

Aus der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Chirurgische Klinik I

Campus Benjamin Franklin

der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genexpression humaner Panethzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen:

Untersuchung antimikrobieller Peptide, des Wnt-Signalweges und von NALP-Proteinen

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Drescher

aus

Rostock

Gutachter/in:        1. : Prof. Dr. med. H.-J. Buhr  
                             2. : Prof. Dr. med. J.-D. Schulzke  
                             3. : Prof. Dr. med. A. Tannapfel

Datum der Promotion: 23.06.2013

## Inhalt

1	Einleitung .....	6
1.1	Die Panethzelle .....	6
1.1.1	Historie, Morphologie, Nachweis .....	6
1.1.2	Differenzierung .....	7
1.1.2.1	Wnt-Signalweg .....	9
1.1.3	Zellspezifische Funktionen und Syntheseprodukte .....	11
1.1.3.1	Defensine .....	11
1.1.3.2	Lysozym, Phospholipase A2, SLPI .....	12
1.1.3.3	Zellspezifische Aktivierung und intrazelluläre Signalkaskade .....	12
1.1.4	Intestinale Metaplasie und metaplastische Panethzellen .....	14
1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	15
1.2.1	Definition, Epidemiologie und Klinik .....	15
1.2.2	Pathogenese-Theorien der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	17
1.3	NALP-Proteine .....	18
1.4	Fragestellung .....	19
2	Material und Methoden .....	20
2.1	Material .....	20
2.1.1	Untersuchungsgut .....	20
2.1.2	Geräte .....	21
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.4	Reagenzien und Chemikalien .....	24
2.1.5	Lösungen und Puffer .....	25
2.1.6	Antikörper .....	27
2.1.7	Software .....	27
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Studiendesign .....	28
2.2.2	Herkunft und Bearbeitung der untersuchten Gewebe .....	28
2.2.3	Anfertigung der Gewebeschnitte .....	30
2.2.4	Immunhistochemie und Mikroskopie .....	30
2.2.5	Anfertigung der Gewebeschnitte für die Mikrodissektion .....	33
2.2.6	Färbung der Gewebeschnitte für die Mikrodissektion .....	33
2.2.7	Lasergestützte Mikrodissektion .....	35
2.2.8	DNA-Microarray .....	37

2.2.8.1	Pooling der mikrodisszierten Zellen.....	38
2.2.8.2	RNA-Amplifikation.....	39
2.2.8.3	Spektrophotometrische Messung der cDNA-Konzentration .....	39
2.2.8.4	Bestimmung der Intaktheit der cDNA .....	40
2.2.8.5	Hybridisierung der Agilent Whole Genome Oligo Microarrays® .....	40
2.2.9	Bilder- und Datenanalyse .....	42
2.2.10	Statistische Datenauswertung .....	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Immunhistochemische Untersuchung der HDEFA6-Expression.....	44
3.2	Mikrodissektion und Bildung von Untersuchungsgruppen .....	47
3.3	Konzentrations- und Qualitätsbestimmungen der cDNA.....	48
3.4	Microarray .....	51
3.4.1	Intensitätsprofile der Whole Genome Microarrays® .....	51
3.4.2	Streudiagramme der Ratio-Experimente .....	53
3.5	Genexpressionsanalyse der orthotopen und metaplastischen Panethzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	57
3.5.1	Expression von HDEFA5, HDEFA6, PLA2 und SLPI .....	57
3.5.2	Expression von Genen des WNT Signalweges .....	59
3.5.3	Expression von CED-Genen .....	65
3.5.4	Genexpression von NALP-Proteinen.....	66
4	Diskussion.....	69
4.1	Immunhistochemie .....	69
4.2	Microarray .....	70
4.2.1	Antimikrobielle Peptide .....	70
4.2.2	WNT-Signalweg .....	72
4.2.3	NALP-Proteine .....	74
4.3	Fehlerbetrachtung.....	75
5	Zusammenfassung .....	77
6	Literaturverzeichnis .....	79
7	Abkürzungsverzeichnis.....	85
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	88
9	Danksagung.....	89
10	Lebenslauf .....	90
11	Publikationsliste .....	91

12	Erklärung.....	92
13	Anhang.....	93

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Panethzelle

### 1.1.1 Historie, Morphologie, Nachweis

1872 beschrieb Gustav Schwalbe als erster die pyramidenförmigen Zellen an der Basis der Lieberkühn-Krypten im Dünndarm. Die Lieberkühn-Krypten oder Glandulae intestinales sind schlauchförmige Einsenkungen des Schleimhautepithels des Dün- und Dickdarms. Sie sind 0,2 bis 0,4 mm tief und dienen sowohl der Oberflächenvergrößerung und Sekretion als auch der Steuerung des Eisenhaushaltes. 16 Jahre später untersuchte der Österreicher Physiologe Josef Paneth diese Zellen lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer morphologischen und histochemischen Eigenschaften genauer und bezeichnete sie auch als *Enterocytus cum granulis acidophilis*<sup>1, 2</sup>.

Die reife Panethzelle ist eine Zylinderepithelzelle, die morphologisch durch ihre pyramidenstumpfähnliche Form mit apikalen Mikrovilli und basalem Nukleus gekennzeichnet ist. Ein charakteristisches Merkmal dieser Zellen sind apikale Granulae, die ins Kryptenlumen sezerniert werden können. Aufgrund von Untersuchungen hinsichtlich des Färbeverhaltens der Granula wird das Vorhandensein eines basischen Proteins im Kern angenommen<sup>3</sup>. Nach allgemeiner Auffassung ist im menschlichen Gastrointestinaltrakt das Vorkommen der Panethzellen auf die Lieberkühnkrypten des Duodenums, Jejunums und vor allem des terminalen Ileums beschränkt. Diese Panethzellen werden als *orthotop* bezeichnet. Während in früheren Arbeiten das vereinzelte Vorkommen der Panethzellen im proximalen Kolon und in der Appendix vermiformis beim Erwachsenen als physiologisch galt, wird in neueren Arbeiten die Bezeichnung der intestinalen Metaplasie im Zusammenhang mit dem Nachweis von Panethzellen außerhalb des Dünndarms verwendet<sup>3, 4</sup>.

Es wurden verschiedene histochemische Färbemethoden zum Nachweis von Panethzellen im terminalen Ileum bei Wirbeltieren entwickelt. Die gebräuchlichsten sind die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und Lendrum`s Phloxin-Tartrazin-Färbung, die jeweils saure Farbstoffe enthalten, welche mit dem basischen Kernprotein der Granulae reagieren und diesen rot färben<sup>5, 6</sup>. Weitere Methoden sind die Periodic acid-Schiff (PAS)-Färbung, Blancofor BA-Fluoreszenzfärbung sowie die Pokeweed-Lektin-Färbung<sup>7, 8</sup>. Gegenwärtig haben sich überwiegend immunhistochemische Färbungen zum Nachweis

von Panethzellen in zahlreichen Untersuchungen bewährt. Durch Kenntnis der panethzellspezifischen Syntheseprodukte können spezielle Antikörper gegen das jeweilige Produkt eingesetzt und die Zellen durch nachfolgende Färbereaktion mikroskopisch detektiert werden <sup>9</sup>.

### 1.1.2 Differenzierung

Panethzellen stammen von multipotenten intestinalen Stammzellen, die sich am Übergang von Villus und Krypte befinden. In jeder Dünndarmkrypte finden sich vier bis sechs multipotente Stammzellen, die wiederum Vorläuferzellen produzieren, welche undifferenziert in der Krypte erscheinen. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich zum einen die sekretorischen Zelllinien, zu denen die Becherzellen, die Panethzellen und die enteroendokrinen Zellen zählen. Zum anderen entwickelt sich die nicht-sekretorische Zelllinie, aus der die Enterozyten hervor gehen. Das intestinale Epithel besteht zu rund 90% aus den absorptiven Enterozyten, die für Verdauung und Absorption luminaler Nährstoffe verantwortlich sind. Die Becherzellen befinden sich gleichermaßen in Krypten und Villi und produzieren vor allem epithelprotektive Muzine. Die enteroendokrinen Zellen umfassen rund 1% des intestinalen Epithels und produzieren zahlreiche Faktoren, die lokal oder systemisch wiederum die epitheliale Differenzierung und Proliferation beeinflussen <sup>10</sup>.

Im Darm kommt es zu einer ständigen Erneuerung dieser vier epithelialen Zelltypen für deren Ablauf hauptsächlich drei Signalwege verantwortlich sind. Der Wnt-Signalweg steuert vorwiegend Proliferation und Differenzierung der intestinalen Stammzellen. Zeitlich und räumlich überlappend bestimmt die Notch-HES1-Kaskade ob die Differenzierung der einzelnen Zellen in die absorptive oder sekretorische Richtung verläuft. HES1 defiziente Tiere zeigen eine erhöhte Zahl an Mukus sezernierenden und enteroendokrinen Zellen bei gleichzeitig weniger absorptiven Zellen <sup>11</sup>. Die humanen Notch-Gene (NOTCH1, -2, -3 und -4) kodieren monomere Transmembranrezeptoren. Ihre Liganden (DELTA-like1, -3 und -4, sowie JAGGED1 und -2) stellen ebenfalls Transmembranmoleküle dar <sup>12</sup>. Für die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt über eine Ligand-Rezeptor-Interaktion notwendig. Anschließend kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des Rezeptors und zur Translokation der intrazellulären Domäne in den Zellkern, wo die Transkription der Notch-Zielgene erfolgt. Unter den Notch-Zielgenen befindet sich die Familie der *hairy enhancer of split* (HES) Repressoren, bei

denen es sich um basic helix-loop-helix (bHLH) Proteine handelt, die nachgeschaltete Zielgene regulieren. Ein Zielgen von HES1 ist der basic helix-loop-helix-Transkriptionsrepressor MATH1, dessen Expression in proliferativen Zellen im Dünndarm nachgewiesen wurde. MATH1-negative Zellen verbleiben im Vorläufer-Pool oder differenzieren sich zu Enterozyten. Aus den MATH1-exprimierenden Vorläuferzellen entwickeln sich die Panethzellen, Becherzellen und bei Vorhandensein von Neurogenin 3 die enteroendokrinen Zellen. Die Notch-Kaskade wird nur ausgelöst, wenn über die normale Aktivierung durch die Nachbarzellen hinaus verstärkt Liganden an die Rezeptoren binden. Dieses geschieht durch, im Detail noch unverstandene Mechanismen, die jedoch durch eine positive feedback Regulation schnell verstärkt werden.

Die Lage der Zellen entlang der Krypten-Villus-Achse ist abhängig vom Differenzierungsstadium der Zellen. Es kann zwischen den an der Kryptenbasis befindlichen weniger differenzierten Zellen und denen an der Spitze höher differenzierten Zellen unterschieden werden. Während der Reifung und Differenzierung wandern diese Zellen aufwärts entlang der Krypten-Villus-Achse und siedeln sich in den Villi an. Eine bedeutende Ausnahme bilden bei diesem Wanderungsprozess die Panethzellen, die abwärts in die Tiefe der Krypten wandern, was die spätere charakteristische Lage der Zellen kennzeichnet. Morphologische Veränderungen erreichen die Zellen während ihrer Wanderung von den Stammzellen in die Kryptentiefe. Wenn sie diese erreichen ist ihre Differenzierung abgeschlossen. Im Gegensatz zu den anderen intestinalen Epithelzelllinien haben Panethzellen eine längere Lebensdauer, welche durchschnittlich 20 Tage beträgt, während sie sich bei den anderen Dünndarmepithelzellen auf 3 Tage beläuft. Im Durchschnitt treten 5 bis 15 Panethzellen pro Dünndarmkrypte auf<sup>13</sup>.

Panethzellen können beim menschlichen Embryo ab der 13. Schwangerschaftswoche im Dünndarm und im Kolon nachgewiesen werden. Nach der 17. Schwangerschaftswoche sind sie nur noch im Dünndarm anzutreffen<sup>14</sup>. Beim Neugeborenen ist die Anzahl der Panethzellen insgesamt gering, sie steigt jedoch kontinuierlich während der Postnatalperiode an, was durch das Vorhandensein von EGF (Epidermal-Growth-Factor) begünstigt wird. Möglicherweise besteht zusätzlich ein Zusammenhang zwischen der Prolaktinproduktion in der Postnatalperiode und der Entstehung und Reifung der Panethzellen.



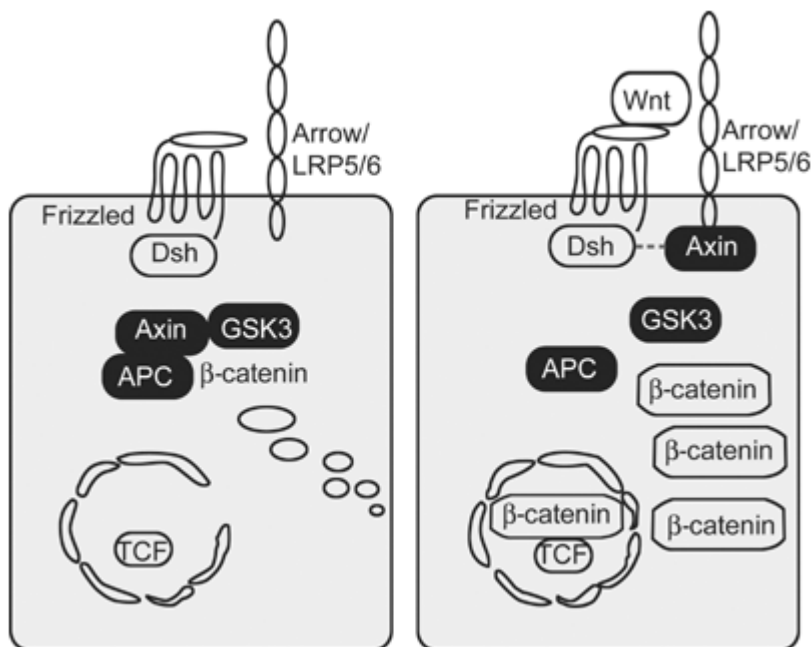
### 1.1.2.1 Wnt-Signalweg

Die Wnt (wingless-type)-Gene des Wnt-Signalweges codieren eine große Familie von sekretorischen Proteinen, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der ständigen Erneuerung des intestinalen Epithels einnehmen. Verschiedene Prozesse im Rahmen der Zelldifferenzierung werden durch den Wnt-Signalweg vermittelt. Neben konstanter Aufrechterhaltung von Stamm- und Vorläuferzellen über die Kontrolle des Zellzyklus und Hemmung der Differenzierung, erfolgt ferner die Kontrolle der Migration und Lokalisation der Epithelzellen entlang der Krypten-Villus-Achse. Weiterhin übernimmt der Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle in der terminalen Differenzierung der Panethzellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Veränderungen einzelner Wnt-Komponenten an der Entwicklung neoplastischer Prozesse innerhalb des Intestinums beteiligt sind <sup>15</sup>. Es kann generell zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg unterschieden werden. Die Rolle des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges innerhalb des Intestinums ist nicht beschrieben. Im Folgenden wird daher der kanonische Wnt-Signalweg näher erläutert und im Rahmen dieser Arbeit dessen Komponenten untersucht.

Im Mittelpunkt des kanonischen Signalweges steht die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin (cadherin-associated protein) und dessen Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren innerhalb des Nukleus <sup>16</sup>. Die zytosolische  $\beta$ -Cateninkonzentration ist streng reguliert, so dass in Abwesenheit von Wnt-Signalen, der sogenannte APC-Protein-Komplex, gebildet aus APC (adenomatosis polyposis coli), Axin und GSK-3 $\beta$  (Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$ ),  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung gebunden hält. Nachfolgend findet der Abbau des  $\beta$ -Catenins in Proteasomen statt <sup>17</sup>.

