Kannapin für den stetigen Austausch sowie seine konstruktive und anpackende Art danken.

Voller Dank bin ich für meine Eltern. Vielen Dank für Eure bedingungslose Unterstützung. Weder mein Studium noch die Dissertation wären ohne Euch möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und insbesondere meiner Frau Sarah Elisabeth Salm. Ohne Dich hätte ich weder den Mut noch die Kraft geschweige denn die Freude gehabt, welche für solch ein Projekt von Nöten sind.

Vielen Dank!