Für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs sind die von Epithelzellen sezernierten Glykoproteine, Wnt (wingless)-Proteine, erforderlich. Die Bindung der Wnt-Proteine erfolgt hauptsächlich an die cysteinreiche Domäne des transmembranären Frizzled (Fz)-Rezeptors, dessen Familie 10 humane Gene umfasst. Weiterhin erfordert der Wnt-Signalweg die Anwesenheit des transmembranären LRP (LDL receptor related protein)-Moleküls, LRP5 oder LRP6, dessen zytoplasmatische Komponente direkt mit Axin interagiert <sup>18, 19</sup>. Daraus resultiert die Inaktivierung des zytosolischen APC/ Axin/ GSK-3 $\beta$ -Komplexes, so dass dieser freies  $\beta$ -Catenin nicht mehr bindet und abbaut. Dies führt zu einer Anhäufung freien  $\beta$ -Catenins im Zytoplasma mit nachfolgender Translokation in den Nukleus. Im Nukleus bewirkt  $\beta$ -Catenin als Teil des TCF (T-Cell Factor)/ LEF (Lym-

phoid Enhancer Factor)-Transkriptionsfaktorkomplexes die Transkription bestimmter Targetgene, was schließlich zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle führt. TCF4 ist der bedeutendste Transkriptionsfaktor der TCF-Familie im intestinalen Epithel, da es für die Bildung proliferativer Vorläuferzellen in den späteren Krypten des embryonalen Dünndarms erforderlich ist<sup>20</sup>. Zu den Targetgenen von TCF4 gehören zum Beispiel der Zellzyklusregulator cyclin D1 sowie das Onkogen c-myc. Das Zusammenwirken von Wnt-Proteinen und dem Fz-Rezeptor wird durch Wnt-Antagonisten oder WIF (wingless inhibiting factor) reguliert. Sowohl APC-Mutationen, die zum Verlust der Proteinfunktion führen, was über den Wegfall der GSK-3 $\beta$  / APC/ Axin-vermittelten Degradation von  $\beta$ -Catenin eine Anhäufung von freiem  $\beta$ -Catenin in der Zelle bewirkt, als auch eine veränderte Aktivierung des Signalwegs resultieren in einer gesteigerten Proliferation der Zelle. Im Zuge der übermäßigen Zellproliferation kann es zur Adenombildung kommen<sup>21, 22</sup>. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass eine gestörte Regulation des Wnt-Signalweges, insbesondere in sich ständig erneuernden Geweben, wie dem Darm, ein häufiger Grund der Tumorgenese darstellt. Der Funktionsverlust des APC-Gens durch Mutationen tritt in der frühen Phase der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms auf.



**Abbildung 1: Der kanonische Wnt-Signalweg. Links:** Bei abwesendem Wnt-Signal erfolgt die Degradierung des  $\beta$ -Catenins durch den APC/Axin/GSK3-Komplex. **Rechts:** Bei Bindung eines Wnt-Proteins an den extrazellulären Frizzled/ LRP5/6-Rezeptorkomplex erfolgt die Signaltransduktion zu Dishevelled (Dsh) und Axin, die wiederum miteinander agieren. Folglich wird die  $\beta$ -Catenin-Degradierung inhibiert, so dass ungebundenes  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und in den Zellkern wandert. Dort bindet es an TCF und kontrolliert somit die Transkription<sup>23</sup>.

### 1.1.3 Zellspezifische Funktionen und Syntheseprodukte

Joseph Paneth beschrieb bereits im Jahre 1888 nach lichtmikroskopischen Untersuchungen die sekretorische Funktion der Panethzellen. Die wesentliche Funktion der Panethzellen ist die Produktion, Speicherung und Sekretion einer Vielzahl antimikrobieller Peptide, die als Bestandteil des angeborenen Immunsystems gelten. Obwohl die exakte Funktion der Panethzellen bis heute noch nicht eindeutig beschrieben ist, wird ihnen jedoch aufgrund ihrer Syntheseprodukte eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Immunabwehr zugeschrieben.

Antimikrobielle Peptide sind natürlich vorkommende niedermolekulare, kationische Oligo- bis Polypeptide, die von individuellen Genen kodiert werden. Über ihre Interaktionen mit Biomembranen führen sie zur Lyse eines breiten Spektrums pathogener Mikroorganismen. Erstmals wurden Vorkommen und Sekretion antimikrobieller Peptide 1987 in den Hautdrüsen des afrikanischen Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, beschrieben<sup>24</sup>. Inzwischen wurden Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften in pro- und eukaryoten Lebensformen nachgewiesen und stellen damit einen der konserviertesten Mechanismen der Evolution dar, den eigenen Organismus gegen aggressive Eindringlinge zu schützen<sup>25</sup>. Neben ihrer antimikrobiellen Funktion besitzen diese Peptide auch andere Eigenschaften, beispielsweise als Entzündungsmediatoren, Induktoren von Angiogenese, Mediatoren der Wundheilung und Chemotaxis.

Zu den durch verschiedene Untersuchungen nachgewiesenen panethzelltypischen antimikrobiellen Peptiden zählen die konstitutiven humanen Defensine  $\alpha$ -5 und -6, Lysozym, sekretorische Phospholipase A2 (sPLA2) und sekretorischer Leukozyten Proteinase Inhibitor (SLPI)<sup>26, 27</sup>. Wie bereits beschrieben, produzieren die Panethzellen lösliche Wnt-Proteine, über die sie in der Lage sind die Proliferation und Verteilung der Epithelzellen zu beeinflussen<sup>28</sup>.

#### 1.1.3.1 Defensine

Defensine sind 3,5 kDa große, kationische Peptide, bestehend aus 29 bis 45 Aminosäuren. Während allen Defensinen die Betafaltblattstruktur gemein ist, werden sie anhand der Lage ihrer drei intramolekularen Disulfidbrücken in die zwei Gruppen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine unterteilt<sup>29, 30</sup>. Alle Defensine weisen eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien, sowie gegen Pilze und umhüllte Viren auf<sup>31</sup>. Es wird angenommen, dass die positiv geladenen Defensine

mit den negativ geladenen Molekülen der mikrobiellen Zellwand interagieren und über transmembranär gebildete Poren zur Zerstörung des Bakteriums führen <sup>29</sup>.

Die bekannten  $\alpha$ -Defensine umfassen die humanen neutrophilen Defensine 1-4 und die epithelialen humanen Defensine 5 (HDEFA-5) und 6 (HDEFA-6). Wie zuvor schon beschrieben, sind HDEFA-5 und 6 panethzellspezifische Produkte und stellen damit einen großen Anteil an den antimikrobiellen Peptiden des Dünndarms dar <sup>32</sup>. Untersuchungen zeigten, dass HDEFA-5 und -6 als precursor Peptide produziert werden und von Trypsin, welches ebenfalls von humanen Panethzellen exprimiert wird, durch enzymatische Spaltung in die aktive Form umgewandelt werden <sup>26</sup>.

### **1.1.3.2 Lysozym, Phospholipase A2, SLPI**

Lysozym, auch Muramidase genannt, zählt zu den Glukosidasen und spaltet enzymatisch glykosidische Bindungen von Peptidoglykanen an Zellmembranen von grampositiven Bakterien und zeigt gelegentlich auch Wirkung bei gramnegativen Mikroorganismen. In hohen Konzentrationen ist es im menschlichen Organismus in den verschiedenen Sekreten wie Tränen, Muttermilch, Speichel, Schweiß, Blutplasma, Magen- und Dünndarmsekret vorhanden. Im Gastrointestinaltrakt wird Lysozym neben den Panethzellen auch von Magen- und Pylorusdrüsen, Brunnerdrüsen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert <sup>33, 34</sup>.

sPLA2 gehört zu der Familie der Esterasen, die enzymatisch die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden katalysieren. Bisher sind 10 Isoenzyme bekannt, die in Anwesenheit von Kalziumionen aktiviert eine Reihe biologischer Prozesse katalysieren. Dazu zählt unter anderem die Freisetzung von Arachidonsäure aus Zellmembranen, die eine wichtige Rolle in der Eikosanoidproduktion, der Immunabwehr und bei Entzündungsreaktionen spielt <sup>35</sup>. Genexpressionsanalysen zeigten, dass die sPLA2 ein panethzellspezifisches Produkt kennzeichnet und von keinem der anderen intestinalen Epithelzellen synthetisiert wird <sup>27</sup>. SLPI ist ein kationischer Inhibitor der Leukozyten Esterase mit starken antimikrobiellen und anti-inflammatorischen Eigenschaften <sup>36</sup>.

### **1.1.3.3 Zellspezifische Aktivierung und intrazelluläre Signalkaskade**

An isolierten panethzellreichen Dünndarmkrypten von Mäusen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Freisetzung der antimikrobiellen Peptide nach Exposi-

tion mit grampositiven oder gramnegativen Bakterien oder ihrer bakterienspezifischen Produkte Lipopolysaccharid, Lipoteiconsäure, Lipid A oder Muramyl-dipeptid, erfolgt. Auf einen Stimulus durch Pilze oder Protozoen hingegen blieb eine Degranulation der Panethzellen aus<sup>37</sup>. Nachfolgende Studien hinsichtlich des zellspezifischen Erkennungsmusters zeigten, dass Panethzellen ebenso wie andere immunkompetente Zellen des Intestinaltrakts, z.B. Makrophagen und dendritische Zellen, so genannte pattern recognition receptors (PRRs) exprimieren und damit die mikrobiellen Strukturen (pathogen associated molecular patterns = PAMPs) identifizieren können. Die Bindung der PRRs bewirkt die Freisetzung von Zytokinen, die wiederum zur Degranulation zellulärer Komponenten führen. Als Teil des angeborenen Immunsystems bewirken voran gegangene Antigenexpositionen keine Änderungen der PRRs, im Gegensatz zu den Rezeptoren der Lymphozyten des erworbenen Immunsystems<sup>38, 39</sup>.

Bisher sind bei Säugetieren zwei verschiedene Klassen der PRRs nachgewiesen, die Toll-like Rezeptoren (TLR) und die Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-Proteine<sup>40, 41</sup>. TLR sind transmembranäre Moleküle mit einer leucinreichen extrazellulären Domäne, in denen nach Bindung des Liganden eine Signalkaskade abläuft, die letztlich in der Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , dem Inhibitor von NF $\kappa$ B, endet. Die nachfolgende Stimulation, z. B. durch aktivierte TLR, NOD-Proteine oder proinflammatorische Zytokine, bewirkt die Auflösung des I $\kappa$ B $\alpha$ -NF $\kappa$ B-Komplexes, woraufhin NF $\kappa$ B als aktive Form in den Zellkern migriert. Im Zellkern erfolgt die sequentielle Bindung an Promotoren von Targetgenen, das zu einer erhöhten Transkription von Genen führt, die für eine Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Die TLR-Familie besteht aus mindestens 11 Mitgliedern, von denen bisher TLR 1 bis 9 bei Menschen und Mäusen nachgewiesen wurden<sup>40, 41</sup>. In Untersuchungen an Panethzellen von Mäusen konnten mRNA-Transkripte der TLR 1- 3 sowie TLR 5- 8, insbesondere aber TLR9 nachgewiesen werden, während die Expression des mRNA-Transkripts von TLR 4 nicht detektiert wurde<sup>42, 43</sup>.

NOD1 und NOD2 sind zytoplasmatische Proteine, die als intrazelluläres Gegenstück der TLR, bakterielle Peptidoglykane erkennen und damit eine wichtige Rolle in der Regulation der proinflammatorischen Signalwege darstellen. Normalerweise werden sie im Zytosol von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, können jedoch im entzündeten Darm auch von Epithelzellen exprimiert werden. Die Aktivierung der NOD-Proteine löst ähnlich den TLRs eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die letztlich zur NF $\kappa$ B-Aktivie-

rung über I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung führt. Die NF $\kappa$ B-Regulation scheint in der Aktivität des intestinalen Immunsystems eine wichtige Rolle zu spielen, so zeigten Untersuchungen, dass die Besiedlung des Darms mit anaeroben Kommensalen die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Hemmung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation vermindert. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Expression von NOD1 und 2, die durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  aktiviert werden, in den Panethzellen des Dünndarms am höchsten ist <sup>44-46</sup>. Dieser Aktivierungsmodus erklärt die Überaktivierung des NOD2-vermittelten Signalwegs in entzündlichem Kolongewebe bei CED, insbesondere bei M. Crohn <sup>47</sup>. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass NOD2 ein spezifisches bakterielles Peptidoglykan, Muramyldipeptid (MDP), erkennen. Mutationen im NOD2-Gen auf Chromosom 16 führen zu einer reduzierten Sensitivität für MDP <sup>40, 48</sup>. Weiterhin zeigten neuere Studien, dass NOD2-Mutationen im Zusammenhang mit M. Crohn auftreten und letztlich auch als vorrangige Pathogenesetherorien gelten.

Es wird angenommen, dass die Entzündung die NOD2-Expression in Epithelzellen der Darmschleimhaut triggert. Da NOD2 über die MDP-Detektion grampositive oder gramnegative Bakterien erkennen kann, scheint die NOD2-Hochregulierung in Epithelzellen eine bedeutende Rolle bei der frühen Immunabwehr gegen invasive bakterielle Pathogene zu spielen. NOD2-Proteine führen zum Abtöten von Salmonellen, nachdem diese in die Epithelzellen eingedrungen sind <sup>49</sup>. NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der nicht nur in Makrophagen sondern auch in den Epithelzellen in entzündlicher Darmschleimhaut nachgewiesen wurde. Hier ist er an der angeborenen Immunabwehr beteiligt und wurde in weiterführenden Untersuchungen als erstes Targetgen für M. Crohn identifiziert <sup>48</sup>.

#### **1.1.4 Intestinale Metaplasie und metaplastische Panethzellen**

Der Begriff Metaplasie beschreibt die Differenzierung einer Zellart in eine andere. Es handelt sich um dabei um eine qualitative Änderung von Körperzellen, die zunächst keine Veränderung der Zellzahl nach sich zieht.

Die Ursachen einer Metaplasie liegen in einer chronischen Irritation, Reizung oder Überbelastung der Zellen, z.B. durch entzündliche Prozesse, mechanische oder chemische Beanspruchung. Die strapazierten Zellen passen sich daraufhin den veränderten Umständen an und differenzieren sich.

Als intestinale Metaplasie wird das Auftreten von Dünndarmepithel in abweichender Lokalisation, z. B. im Kolon, Rektum, Magen oder Ösophagus, bezeichnet. In einigen Untersuchungen wurde Dünndarmepithel, als Zeichen der intestinalen Metaplasie in der Cervix uteri und im Respirationstrakt nachgewiesen<sup>50, 51</sup>. Der Begriff „komplette intestinale Metaplasie“ wird verwendet wenn zusätzlich zum Dünndarmepithel auch Panethzellen auftreten<sup>52</sup>. Als ursächlich für die Entstehung der intestinalen Metaplasie werden hauptsächlich chronisch entzündliche Erkrankungen angesehen, wie z. B. der Barrett-Ösophagus oder die chronische Gastritis<sup>53</sup>.

Panethzellmetaplasie tritt typischerweise in entzündeten Darmabschnitten im Bereich des rechten Kolons und des Zökums bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und M. Crohn auf und ist gekennzeichnet durch morphologische Panethzellen in der Basis der Kolonkrypten<sup>54, 55</sup>. Sie wird in entzündeten Arealen des Gastrointestinaltraktes als eine Art Bedarfsmechanismus verstanden, der die antimikrobielle Expression und Protektion steigert<sup>26</sup>. Weiterhin wurde das Vorkommen von Panethzellen bei der Sigmadivertikulitis und bei strahleninduzierter Colitis beobachtet<sup>3, 56</sup>.

Immunhistochemische Untersuchungen an metaplastischen Panethzellen zeigten, dass diese ebenso wie die orthopen Panethzellen des terminalen Ileums die antimikrobiellen Substanzen Lysozym, sPLA2 und humane alpha-Defensine exprimieren. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Vermutung, dass metaplastische Panethzellen dem geschädigten Kolonepithel bei CED zum Schutz vor bakterieller Invasion dient<sup>33</sup>. In den letzten Jahren wurde zunehmend die Panethzellmetaplasie im Colon als präneoplastischer Zustand in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms diskutiert. So zeigten Untersuchungen, dass Panethzellen sowohl vermehrt in benachbarter Mukosa der kolorektalen Epithelneoplasie als auch innerhalb der Neoplasien entdeckt wurden<sup>57</sup>.

## **1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

### **1.2.1 Definition, Epidemiologie und Klinik**

Unter dem Begriff Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden verschiedene idiopathische, chronisch entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts zusammengefasst. Die zwei wichtigsten Erkrankungen innerhalb der Gruppe sind Enteritis regionalis Crohn (Morbus Crohn; M. Crohn; MC) und Colitis ulcerosa (CU).

Die Ätiologie und Pathogenese sind komplex und trotz großer medizinischer Fortschritte in den letzten Jahren in weiten Teilen noch schlecht verstanden. Jedoch zeigten verschiedene Untersuchungen, dass sowohl eine genetische Disposition und das Zusammentreffen exogener Faktoren wie z. B. Infektionen, Exposition gegenüber Noxen, aber auch endogene Faktoren, wie eine gestörte intestinale Barrierefunktion, vaskuläre oder neuronale Faktoren als ursächlich gelten. Diese führen zu einer chronischen Hochregulierung der mukosomalen Immunabwehr. Kennzeichnend für CED ist die inadäquate Immunantwort, die eine chronische Entzündungsreaktion in der Darmwand auslöst<sup>58</sup>.

Sowohl M. Crohn als auch Colitis Ulcerosa zeigen meist einen lebenslangen Verlauf, der durch akute Krankheitsschübe und Remissionsphasen gekennzeichnet ist. Unterschiede weisen die Erkrankungen hinsichtlich ihres Befallsmusters auf. Während der M. Crohn alle Darmwandschichten befällt und sich diskontinuierlich, segmental ausbreitet, zeigt die Colitis ulcerosa eine kontinuierliche Ausbreitung in der Darmmukosa überwiegend vom Rektum ausgehend und nach oral fortschreitend.

Die Inzidenz der CED unterscheidet sich in verschiedenen geografischen Regionen, so zeigen retrospektive Erfassungen in Deutschland ein tendenzielles Nord- Süd- Gefälle. Insgesamt beträgt die Inzidenz von CED 11 auf 100.000. Zum Zeitpunkt der Untersuchung sind in Deutschland ca. 300.000 Bundesbürger an CED erkrankt. In Deutschland beträgt die Inzidenzrate für M. Crohn 6 auf 100.000 und für Colitis ulcerosa 3 auf 100.000<sup>59</sup>. Beide Erkrankungen zeigen einen Gipfel des Erkrankungsbeginnes zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr, sowie einen zweiten Gipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Das mediane Erkrankungsalter wird bei M. Crohn mit 34 Jahren und bei der Colitis Ulcerosa mit 35 Jahren angegeben. Während bei der Colitis ulcerosa ein wenig erhöhtes Erkrankungsrisiko auf Seiten des männlichen Geschlechtes liegt (RR 0,8), so scheinen Frauen vom M. Crohn geringfügig häufiger betroffen (RR 1,2)<sup>60</sup>.

Die CED-spezifischen Symptome und Befunde sind vielfältig und unterscheiden sich bei zum Teil sehr. Die Diagnosestellung erfolgt anhand der meist richtungsweisenden klinischen Symptome, sowie anhand der histologischen, endoskopischen und radiologischen Befunde.



### **1.2.2 Pathogenese-Theorien der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Hinsichtlich der Pathogenese der CED wird momentan davon ausgegangen, dass eine genetisch bedingte Störung der immunologischen Antwort des angeborenen Immunsystems gegenüber luminalen Antigenen im Darm besteht. Dieser Umstand bedingt die Aktivierung immunkompetenter Zellen der Darmwand und anschließender überschießender, überwiegend T-Zell-vermittelter Reaktion mit Ausschüttung spezifischer Entzündungsmediatoren wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interferonen. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung immunkompetenter Zellen wie Makrophagen mit verstärkter Produktion zusätzlicher proinflammatorischer Zytokine, wie IL1 $\beta$ , IL2, IL6, IL8, IL12. Es resultiert eine chronisch transmurale Entzündung der Darmwand mit lokaler Gewebeschädigung mit Erosionen und Ulzerationen, die bei M. Crohn alle Darmwandschichten betreffen kann und bei Colitis Ulcerosa charakteristischer Weise auf die Mukosa beschränkt ist.

Das intestinale Abwehrsystem wird zum einen von einer mechanischen Barriere aus einer intakten, durch Zell-Zell-Kontakte fest verbundenen Epithelzellschicht mit dazugehörigem Schleimüberzug und zum anderen von der immunologischen Barriere des Mucosa-assoziierten Immunsystems des Darms (engl. GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue) gebildet. Hierbei nehmen auch die Epithelzellen immunologische Funktionen wie Antigenpräsentation oder Zytokinproduktion wahr.

Das intestinale Immunsystem gilt als funktionell eigenständig und ist durch einen physiologischen Aktivierungszustand gekennzeichnet, welcher durch kontinuierliche Stimulation von Immun- und Epithelzellen einen dauerhaften geringfügigen Entzündungszustand der intestinalen Mukosa bedingt <sup>61</sup>. Dieser Zustand wiederum unterliegt physiologischerweise einer strengen Regulation, um eine überschießende Entzündung und damit Gewebsschädigung zu verhindern. Durch ein Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Zytokine scheint dieser Zustand reguliert, was jedoch auch eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten der proinflammatorischen Zytokine bei CED vermuten lässt <sup>62</sup>. Panethzellen stehen als Teil der adaptiven Immunabwehr, vor allem mit der Expression antimikrobieller Peptide im Fokus verschiedener Untersuchungen und Pathogenesetheorien bei CED. In den letzten Jahren wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die das Auftreten von Panethzellen in entzündlichem Darmgewebe außerhalb des Dünndarms zeigten und weiterhin Unterschiede hinsichtlich der Expres-

sion antimikrobieller Peptide ergaben. Eine signifikant verminderte HDEFA5-Expression wurde bei MC beschrieben <sup>63</sup>.

Weiterhin exprimieren Panethzellen, wie vorab erwähnt, das MC-Gen NOD2, weswegen ihnen eine besondere Rolle in der Immunpathologie des M. Crohn zugeschrieben wird. Patienten mit M. Crohn und NOD2-Mutationen weisen eine verringerte alpha-Defensinsekretion auf <sup>64</sup>. Seit einigen Jahren steht die Suche nach CED-assoziierten Genen im Fokus verschiedener Untersuchungen. So wurde die Mutation des NOD2-Gens als pathogenes Korrelat des M. Crohn identifiziert. Als weiteres CED-assoziiertes Gen wird IL23R diskutiert, welches auf Chromosom 1p31 identifiziert wurde <sup>65</sup>. Dieses Gen kodiert für den Interleukin-23-Rezeptor, der sich in den Zellmembranen verschiedener immunkompetenter Zellen befindet und durch Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL17 und IL22 auslöst. In tierexperimentellen Studien wurde IL23R eine wichtige Rolle bei intestinaler Entzündung zugeschrieben. An einem deutschen Untersuchungskollektiv wurde die Genvariante IL23R rs1004819 als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von CED beschrieben <sup>66</sup>.

### **1.3 NALP-Proteine**

In jüngeren Untersuchungen zur Pathogenese von CED wurde eine weitere Familie zytoplasmatischer Proteine, die NALP-Proteine, intensiver betrachtet.

NALP-Proteine umfassen eine Familie zytoplasmatischer Proteine, die anstelle der CARD-Domäne an dem N-terminalen Ende eine Pyridin (PYD)-Domäne aufweisen. Bis heute sind 14 verschiedene NALPs im menschlichen Genom bekannt, die sich bis auf NALP1, welches eine zusätzliche CARD-Domäne am C-terminalen Ende besitzt, in ihrer Struktur gleichen <sup>67</sup>. Die Genloci befinden sich mit Ausnahme von NALP1 und NALP3 auf den humanen Chromosomen 11p15 und 19q13.4. Die verfügbaren Informationen, die bislang über die NALPs erschienen, sind rar. Die meisten Kenntnisse entstammen den Untersuchungen an NALP1, 3 und 5.

Neuere Studien über NALP1 belegen seine entscheidende Rolle in der Aktivierung proinflammatorischer Kaspasen. Wird NALP1 durch Ligandenbindung aktiviert, so formiert sich ein Komplex bestehend aus NALP1, ASC/PYCARD, Kaspase-1 und -5, durch welchen die Kaspasen dicht zueinander gebracht und damit aktiviert werden. Dieser

Komplex wird als Inflammasom bezeichnet. Der genaue Mechanismus der zu dieser Formation führt ist bis heute noch unklar. Da alle NALP-Proteine leucinreiche Repeats (LRR)-Domänen besitzen, ist es möglich das NALPs ähnlich den NODs durch daran bindende spezifische molekulare Strukturen aktiviert werden. Untersuchungen ergaben, dass die Auflösung der Zellintegrität ausreichend für die Formierung des Inflammasoms sei, so dass daraufhin vermutet wird, das NALPs durch die Bindung zellulärer Komponenten aktiviert werden. Somit kann die Aktivierung von NALP1 eine Konsequenz größerer Zelldestruktion sein. Da alle 14 NALP-Proteine eine LRR-Domäne besitzen wird angenommen, dass die Aktivierung durch bakterielle Stimuli erfolgt. Untersuchungen zeigten, dass LPS die Formation eines Inflammasoms in Makrophagen triggert <sup>68</sup>.

#### **1.4 Fragestellung**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird die Genexpression humaner Panethzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Zunächst sollen mittels immunhistochemischer Untersuchungen die metaplastischen Panethzellen im Colon ascendens bei Patientin mit M. Crohn und Colitis Ulcerosa detektiert werden. Anschließend folgen Genexpressionsanalysen aus metaplastischen und orthotopen Panethzellen mittels Agilent Whole Genome Microarrays®.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Untersuchungsgut**

Die in dieser Arbeit für die immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen verwendeten Proben bestanden aus in Paraffin eingebettetem Darmgewebe. Die Proben stammen aus der seit 1998 bestehenden Gewebebank der Chirurgischen Klinik der Charité-Campus Benjamin Franklin, Berlin, welche Darmgewebe aus Resektionen oder Biopsien bei Patienten mit Colitis ulcerosa, M. Crohn und mit Darmtumoren umfasst. In der vorliegenden Arbeit wurde Darmgewebe aus dem Colon ascendens von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa sowie tumorfreies Gewebe des terminalen Ileums und tumorfreies Gewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom verwendet. Die durchgeführte Studie unterlag den Richtlinien und der Genehmigung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Eine schriftliche Einverständniserklärung über die Nutzung ihrer Krankenhausdaten und der Gewebeproben lag von allen Patienten vor.

## 2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Agilent Hybridisierungskammer	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Agilent Hybridisierungssofen	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Agilent Microarray Scanner System	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Brutschrank Typ A	Melag® Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Dampfsterilisator Varioklav ® 500 E	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, Deutschland
Deionisierer/ Millipore Simplicity 185	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Digitalkamera AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Einbettanlage Histocenter Tm	Shandon Inc., Pittsburgh, USA
Gewebeaufbereiter Hypercenter Tm XP	Shandon Inc., Pittsburgh, USA
Lasermikroskop PALM® MicroBeam	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH Carl Zeiss AG, Bernried, Deutschland
Lichtmikroskop AxioVision 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Microtom Leica Model: RM 2125RT	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop® Technologies Inc., Wilmington, USA
pH- Meter CG 840	Schott AG, Mainz, Deutschland
Pipetten Research®, Reference ®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus® Akku	Hirschmann® Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Portable Präzisionswaage BP 310 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Stoppuhr Oregon Scientific	VWR Inetrnational GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermal cycler ThermoStat Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex-Mixer Stuart® SA 7	Barloworld Scientific Ltd., Stone, UK
Wasserbad MH 8501	Electrothermal® Engeneering Ltd., Southend-on-Sea, UK
Whole Human Genome Microarray Kit, 4 x 44K	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Zellzähler infactory®	tinxi.com GmbH, Eggenstein- Leopoldshafen, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mini Spin® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Labormaterialien	Hersteller
Aluminiumfolie Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BD Falcon™ 10 ml Serological Pipets	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bechergläser aus Duran®	Schott- Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Chromatographiepapier Whatman® Paper	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cryobox aus Karton Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DakoCytomation Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig
Doppelspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Einweg-Wägeschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Elektrodenlösung Elektrolyt KCl 3mol/l	Mettler Toledo, Steinbach
Erlenmeyerkolben aus Duran®	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Färbekästen nach Hellendahl mit Erweiterung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glaskasten mit Färbegestell/Drahtbügel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührstäbchen PTFE zylindrisch	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Magnetstabentferner	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Messzylinder	Brand GmbH & CoKG, Wertheim, Deutschland
Mikrotomklingen S35	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Mikrozentrifugengefäß 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Labormaterialien	Hersteller
Objektträger Palm® MembraneSlides NF	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH Carl Zeiss AG, Bernried, Deutschland
Objektträgerkasten Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm®M	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petrischale viereckig NUNC™	Nunc™ GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
pH- Eichlösungen (ph 4-, 7- Puffer)	Metrohm, Herisau, Schweiz
Pipettenspitzen ART® Aerosol resisting tips	Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präparatetafeln Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß BD Falcon™ type, sterile (15, 50ml)	BD Biosciences, San Jose, USA
Reaktionsgefäß PALM® AdhesiveCaps	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH Carl Zeiss AG, Bernried, Deutschland
Reaktionsgefäßständer Rotilabo ®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzflaschen Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wägeschalen Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Nunc™	Nunc™ GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

## 2.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Chemische Substanz	Hersteller
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DAB Chromogen	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMPC-Dimethyl Pyrocarbonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Eisessig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 Vol.-% denaturiert mit MEK	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Formalinlösung 10% neutral gepuffert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Human Adult RNA normal Colon ascending	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natrium-Jodat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraffin Histosec® polymeren-angereichert hochreines Paraffin, Erstarrung 56-58 °C	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Promega Corporation, Madison, USA
RNase Away®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trizma® Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylenzylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere) Rotipuran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure kristallin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland



### 2.1.5 Lösungen und Puffer

<i>PBS-Lösung</i>	auf 3 Liter Aqua dest.  17,25 ml Lösung A  27,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1 l Aqua dest. (+4 °C)  57,72 ml Lösung B  35,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> auf 1 l Aqua dest. (RT)  13,44 g NaCl  pH = 7,4
<i>EDTA [0,5 M]</i>	146,45 mg auf 1 l Aqua dest.  pH = 8
<i>Hämatoxylin nach Meyer</i>	1 l DMPC-Wasser 70 °C  1 g Hämatoxylin  0,2 g Natriumjodat  50 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)  50 g Chloralhydrat  1 g kristalline Zitronensäure
<i>Eosin-Lösung</i>	12,25 ml Eosinlösung (2 %ig) auf 250 ml DMPC- Wasser  1 Tropfen Eisessig

<i>Proteinase K-Lösung</i>	auf 1 ml 50 mM Tris HCl pH = 8 10 mM CaCl <sub>2</sub>
<i>Tris [1 M]</i>	auf 100 ml DMPC- Wasser 12,11 g Trizma Base HCl zur pH-Einstellung pH = 8
<i>Catapult-Puffer</i>	für 10 ml 20 µl 0,5 M EDTA (pH = 8) 200 µl 1 M Tris (pH = 8) 50 µl Tween(R)20 9,73 ml DMPC- Wasser
<i>DMPC-Wasser</i>	auf 1 l Aqua dest. 1000 µl DMPC 1 h Inkubation bei 37 °C Autoklavieren bei 121 °C

## 2.1.6 Antikörper

### Primärantikörper:

HDEFA6 Kaninchen IgG, anti human, Alpha Diagnostic, San Antonio, USA

### Sekundärantikörper:

Peroxidase-konjugiert Ziege IgG, anti-Kaninchen, Jackson Immuno Research, USA

## 2.1.7 Software

Software	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer Expert Software	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Agilent Feature Substraction Software	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Microsoft® Office 2003, 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Palm ® RoboSoftware MicroBeam Version 2.2-0103	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH Carl Zeiss AG, Bernried, Deutschland
Rosetta Resolver ® gene expression analysis system	Rosetta Biosoftware, Cambridge, USA
SPSS für Windows Version 18.0	SPSS Software GmbH, München Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studiendesign

Es werden drei Patientenkollektive gebildet, an denen immunhistologische Voruntersuchungen durchgeführt werden: M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollgruppe. Die Voruntersuchungen dienen dem Screening der Patienten mit CED und der Kontrollgruppe, um jeweils die metaplastischen Panethzellen im Colon ascendens nachzuweisen. Vorher wurden in der Kontrollgruppe die orthotopen Panethzellen des terminalen Ileum immunhistologisch nachgewiesen.

Das erste Kollektiv bilden 39 Patienten mit Colitis ulcerosa und einem mittleren Alter bei Operation von 40 Jahren. Das zweite Kollektiv besteht aus 36 Patienten, die an M. Crohn erkrankten, bei denen das mittlere Alter bei 36,4 Jahren liegt. Als Kontrollgruppe (Ko) dienen 39 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mit einem mittleren Alter von 62,3 Jahren, die keine anderen relevanten Nebendiagnosen aufwiesen.

Die histologische Sicherung der Diagnosen der drei Patientenkollektive erfolgt durch Einsicht in die Patientenakten und Evaluierung der histologischen Befunde durch das Institut für Pathologie, Charité-Campus Benjamin Franklin (CBF).

	M. Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollgruppe	Gesamt
Anzahl Patienten	36	39	39	114
(männlich/weiblich)	(15/21)	(21/18)	(20/19)	(56/58)
Alter (Jahre)	36,4 ± 11,6	40,0 ± 15,6	62,3 ± 12,3	46,5 ± 17,5

**Tabelle 1: Patientenkollektive**

### 2.2.2 Herkunft und Bearbeitung der untersuchten Gewebe

Die bei der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebeproben werden von der Gewebekbank der Chirurgischen Klinik des Campus Benjamin Franklin bereitgestellt.

Das Kolon- und Dünndarmgewebe stammt von größeren Gewebestücken aus operativen Eingriffen bei Patienten mit MC, CU und Ko. Bei allen Patienten erfolgte aufgrund ihrer Erkrankung eine Darmresektion. Bei der Mehrheit der CED-Patienten besteht ein

langjähriger Krankheitsverlauf. Die Operation erfolgte aufgrund eines therapierefraktären Verlaufs oder bei Auftreten einer Komplikation.

Die Kontrollgruppe wird von Patienten gebildet, die wegen eines Tumorleidens im Bereich des Kolons operiert wurden. Durch Festlegung eines Abstandes von mindestens 10 cm von gesundem zu erkranktem Gewebe ist bei der Kontrollgruppe von einer tumorfreien Mukosa im Bereich des Colon ascendens und terminalem Ileum auszugehen. Nach Entnahme von 0,8 x 1 cm messenden Darmwandproben, werden diese in 10%-igem gepufferten Formalin für 24h fixiert. Anschließend erfolgt die automatische Entwässerung und Paraffinierung der Darmproben maschinell in der Pathologie nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Programm.

Im Vordergrund der immunhistologischen Untersuchungen stand die Detektion metaplastischer Panethzellen bei allen CED-Patienten um ausreichend Zellmaterial für die Genanalyse zu erhalten.

Substanz	Zeit in Min
Formalin	150
Alkohol 70%	45
Alkohol 80%	60
Alkohol 96%	45
Alkohol 96%	40
Alkohol 100%	50
Alkohol 100%	60
Aceton	45
Aceton	60
Paraffin	90
Paraffin	120

**Tabelle 2: Automatische Entwässerung und Paraffinierung**

### **2.2.3 Anfertigung der Gewebeschnitte**

Für die Durchführung immunhistochemischer und immunhistologischer Färbungen zum Nachweis von Panethzellen war die Anfertigung von Gewebeschnitten notwendig. Dabei werden von den bereits bei 4°C gelagerten Paraffinblöcken mit einem handbetriebenen Rotationsmikrotom bei Raumtemperatur 3µm dicke Schnitte angefertigt, die erst in einem kalten Wasserbad entfaltet und nachfolgend in einem 42°C warmen Wasserbad geglättet und auf adhäsive Objektträger mit silanisierten Oberflächen aufgezogen werden. Die Beschichtung der Objektträger dient zur sicheren Anheftung der Gewebeschnitte, da insbesondere die häufigen Waschkvorgänge bei immunhistochemischen Färbungen zum Abschwimmen der Gewebeschnitte führen können. Anschließend trocknen die Schnitte über Nacht bei 37°C im Wärmeofen. Die angefertigten Gewebeschnitte werden entweder im Anschluss der jeweiligen Färbetechnik unterzogen oder bis zum weiteren Gebrauch in Objektträgerkästen bei 4°C gelagert.

### **2.2.4 Immunhistochemie und Mikroskopie**

Für die Detektion der Panethzellen im Colon ascendens wird ein immunhistochemisches Färbeverfahren genutzt. Das Prinzip der immunhistochemischen Reaktion beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der spezifische Primärantikörper bindet das entsprechende Antigen (Protein). Nachfolgend wird dieser Immunkomplex durch eine Färbemethode sichtbar gemacht, bei der Farbstoffe an Antikörper gekoppelt sind. Es wird zwischen der direkten und der indirekten Methode unterschieden. Bei der direkten Färbemethode ist bereits der spezifische Primärantikörper an einen Farbstoff (z. B. Peroxidase) gekoppelt, während bei der indirekten Methode der Primärantikörper zunächst unkonjugiert bindet. Anschließend wird diesem Immunkomplex ein farbstoffgekoppelter Sekundärantikörper hinzugefügt, der an den Primärantikörper bindet. Nach Zugabe eines Substrates wird die Reaktion sichtbar gemacht. Für die Detektion der Panethzellen in den Kolonkrypten wird als Marker HDEFA6 gewählt und der spezifische Antikörper verwendet.

Begonnen wird mit der Entparaffinierung der Präparate. Die Objektträger werden zunächst zweimal 5 Minuten in Xylol und dann in einer absteigenden Alkohol-Konzentrationsreihe (absolut-Alkohol, 96%, 70% für jeweils 5 min) gewaschen, um das Xylol und das darin gelöste Paraffin zu entfernen. Anschließend werden die Gewebeschnitte in Aqua destillata rehydriert und nachfolgend in PBS-Puffer der pH-Wert äqui-

libriert. Um die endogene Gewebeperoxidase in den Schnitten zu deaktivieren wird ein Peroxidaseblock in 3%iger  $H_2O_2$  Lösung für 20 min durchgeführt. Danach werden die Objektträger wiederholt in PBS für 2x5 min gewaschen, um das Wasserstoffperoxid zu entfernen und den pH erneut zu äquilibrieren. Die Gewebeschnitte werden dann aus den Färbekästen entnommen und die verbliebene Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und abgetropft. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Schnitte mit einem Fettstift umfahren, was eine hydrophobe Abgrenzung bedeutet. Diese Methode verhindert die Verteilung der nachfolgenden Lösungen auf dem gesamten Objektträger und sorgt damit für eine gleichmäßige immunhistochemische Färbung. Für die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Objektträger in eine mit angefeuchtetem Chromatographiepapier versehene viereckige Petrischale gelegt.

Der lyophilisierte unkonjugierte Primärantikörper anti-HDEFA6 wird zunächst in 100µl PBS gelöst (Konzentration 1mg/ml) und in Reaktionsgefäßen zu je 20µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das aufgetaute Primärantikörperaliquot wird in PBS (1:100) verdünnt. Jeder Schnitt wird mit 90 µl dieser Lösung überschichtet und für 60 min in einer viereckigen Petrischale im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Danach wird der Primärantikörper durch Waschen der Gewebeschnitte mit PBS-Puffer, dreimal 5 min, entfernt. Die PBS-Rückstände werden abgesaugt und es folgt die Auftragung des POD-konjugierten Sekundärantikörpers, 90 µl pro Gewebeschnitt in PBS verdünnt (1:1000) und die anschließende Inkubation von 60 min bei RT. Der Sekundärantikörper liegt zunächst ebenfalls in lyophilisierter Form vor und wird in 1,5 ml Aqua destillata gelöst (Konzentration 0,8mg/ml) und anschließend in Aliquots á 10 µl bei -70°C gelagert.

Im Anschluss wird erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Substratreaktion zum Sichtbar werden des gebundenen Peroxidase-Komplexes erfolgt mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin) und bildet letztlich ein braunes Endprodukt. Auf die Gewebeschnitte werden 40-100µl DAB Chromogen, welches zuvor in 1000µl DAB Substrat (Stable Peroxidase Substrat Puffer) verdünnt wurde, aufgetragen. Die Färbereaktion wird für 5-15 min bei RT inkubiert und anschließend mit Aqua destillata gestoppt.

Bei den immunhistochemischen Färbereihen laufen sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mit. Bei der Positivkontrolle wird Ileumgewebe benutzt, wo Panethzellen sicher vorkommen und demnach durch den Primärantikörper detektierbar sind. Für die Negativkontrolle wird ebenfalls Ileumgewebe genutzt, dieses jedoch mit PBS anstel-

le des Primärantikörpers inkubiert. Positiv- und Negativkontrolle werden anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert und mit DAB Chromogen gefärbt.

Im Anschluss erfolgt die Gegenfärbung aller Gewebeschnitte mit der Hämatoxylinfärbung nach Mayer. Die Zellkerne erscheinen aufgrund des niedrigen pH-Wert der Färbelösung zunächst rötlich-braun. Durch Spülen mit Leitungswasser erhöht sich der pH-Wert und der Farbton schlägt in das typische blauviolett um. Diese Reaktion wird auch als Bläuen bezeichnet. Abschließend erfolgt die Dehydrierung der Präparate, zunächst in Aqua destillata und in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%, 96%, 100%) für jeweils 3-5 min. Schließlich folgt die Inkubation in Xylol für 5 min.

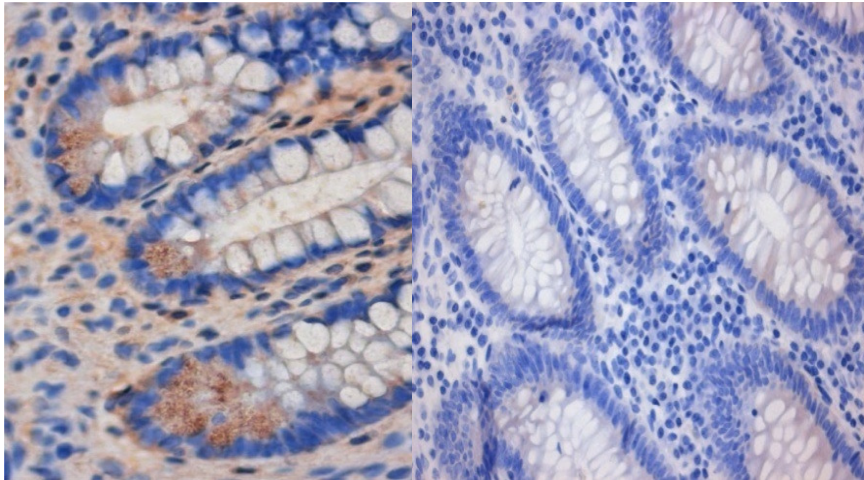
Zur mikroskopischen Untersuchung und Konservierung des Schnittes werden die gefärbten Präparate mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex® betropft und mit einem Deckglas versehen, um die Präparate in transparenter Form zu konservieren und ihre Strukturen und Färbungen nicht zu schädigen. Die fertigen Objektträger werden in speziellen Objektträgertafeln zum Trocknen bei Raumtemperatur gelagert. Die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgt unter dem Lichtmikroskop AxioVision 2 mit integrierter Kamera. Die Auswertung erfolgt nach unten aufgeführten Kriterien. Des Weiteren erfolgt die Beurteilung der morphologischen Eigenschaften wie Position innerhalb der Krypte, sowie Lage des Nukleus und der typischen Granulae.

Pro Patient werden 6 Gewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt und anschließend mit dem Mikroskop auf das Vorkommen von Panethzellen untersucht. Diese heben sich bei 40-facher Vergrößerung durch eine deutliche Farbreaktion vom übrigen Kolongewebe ab und werden zeitgleich mittels Windows Office Excel dokumentiert.

Die Patienten, bei denen Panethzellen in den Krypten des Colon ascendens mikroskopisch nachweisbar waren, werden nach oben genannten Kriterien beurteilt und hinsichtlich ihres quantitativen Auftretens eingeteilt. Das immunhistochemische Screening identifiziert die metaplastischen Panethzellen im Colon ascendens in den Patientenkollektiven Colitis ulcerosa und M. Crohn. Für die nachfolgenden Arbeitsschritte werden nur die Patientengewebe verwendet, die in der lichtmikroskopischen Auswertung ein reichliches (> 7 Panethzellen pro Kolonkrypte) und mittelmäßiges (3 bis 7 Panethzellen pro Kolonkrypte in mehr als > 3 Krypten) Vorkommen an metaplastische Panethzellen aufweisen. Gewebeproben mit vereinzelt auftretenden Panethzellen werden bewusst



vernachlässigt um eine möglichst hohe Zellausbeute bei der aufwendigen Zellpräparation zu erreichen.



**Abbildung 2: Kolonepithel immunhistochemisch mit anti-HDEFA6 gefärbt. links:** HDEFA6-positive Panethzellen in den Krypten des C.ascendens (40-fach), **rechts:** HDEFA6-negative Zellen der Kolonkrypten (40-fach) Negativkontrolle

### 2.2.5 Anfertigung der Gewebeschnitte für die Mikrodissektion

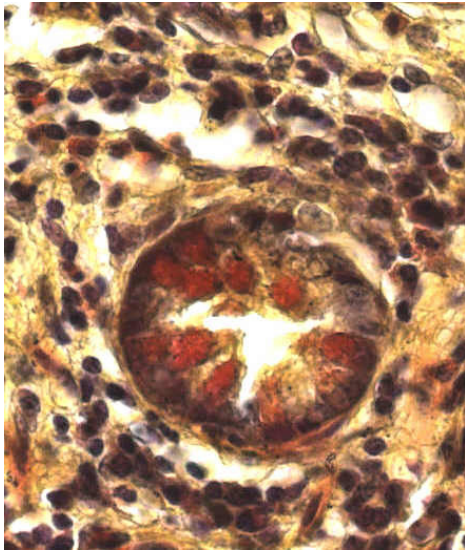
Als Ausgangsmaterial für die Mikrodissektion werden auf die vorangehend beschriebene Weise die Gewebeschnitte angefertigt. Der Unterschied in der Methodik besteht jedoch darin, dass die für die spätere RNA-Extraktion verwendeten Gewebe unter RNase freien Bedingungen bearbeitet werden. Die ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen (RNasen) katalysieren die Hydrolyse der Ribonukleinsäure (RNA). Um Verunreinigung und Fragmentierung der RNA durch Endo- und Exonukleasen zu vermeiden werden das Mikrotom, die Mikrotomklingen, die Präpariernadel, die Pinzetten sowie das Wasserbad und die Objektträgerkästen mit RNase Away® behandelt. Ferner werden DMPC-Wasser und häufig gewechselte Einmalhandschuhe verwendet. Die 3 µm dicken Schnitte werden auf nukleasefreie membranbeschichtete Objektträger aufgezogen, bei RT getrocknet und in den präparierten Objektträgerkästen bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

### 2.2.6 Färbung der Gewebeschnitte für die Mikrodissektion

Um die metaplastischen Panethzellen mittels Mikrodissektion auszuschneiden und zu sammeln, müssen diese vorab durch histochemische und immunhistochemische Fär-

bungen erneut dargestellt werden. Die verschiedenen Färbungen erfolgen an einem RNase freien Arbeitsplatz unter dem Abzug.

Die orthotopen Panethzellen des terminalen Ileums werden unter Annahme der regulären Funktion und Morphologie mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung dargestellt. Die charakteristischen eosinophilen Granulae können mit dieser Färbung sichtbar gemacht werden. Die Hämatoxylinlösung nach Meyer wird mit DMPC-Wasser und abschließender Filtration nach oben beschrieben Protokoll hergestellt. Das Bläuen erfolgt mit DMPC-behandeltem Leitungswasser. Für die Zytoplasma-Färbung wird nachfolgend eine Eosinfärbung durchgeführt. Eosin ist ein roter, saurer Farbstoff, der die für die Panethzellen charakteristischen acidophilen Granulae rot anfärbt.



**Abbildung 3: orthotope Panethzellen in einer Lieberkühnkrypte des terminalen Ileums (HE-Färbung 40-fach)**

Um die metaplastischen Panethzellen in den Kolonkrypten von den Patientenkollektiven MC und CU nachzuweisen, wird die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen das panethzellspezifische humane Defensin alpha-6 durchgeführt. Die Färbung erfolgt nach oben genanntem Protokoll, wobei die Lösungen mit DMPC-Wasser für jede Färbung neu angesetzt werden. Der lyophilisierte Primär- und Sekundärantikörper wird ebenso mit DMPC-Wasser wieder hergestellt und aliquotiert in nukleasefreien Reaktionsgefäßen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die fertigen Schnitte gelangen in 100%igem Ethanol gelagert zur Mikrodissektion.

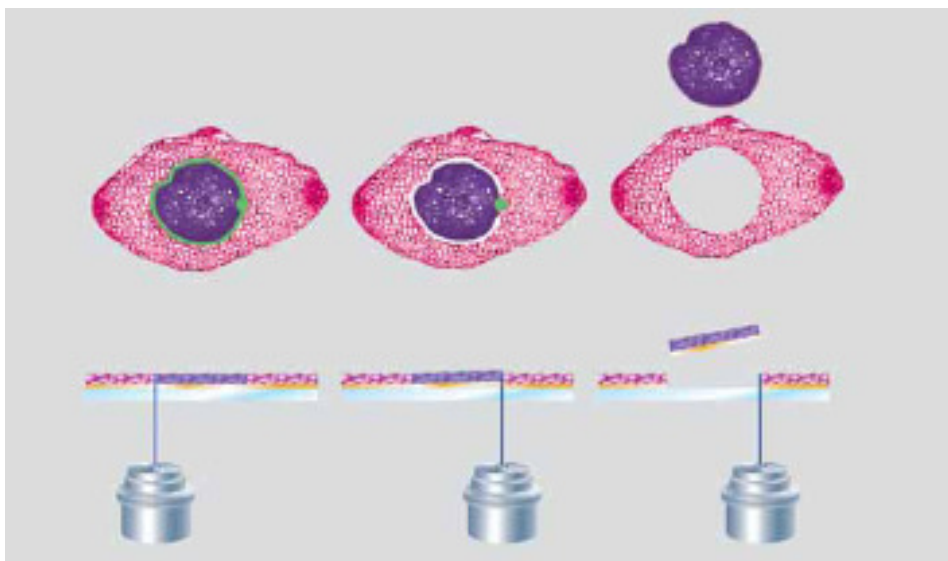
### 2.2.7 Lasergestützte Mikrodissektion

Zur Isolierung der Panethzellen als homogene Zellpopulation wird im Zuge dieser Arbeit auf die lasergestützte Mikrodissektion zurückgegriffen. Dieses Verfahren wurde Mitte der 90er Jahre von Emmert-Buck et al. zur Separierung homogenen Zellmaterials aus heterogenem Gewebe für molekularbiologische Untersuchungen entwickelt<sup>69</sup>. Ein maßgeblicher Vorteil dieser Methode besteht in der Isolierung eines morphologisch identischen Zellmaterials, an dem Analysen mit einem hohen Grad an Sensitivität durchgeführt werden.

Die Mikrodissektion der Panethzellen erfolgt mit dem Lasermikroskop PALM® Micro-Beam System der AG Fischer, Klinische Forschungsgruppe für Allergologie, am Campus Charité-Virchow-Klinikum, Berlin. Die unmittelbar vor der Mikrodissektion histochemisch und immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte werden in mit Ethanol 100% gefüllten Färbekästen transportiert. Vor Beginn der Mikrodissektion werden alle Oberflächen des Arbeitsplatzes am Lasermikroskop mit RNase Away® gereinigt. Es folgt dann die Mikroskopie in 40facher Vergrößerung. Die digitale Videokamera überträgt die Bilder der Probe an den Computer. Die Software ermöglicht die Steuerung des Motortisches sowie die Laseradjustierung hinsichtlich der Energiestärke und des Fokus. Vor dem Laserstart werden speziell für die Mikrodissektion empfohlene Reaktionsgefäße (PALM® AdhesiveCaps) in die vorgesehene Halterung gespannt. Die Funktion zur Separierung der Zellen heißt Robot-MicroBeam. Auf dem Computerbildschirm werden nacheinander die Panethzellen markiert und der Laser gestartet. Dafür wird ein gepulster Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337nm für die Laser-Mikrochirurgie und das Laser Pressure Catapulting (LPC) eingesetzt. Das Prinzip des Laserschneidens ist eine Kaltablation, die ohne Hitzewirkung chemische Bindungen photolytisch spaltet. Der Laser schneidet mit einer Fokusgröße von weniger als einem Mikrometer im Durchmesser. Angrenzende Strukturen, Gewebe oder Zellen werden nicht betroffen und bleiben völlig intakt. Die berührungslose Gewinnung der einzelnen Zellen erfolgt durch die Katapultieren-LPC-Technologie. Mit einzelnen Laserschüssen werden ausgewählte Objekte aus der Objektebene herausgeschossen und direkt in einen Deckel des Reaktionsgefäßes hinein katapultiert. Durch den starken Laserimpuls ist es möglich, einzelne zuvor ausgeschnittenen Panethzellen gegen die Schwerkraft in den Deckel hinein zu katapultieren<sup>70</sup>.



**Abbildung 4: Aufbau und Funktion des Palm Robo® Systems**



**Abbildung 5: Darstellung der lasergestützten Mikrodissektion. Links:** Der Laser schneidet das markierte Mikrodissektat aus dem umgebenden Gewebe. **Mitte und rechts:** Durch den LPC-Impuls erfolgt der kontaktfreie Transport des Mikrodissektats entgegen der Schwerkraft wenige Millimeter in den Deckel des eingespannten Reaktionsgefäßes (Prof. Dr. A. Vogel, Institute for biomedical Optics, Universität Lübeck, Deutschland)

Nachdem die Panethzellen in den Reaktionsgefäßdeckel (Cap) hineinkatapultiert wurden, erfolgt die Effektivitätskontrolle der Catapult-Funktion indem die ausgeschnittenen Zellen unter dem 40er Objektiv im Cap betrachtet werden. Anschließend werden die Zellen mit dem *Catapult-Proteinase K-Puffer* inkubiert. Proteinase K ist eine sehr aktive

Endopeptidase, die Peptidbindungen in Proteinen spaltet und außerdem zur Inaktivierung von endogenen Nukleasen eingesetzt werden kann.

Um die Zellen aus dem Deckel zu lösen werden die Proben per *Short spin* bei 14000 rpm zentrifugiert. Dann folgt die Enzymverdauung bei 55 °C im Wärmeofen über Nacht. Abschließend werden die Proben erneut bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Proben werden dann bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

### **2.2.8 DNA-Microarray**

Mithilfe von DNA-Microarrays können Änderungen in der Aktivität (Expression) bestimmter Gene in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren identifiziert werden. Die Genexpression entspricht dabei der Menge an mRNA, die in einer Zelle vorhanden ist. Die mRNA ist demnach ein Surrogat für die Genexpression und somit Genaktivität in einer Zelle<sup>71</sup>. Genexpressionsunterschiede zwischen erkranktem und Normalgewebe können mit dieser Methode untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Methode angewandt, um die Expression in orthotopen und metaplastischen Panethzellen zu vergleichen.

Zunächst wird die mRNA des zu untersuchenden Organismus isoliert. Anhand der mRNA lassen sich die DNA-Teilstücke rekonstruieren, die die von der mRNA abgelesene Information enthalten. Im Anschluss erfolgt die Markierung der rekonstruierten DNA mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Auf einem DNA-Microarray sind sämtliche Gene des zu untersuchenden Organismus auf einer Glasplatte als einsträngige DNA angeordnet (englisch array = Anordnung). Die erzeugte cDNA wird auf den DNA-Chip gegeben und die cDNA-Sequenzen binden (hybridisieren) an ihren komplementären Gegenpart. Durch die voran gegangene Markierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 (Indocarbocyanin) stellen sich die gebundenen DNA-Sequenzen als Fluoreszenzen, im Sinne grüner Punkte (spots), dar. Zur Quantifizierung der Genexpression wird die Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots auf dem Microarray mit einem Laser ermittelt. Von der Farbe und der Intensität der Fluoreszenz kann die relative Expressionsaktivität der auf dem Microarray fixierten Genfragmente der untersuchten Proben abgeschätzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden One-colour-Arrays durchgeführt, so dass pro Array eine Probe ausgewertet wurde. Auf diese Art und Weise liefert jeder der vier verwendeten Microarrays die ermittelten Intensitätswerte für den jeweiligen Pool.

### 2.2.8.1 Pooling der mikrodisssezierten Zellen

Von den mikrodisssezierten Zellen wird ein Teil nicht für die nachfolgenden Prozesse dieser Arbeit eingesetzt, um für weiterführende Untersuchungen verfügbar zu bleiben. Diese Zellen werden in Proteinase K-Puffer bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Großteil der in Proteinase K inkubierten mikrodisssezierten Proben und die als Kontrolle vorgesehene käuflich erworbene humane RNA des Colon ascendens werden auf Trockeneis gelagert und zur weiteren Bearbeitung an die Firma Miltenyi Biotec gesendet. Dort erfolgt zunächst die Lösung der Zellen mit SuperAmp™ Lyse-Puffer. Anschließend werden aufgrund der geringen Zellzahl und erwartungsgemäß geringer RNA-Ausbeute die jeweiligen Proben der drei verschiedenen Patientenkollektive zu einem Pool zusammengefasst. Neben der dadurch höheren Zellzahl bringt der auf diese Weise erfolgte Ausgleich interindividueller Unterschiede einen weiteren Vorteil des Pooling.

Das Ausgangsmaterial für die weiteren Arbeitsschritte bilden vier verschiedene Zellpools, Panethzellen Colon ascendens MC, Panethzellen Colon ascendens CU, Panethzellen terminales Ileum nicht entzündeter Tumorkontrolle und humane totale RNA des Colon ascendens als Kontrolle. Die käuflich erworbene humane RNA aus dem Colon ascendens, bestehend aus allen im humanen Colon ascendens vorkommenden Zelltypen, wurde als Kontrolle gewählt, um die panethzellspezifische Genexpression präziser bewerten zu können.

Probenr.	Zellprobe	Anzahl Patienten	Miltenyi ID
1	Metaplast. PC Colon asc. MC 3992 Zellen	9	Pool 1
2	Metaplast. PC Colon asc. CU 2947 Zellen	8	Pool 2
3	Orthotope PC Ileum Kontrolle 4332 Zellen	9	Pool 3
4	Human Adult total RNA Colon asc.		Pool 4

**Tabelle 3: Aufstellung der mikrodisssezierten Panethzellen und der Patientenpools**

### 2.2.8.2 RNA-Amplifikation

Mit Hilfe verschiedener Enzyme, Reverse Transkriptasen, kann in vitro RNA in cDNA umgeschrieben werden. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen und können sowohl RNA- als auch DNA-Sequenzen als Matrize verwenden. Dabei heftet sich zunächst die Polymerase an den RNA-Einzelstrang und ein komplementärer DNA-Strang wird gebildet. Danach wird über eine Exo-Ribonukleaseaktivität der reversen Transkriptase der Hybridstrang aus RNA-DNA hydrolysiert. Anschließend kann ein kompletter DNA-Doppelstrang synthetisiert werden.

SuperAmp® RNA Amplifikation wird entsprechend nach der von Miltenyi Biotec`s etablierten Methode durchgeführt. Die Methode der Amplifikation basiert auf einem allgemeinen PCR-Protokoll, bei dem cDNA aus mRNA abgeleitet benutzt wird. Die mRNA wird per *magnetic bead technology* isoliert.

### 2.2.8.3 Spektrophotometrische Messung der cDNA-Konzentration

Die Konzentration der amplifizierten cDNA-Proben wird anschließend spektrophotometrisch mit dem ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop Technologies) bestimmt.

Diese relativ zuverlässige und genaue Methode beruht auf dem Prinzip, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge, die möglichst beim Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz liegen sollte, beim Durchgang durch wässrige Lösungen abgeschwächt wird. Diese Abschwächung (Extinktion) ist abhängig von der Konzentration der untersuchten Substanz, ihrem spezifischen Extinktionskoeffizienten und der durchstrahlten Flüssigkeitsschichtdicke. Das *Lambert-Beersche-Gesetz* beschreibt diesen Zusammenhang:  **$E = \epsilon \times c \times D$**

E: Extinktion

$\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient in  $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$

c: Konzentration der absorbierenden Moleküle in mol/L

D: Schichtdicke der durchstrahlten Flüssigkeit in cm

Die Konzentration der cDNA in den vier verschiedenen Pools wird anhand dieser Gleichung bei konstanter Schichtdicke der verwendeten Küvette, bekanntem Extinktionskoeffizienten und durch Bestimmung der Extinktion berechnet:  $c = E / \epsilon \times D$

Zu Beginn dieser Messung werden geeignete Verdünnungen der cDNA-Proben unter Verwendung von Nuklease-freiem DMPC-Wasser hergestellt. Auch für den Leerwert wird Nuklease-freies Wasser verwendet. Im Anschluss erfolgt die Messung der Konzentration der Proben mit dem ND-1000 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, die dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren entspricht. Die nachfolgende Extinktionsbestimmung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, dient dem Ausschluss von Proteinverunreinigungen. Der aus den Absorptionsmaxima errechnete Quotient E260/E280 gibt Aufschluss über die Reinheit der cDNA. Bei optimaler Präparation liegt dieser Wert bei 2,0, sollte aber mindestens bei >1,7 liegen.

#### **2.2.8.4 Bestimmung der Intaktheit der cDNA**

Die Intaktheit der cDNA wird mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) überprüft. Die cDNA-Proben werden hierfür auf einen Chip gegeben und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff-Gemisch beladen. Die Durchführung erfolgt nach internen Protokollen der Firma Miltenyi.

#### **2.2.8.5 Hybridisierung der Agilent Whole Genome Oligo Microarrays®**

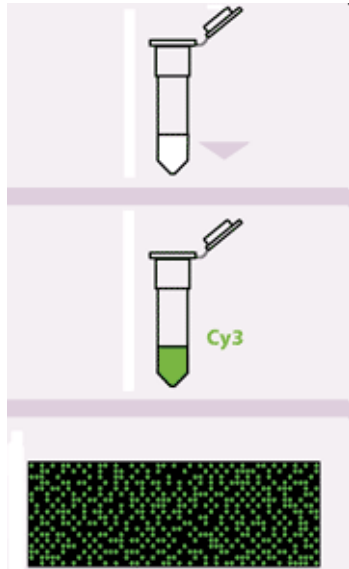
In der vorliegenden Arbeit werden *one-colour* oder *single-colour* Microarrays verwendet, die die Genintensitäten jeder Probe messen. Diese auf diese Weise einzeln gemessenen Genintensitäten der jeweiligen Proben können anschließend unter Nutzung der entsprechenden Software miteinander verglichen werden.

Für die Genexpressionsanalyse der einzelnen amplifizierten cDNA-Proben dienen vier Whole Genome Oligo Microarrays (Agilent Technologies), die auf einem 25 mm x 75 mm messenden Objektträger rechteckig angeordnet sind. Am oberen Rand befindet sich ein Strichcode zur Identifikation des Chips. Die Microarrays umfassen jeweils rund 40.000 bekannte humane Gene.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten one-colour Microarray Analyse, wird die entsprechende Probe mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cyanin 3 (Cy3), markiert und an-



schließlich mit einem Microarray hybridisiert. Der Farbstoff Cy3 wird bei einer Wellenlänge von 550 nm absorbiert und bei 570 nm emittiert, so dass die nachfolgenden *spots* grün erscheinen.



**Abbildung 6: Prinzip des One-Colour Agilent Microarray**

Mit dieser Methode kann die gemessene Genexpression des Microarrays direkt mit der der drei weiteren, mit denselben Methoden bearbeiteten Microarrays verglichen werden. Folgende Agilent Whole Genome Microarrays werden für die vorliegende Arbeit verwendet: *Pool 1: Nr.251485025269\_1\_1, Pool 2: Nr.251485025269\_1\_2, Pool 3: Nr. 251485025269\_1\_3, und Kontrolle: Nr. 251485025269\_1\_4.*

Von jeder cDNA wurden 250 ng als Vorlage für die Cy3-Markierung benutzt, was nach einem internen Protokoll der Firma Miltenyi Biotecs erfolgte. Die Cy3-markierte cDNA wurde über Nacht (17 Stunden) bei 65°C inkubiert und hybridisiert. Es wurden die von Agilents empfohlenen Hybridisierungskammern und Öfen benutzt. Am Ende werden die Microarrays drei verschiedenen Waschgängen unterzogen. Der Erste erfolgte bei Raumtemperatur mit 6 x SSPE-Puffer und einer N-lauroylsarcosinkonzentration von 0,005% für eine Minute. Anschließend wurden die Arrays in auf 37°C vor geheizten 0,06 x SSPE-Puffer bei identischer N-lauroylsarcosinkonzentration für eine weitere Minute gewaschen. Zuletzt wurden die Microarrays für 30 Sekunden in Azetonitril gewaschen.

Experiment- Nr.	Cy3	Microarray- Nr.
1	Pool 1	251485025269_1_1
2	Pool 2	251485025269_1_2
3	Pool 3	251485025269_1_3
4	Control	251485025269_1_4

**Tabelle 4: Übersicht Hybridisierung**

### 2.2.9 Bilder- und Datenanalyse

Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Agilent Microarrays werden mittels Agilent's Microarray Scanner System nachgewiesen.

Um die Microarray-Bilderdateien abzulesen und zu bearbeiten wird die Agilent Feature Extraction Software (FES) genutzt. Die Software bestimmt die Signalintensitäten einschließlich der Hintergrundsubtraktion, entfernt Ausreißer und berechnet die statistische Signifikanz. Zur Bestimmung der unterschiedlichen Genexpressionen in den vier untersuchten Zellpools werden die von der FES stammenden Daten nachfolgend mit der Rosetta Resolver® Software analysiert. Mit dieser speziellen Software ist es möglich die durch die Single-colour-Microarray-Methode errechneten Genintensitäten der einzelnen Zellpools miteinander zu vergleichen. Mit dieser Software wird die Ratio (Quotient) von jeweils zwei einzeln gemessenen Intensitätsprofilen berechnet. In nachfolgender Tabelle sind die durchgeführten Ratio-Experimente aufgeführt.

Ratio-Experiment Nr.	Intensitätsprofil Kontrolle	Intensitätsprofil Probe	Ratio- Experiment Kontrolle vs Probe
1	Kontrolle	Pool 1	Kontrolle_vs_Pool 1
2	Kontrolle	Pool 2	Kontrolle_vs_Pool 2
3	Kontrolle	Pool 3	Kontrolle_vs_Pool 3

**Tabelle 5: Übersicht der Ratio-Experimente basierend auf den einzelnen Intensitätsprofil.**

Die mittels Rosetta Resolver® Software ermittelten Daten werden anschließend mit dem Agilent/ Intensity-Intensity Profile Builder analysiert, der nun die vier Probenpools als Ratio-Experiment untereinander vergleicht.

Experiment ID	Experiment Name	Chip Barcode(s)
9241	orthotope PC Ileum vs metaplast PC Colon CU	251485025269_1_2, 251485025269_1_3
9240	hsa adult Colonasc vs metaplast PC Colon MC	251485025269_1_1, 251485025269_1_4
9242	hsa adult Colonasc vs metaplast PC Colon CU	251485025269_1_2, 251485025269_1_4
9238	metaplast PC Colon CU vs metaplast PC Colon MC	251485025269_1_1, 251485025269_1_2
9239	orthotope PC Ileum vs metaplast PC Colon MC	251485025269_1_1, 251485025269_1_3
9243	hsa adult Colonasc vs orthotope PC Ileum	251485025269_1_3, 251485025269_1_4

**Tabelle 6: Übersicht der mittels Software durchgeführten Vergleiche der einzelnen Single-colour-Microarrays**

### 2.2.10 Statistische Datenauswertung

In der vorliegenden Arbeit wurde zur weiterführenden statistischen Auswertung und zur graphischen Darstellung der Daten Microsoft Office 2003, 2007 und SPSS für Windows Version 17.0 verwendet. Die statistische Signifikanz der differentiell exprimierten Gene wurde mit dem Student'schen t-Test geprüft. In dieser Arbeit werden bezüglich des Signifikanzniveaus p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant und p-Werte  $< 0,01$  als hochsignifikant angenommen.

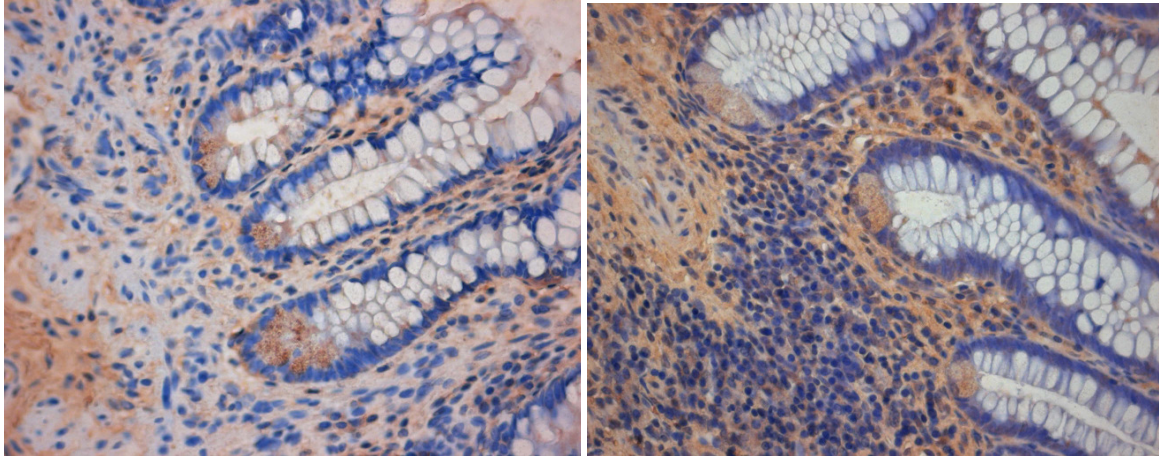
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Untersuchung der HDEFA6-Expression

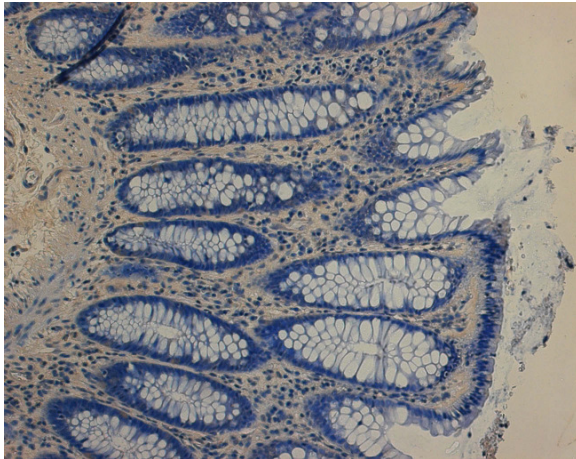
Panethzellen wurden im entzündeten Gewebe des Colon ascendens bei MC und CU im Vergleich zum nicht entzündeten Gewebe des Colon ascendens der Kontrollgruppe nachgewiesen. Mit dem Antikörper anti-HDEFA6 wurden die Paraffinschnitte der Darmgewebeproben der Patientenkollektive (MC n=36, CU n=39, Ko n=39) immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung des immunhistologisch dargestellten Proteins erfolgte lichtmikroskopisch (Vergrößerung 20-fach und 40-fach). Auf diese Weise konnte der Anteil HDEFA6 exprimierender Panethzellen in den einzelnen Gewebeschnitten identifiziert und anhand festgelegter Kriterien eine semi-quantitative Einstufung vorgenommen werden. Die Beschreibung der identifizierten Panethzellen wurde anhand festgelegter Kriterien hinsichtlich der Anzahl pro Krypte, Lage des Nukleus und der Granulae, sowie der Position innerhalb der Krypte vorgenommen. Zusätzlich erfolgte in den Panethzellpositiven Proben die Einstufung hinsichtlich der Anzahl pro Krypte nach definierten Kriterien.

Panethzellen	Symbol	Panethzellzahl pro Krypte	Panethzellpos. Krypten
abwesend	-	Keine	Keine
gering	+	< 3	< 3
mittelmäßig	++	3 – 7	> 3 <7
reichlich	+++	> 7	> 7

Tabelle 7: Kriterien zur Bewertung der immunhistochemischen Untersuchung



**Abbildung 7: Kolonepithel immunhistochemisch mit anti-HDEFA6 gefärbt. Links: HDEFA6-positive Panethzellen im Colon asc. bei MC. Rechts: HDEFA6-positive Panethzellen im Colon asc. bei CU (40-fach)**

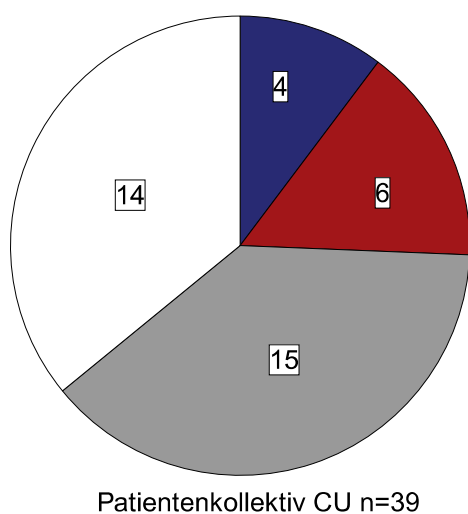
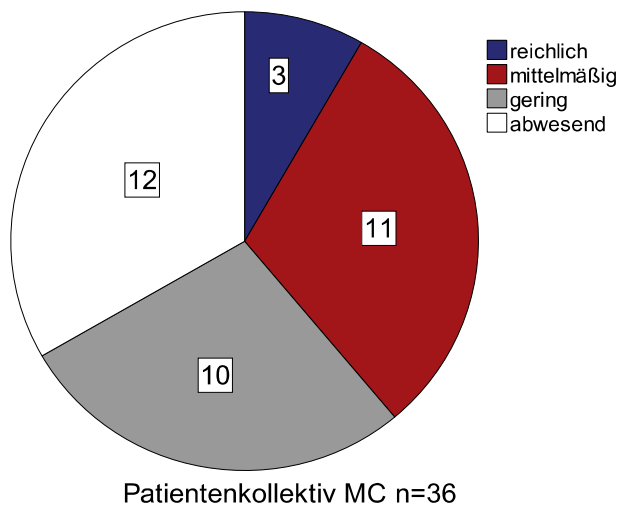


**Abbildung 8: Fehlende Panethzellexpression im Colon asc. bei der Kontrolle (20-fach)**

In dem Patientenkollektiv MC konnten bei 24 (66,7%) von 36 Patienten Panethzellen in den Kolonkrypten nachgewiesen werden. Von den positiven MC-Patienten zeigten drei (12,5 %) reichliches Vorkommen, bei 11 Patienten (45,8%) wurde eine mittelmäßige Anzahl Panethzellen detektiert und 10 Patienten (41,7%) zeigten ein geringes Vorkommen. In ihrem Verteilungsmuster und der Position innerhalb der Krypte wiesen sie keine Unterschiede zu den Dünndarmpanethzellen auf. Morphologische Veränderungen bezogen auf die typische Form, die Position des Nukleus und der Granula im Vergleich zu den Panethzellen des gesunden (nicht entzündeten) terminalen Ileums wurden nicht beobachtet.

Im Patientenkollektiv CU wurden bei 25 (64,1%) von 39 Patienten Panethzellen im Colon ascendens identifiziert. Von den positiven Patienten zeigten vier (16%) ein reichliches Vorkommen, bei sechs Patienten (24%) wurde eine mittelmäßige Anzahl an Panethzellen detektiert und 15 Patienten (60%) zeigten ein geringes Vorkommen. Morphologisch fanden sich keine relevanten Veränderungen gegenüber den Panethzellen des terminalen Ileums.

In dem Kontrollkollektiv konnten bei keinem der 39 Patienten Panethzellen im Colon ascendens nachgewiesen werden. Die Färbung wurde an jeweils sechs Gewebeschnitten pro Patient durchgeführt, die hinsichtlich des nach oben genannten Kriterien beurteilten Panethzellvorkommens ein wiederholendes Ergebnis zeigten.



**Abbildung 9: Verteilung der Panethzellen bei Patienten mit MC und CU**

### 3.2 Mikrodissektion und Bildung von Untersuchungsgruppen

Zur Isolierung der homologen Zellpopulation der Panethzellen aus heterogenem Kolongewebe wurden aus den in den Voruntersuchungen als positiv getesteten nur Patienten ausgewählt, die reichlich oder ausreichend Panethzellen zeigten, um eine vorzugsweise hohe Zellausbeute zu sichern. Das Patientenkollektiv MC umfasst neun Patienten aus deren Proben insgesamt 6066 mikrodissezierte Panethzellen gesammelt wurden, die mittlere Anzahl lag bei 674 Zellen pro Patient. Das Patientenkollektiv CU schließt acht Patienten ein aus deren Proben insgesamt 4538 mikrodissezierte Panethzellen gewonnen wurden, die mittlere Anzahl lag bei 567 Zellen pro Patient. Die Gruppe der Gewebeproben des terminalen Ileums umfasst neun Patienten aus deren Proben insgesamt 7293 Panethzellen asserviert wurden, wobei die mittlere Anzahl bei 810 Zellen pro Patient liegt.

	Panethzellen C. asc. MC	Panethzellen C. asc. CU	Panethzellen term. Ileum Kontrolle
Patienten	n=9	n=8	n=9
Mittleres Alter	36	43	66
Mittlere Anzahl Zellen pro Patient	674	567	810
Gesamtanzahl Zellen	6066	4538	7293

**Tabelle 8: Übersicht der Patientenkollektive und Anzahl der mikrodissezierten Panethzellen**

Die Anzahl der mikrodissezierten Zellen variiert zwischen den einzelnen Patientenkollektiven. Im terminalen Ileum kommen die Panethzellen definitionsgemäß reichlich vor. Diese Panethzellen werden orthotop genannt.

Aus den mikrodissezierten Zellen der drei Patientenkollektive wurden dementsprechend drei Untersuchungsgruppen (Pools) gebildet. Das *Pooling* diente in erster Linie dem Ausgleich interindividueller Unterschiede der einzelnen Patienten. Zum anderen resultierte daraus die Vermehrung des Ausgangsmaterials für die RNA-Isolierung.

Probennr.	Zellprobe	Patienten	Zellen	Miltenyi ID
1	Metaplast. PC C.asc. MC	9	3992	Pool 1
2	Metaplast. PC C.asc. CU	8	2947	Pool 2
3	Orthotope PC term. Ileum Kontrolle	9	4332	Pool 3
4	Human Adult Total RNA C. asc.			Pool 4

**Tabelle 9: Übersicht der gebildeten Patientenpools**

### 3.3 Konzentrations- und Qualitätsbestimmungen der cDNA

Hinsichtlich der Konzentration der cDNA zeigen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Pool. Die cDNA-Konzentration der metaplastischen Panethzellen bei MC (Pool 1) beträgt 82,9 ng/µl, die der metaplastischen Panethzellen bei CU (Pool 2) 85,2 ng/µl. Eine deutlich höhere cDNA-Konzentration enthalten die orthotopen Panethzellen (Pool 3) mit 140,7 ng/µl sowie die industriell hergestellte gemittelte humane Colon ascendens-RNA (methodische Kontrolle) mit 189,3 ng/µl. Diese cDNA-Konzentrationsunterschiede ergeben sich aus der der RNA-Isolierung unterschiedlichen Anzahl zugeführter Zellen. Ebenso zeigen sich Unterschiede in der Gesamtmenge der isolierten cDNA, die in Pool 1 und Pool 2 jeweils 1,7 µg beträgt. Aus den Zellen Pools 3 konnte eine cDNA-Gesamtmenge von 2,8 µg. Die cDNA-Gesamtmenge der käuflich erworbenen RNA beträgt 3,8 µg.

Wie vorangehend im Kapitel 2.2.8.3 beschrieben, dient die Bestimmung der Absorptionsmaxima der verwendeten Proben und der daraus berechnete Quotient E260 / E280 der Beurteilung der Reinheit der cDNA. Dieser Quotient sollte > 1,7 betragen damit eine angemessene Reinheit der Proben für die folgenden Untersuchungen gegeben ist.

Die Qualität der cDNA aus den verwendeten Paraffinproben wird als ausreichend bewertet. Die gemessenen Werte der käuflich erworbenen Kontrollprobe weichen nur geringfügig ab.

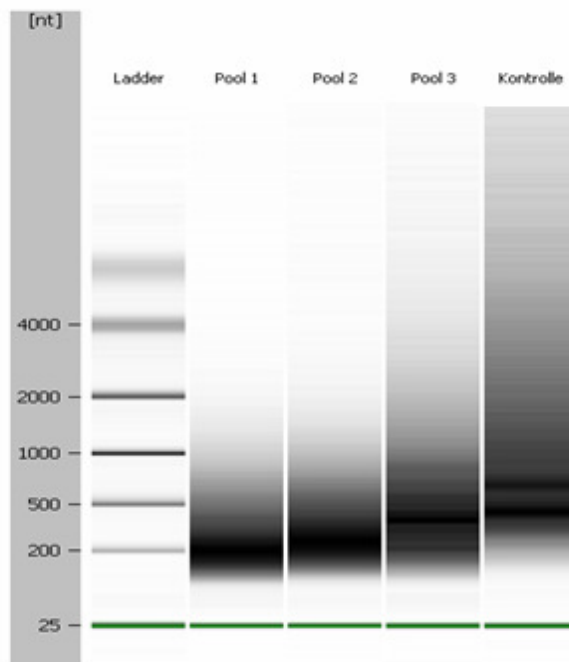


Zellprobe	Konzentration (ng/μl)	Ratio (260/280)	Volumen (μl)	Gesamtmenge cDNA (μg)
Pool 1	82,9	1,8	20	1,7
Pool 2	85,2	1,8	20	1,7
Pool 3	140,7	1,7	20	2,8
Kontrolle	189,3	1,8	20	3,8

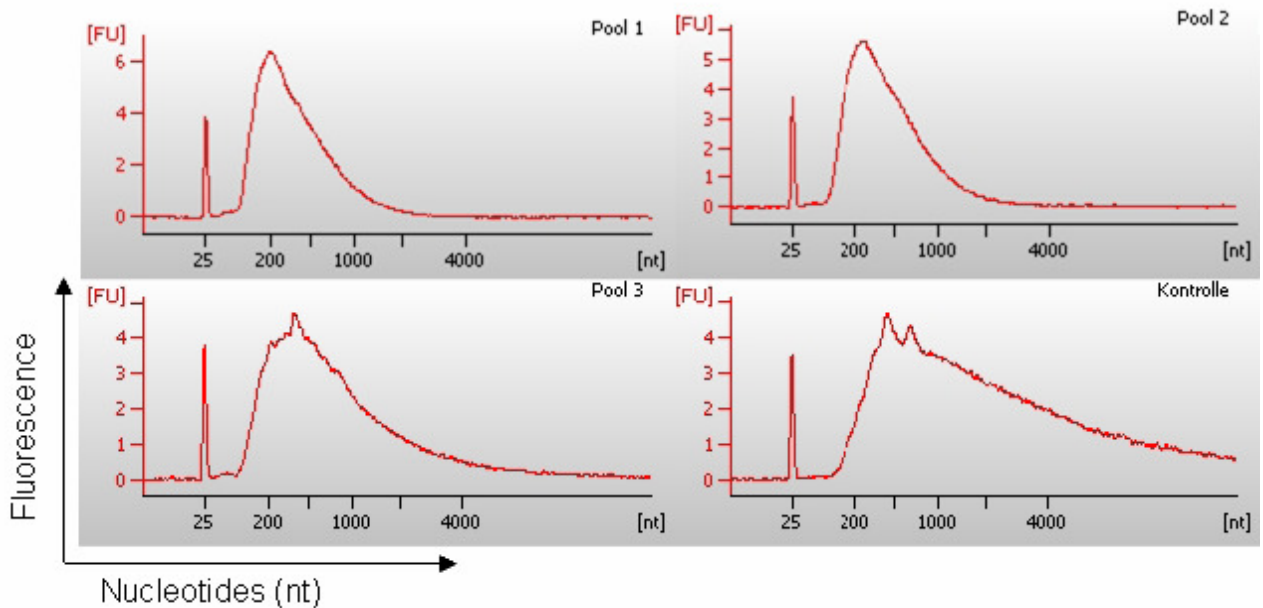
**Tabelle 10: Ergebnis der spektrophotometrischen Messung**

Unter Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzer® konnte die Intaktheit der RNA geprüft werden. Degradierete RNA enthält einen hohen Anteil an RNA-Fragmenten mit einer geringen Nukleotidanzahl. Die Ergebnisse des Bioanalyzerauslaufs werden als Gelimage und Elektropherogramm (Abb. 10 A, B), entsprechend der verwendeten Agilent 2100 Bioanalyzer expert Software, dargestellt. Die durchschnittliche Länge der hoch-amplifizierten cDNA der verwendeten Proben liegt zwischen 200 und 1000 Nukleotiden, entsprechend Basenpaaren (bp).

## A Gel



## B Electropherograms



**Abbildung 10: Gel-Image (A):** Die erste Spalte zeigt das DNA-Molekulargewicht in Nukleotiden (nt). Die niedrige grüne Bande repräsentiert einen internen Standard der Firma Miltenyi Biotec. Die Skalierung der y-Achse erfolgt automatisch je nach Stärke des Signals des jeweiligen Laufes. **Elektropherogramme (B):** Es wird die Fluoreszenzsignalstärke (y-Achse) bei der Nukleotidanzahl (x-Achse) in den jeweiligen Pools gezeigt.

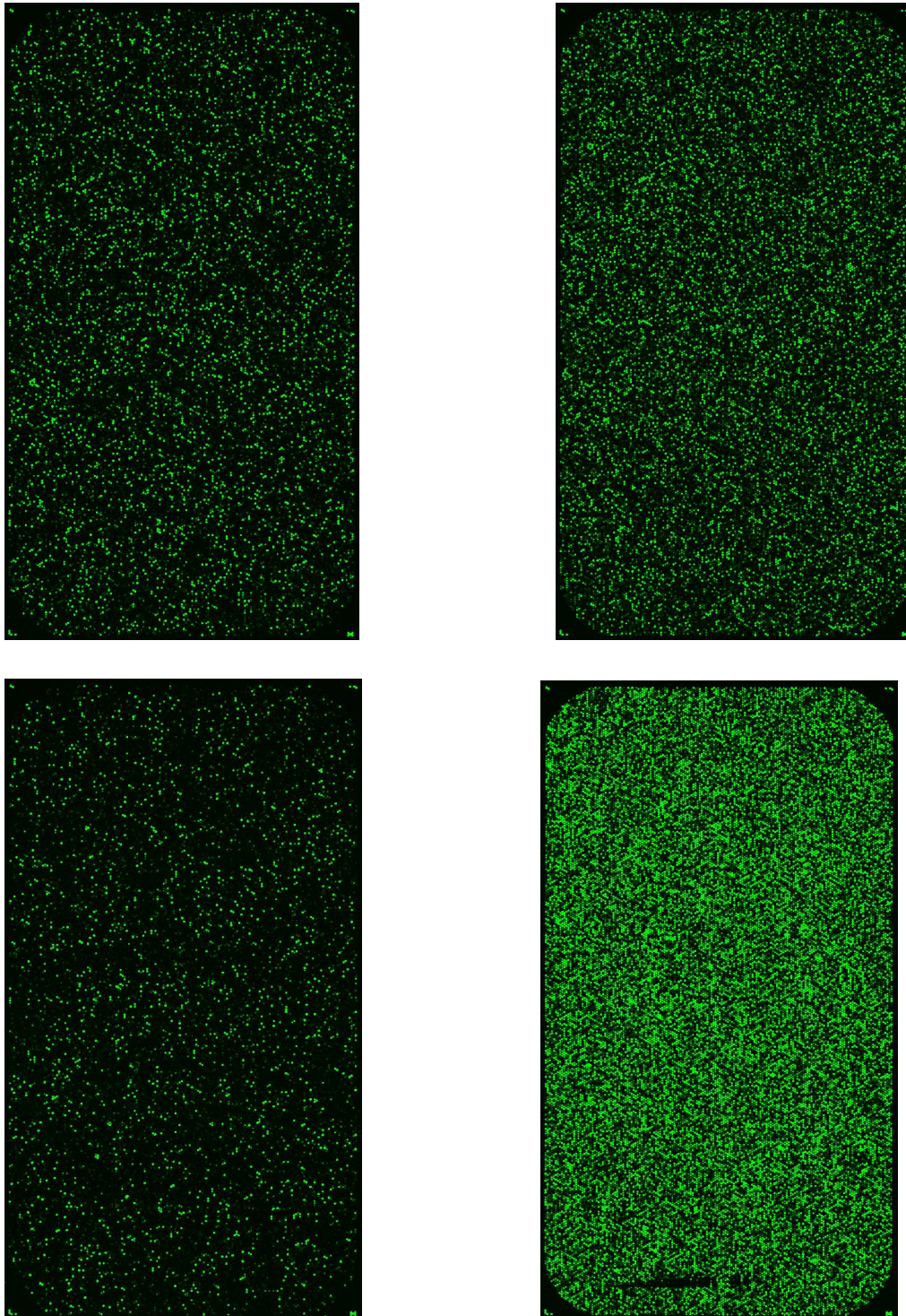
### **3.4 Microarray**

Unter Verwendung von DNA-Microarrays wurde zunächst eine genomweite Expressionsanalyse der metaplastischen und orthotopen Panethzellen, sowie der als Kontrolle dienenden humanen RNA des Colon asc. durchgeführt. Dazu wurde totale RNA aus den mikrodisszezierten Panethzellen von Patienten mit M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollprobanden ohne CED isoliert und deren Expressionsprofile mittels Agilent Whole Genome Microarrays® analysiert.

#### **3.4.1 Intensitätsprofile der Whole Genome Microarrays®**

Nachdem die einzelnen amplifizierten Cy3-gelabelten cDNA-Proben mit insgesamt vier Whole Genome Oligo Microarrays® von Agilent Technologies hybridisiert wurden erfolgt die Detektion der fluoreszierenden *spots* mit dem *Agilent`s Microarray Scanner System* .

Aus den vielen Bildpunkten (Spots) wurde eine zusammenfassende Maßzahl der Helligkeitspixel gebildet. Es folgte die Bildung des Mittelwertes aller dem Hintergrund zugeordneten Pixel und aller der Probe zugeordneten Pixel. Anschließend wurde für den Intensitätswert der Hintergrundmittelwert vom Probenmittelwert abgezogen. Um annähernd normal verteilte Werte zu erhalten, wurde mit logarithmierten Intensitäten gearbeitet. Das Ablesen und die Bearbeitung der Microarray-Bilderdateien erfolgte mit der Agilent Feature Extraction Software (FES). Die Software bestimmt die Signalintensitäten einschließlich der Hintergrundsubtraktion, entfernt Ausreißer und berechnet die statistische Signifikanz.

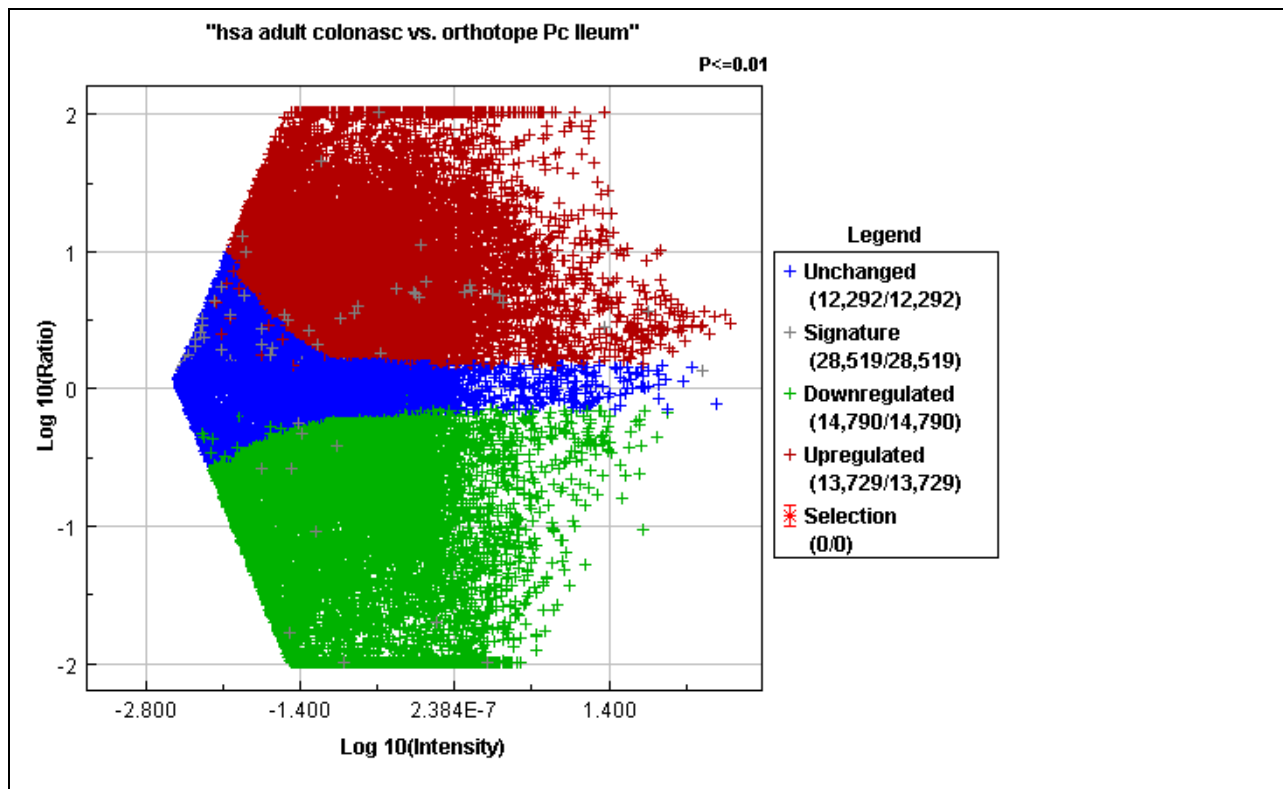


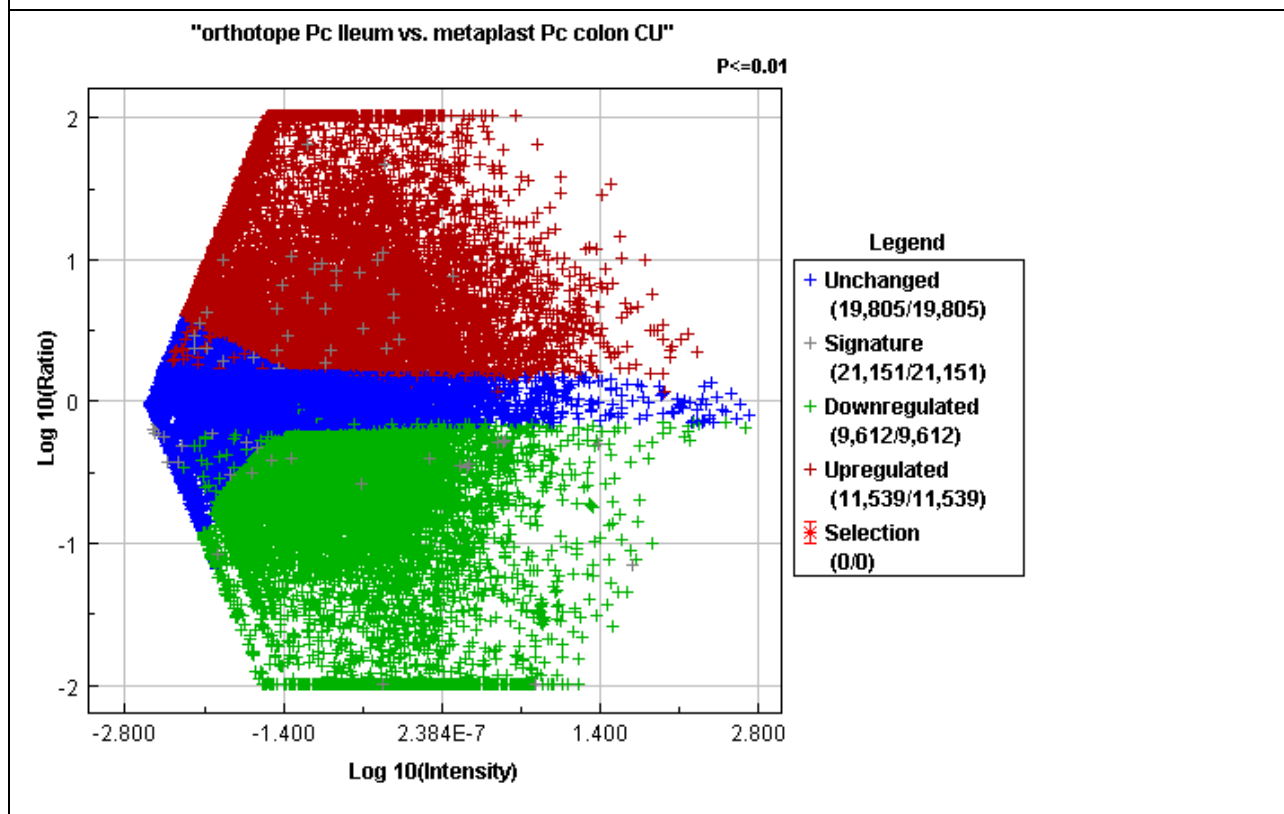
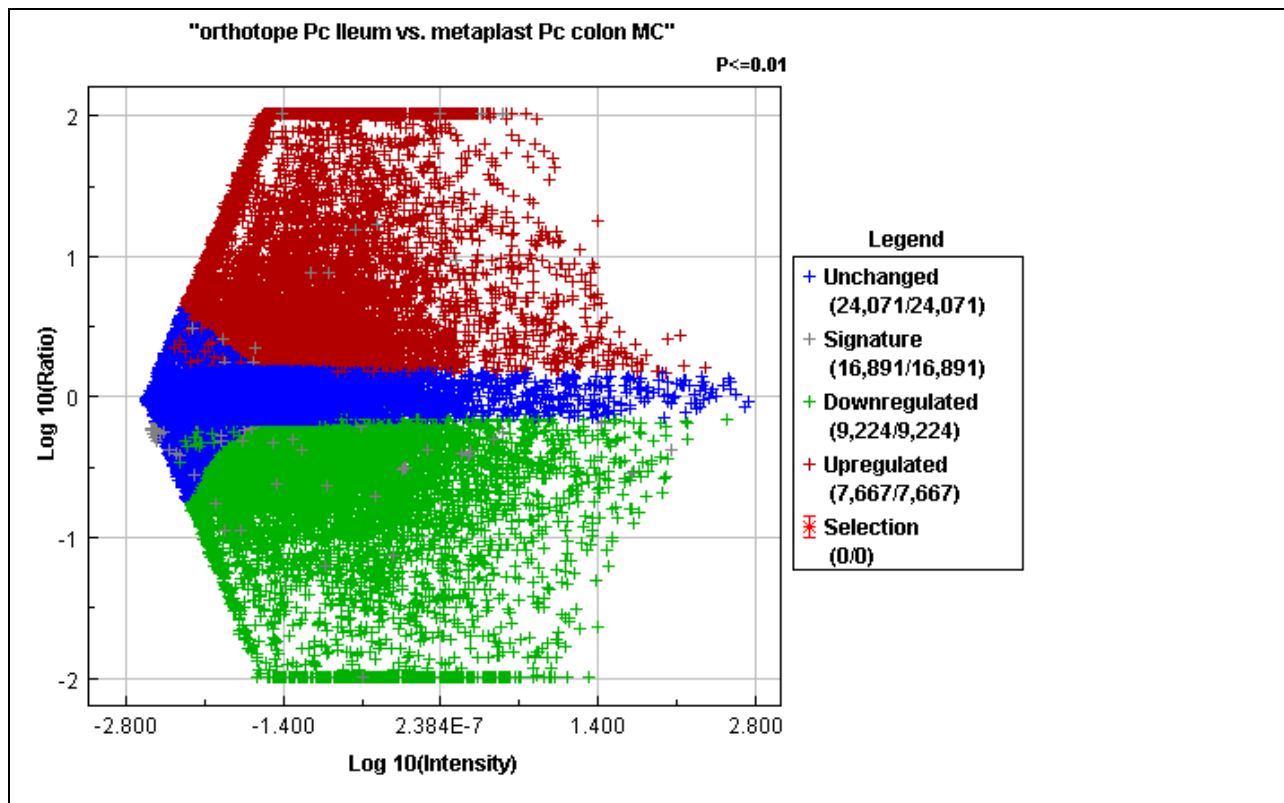
**Abbildung 11: Detektion der fluoreszierenden Intensitätssignale mit dem Agilent's Microarray Scanner System.** Die gebundene cDNA der jeweiligen Probe ist als grüner Spot erkennbar. **Oben rechts:** Probe metaplastische PC MC, **oben links:** Probe metaplastische PC CU, **unten rechts:** Probe orthotope PC Ileum Kontrolle, **unten links:** Human Adult total RNA C.asc.

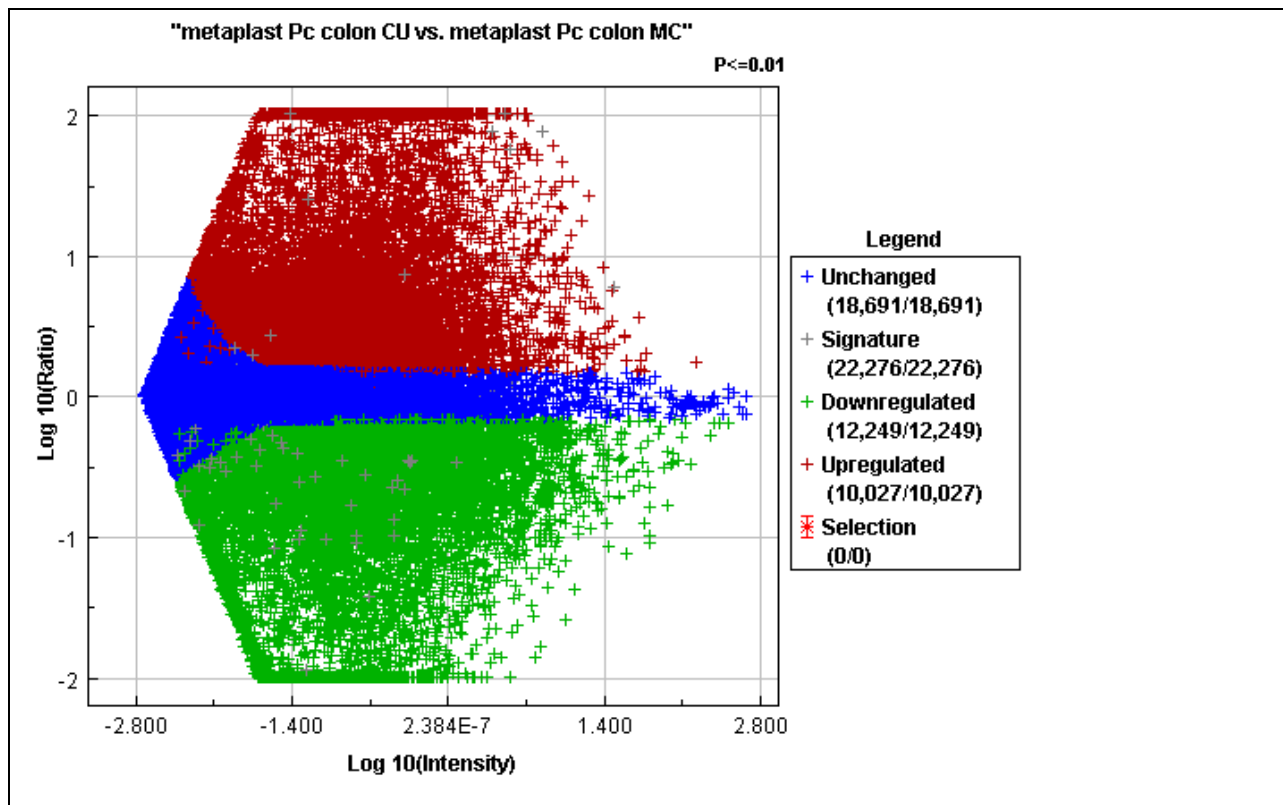
### 3.4.2 Streudiagramme der Ratio-Experimente

Die Fold Change-Analyse wird zur Identifizierung von Genen mit unterschiedlicher Expressionsratio (-aktivität) genutzt. Fold Change (FC) beschreibt die relative Veränderung der Expressionsaktivität zwischen zwei verschiedenen Proben. Eine positive FC zeigt eine erhöhte Expressionsaktivität der ersten Probe an, während eine negative FC eine erniedrigte Expression in der ersten Probe kennzeichnet. Allgemein wird eine  $FC > 2$  als erhöhte Expression interpretiert. Wohingegen bei einer  $FC < 2$  eine erniedrigte Expression angenommen wird.

Mittels Rosetta Resolver®-Software erfolgte die Fold-change-Analyse von zwei verschiedenen Expressionsprofilen. Intensitätswerte können als Ratios, Log2 oder Unterschiede verglichen werden. Durch ein Streudiagramm erfolgte die Ausgabe der Dateien, die die visuelle Erfassung aller Fold Changes der beiden analysierten Arrays ermöglichte.







**Abbildung 12: Streudiagramme der gemessenen Signalintensitäten (Microarray Service Report von Miltenyi Biotec).** Die Signalintensitäten jedes gemessenen Merkmals werden als Rasterpunkte dargestellt. **Blaues Kreuz:** unveränderte Gene, **rotes Kreuz:** signifikant hochregulierte Gene (p-Wert < 0,01), **grünes Kreuz:** signifikant herunter regulierte Gene (p-Wert < 0,01), **graues Kreuz:** Übersicht aller hoch- und herunter regulierten Gene

Die Signalintensitäten der verschiedenen exprimierten Gene wurden mit den One-Colour-Arrays für jeden Zellpool gemessenen. Mittels Resolver-Software konnten die jeweiligen Werte der vier Pools untereinander als Ratioexperimente verglichen werden. Zunächst umfasste der Vergleich Kontrolle Colon asc. mit den orthotopen PC insgesamt 40811 Gene. Von diesen zeigten 12292 eine unveränderte und 28519 eine veränderte Genexpression. In der Kontroll-RNA des Colon asc. waren 13729 Gene hochreguliert und 14790 Gene herunter reguliert. Zwischen den orthotopen PC und den metaplastischen PC bei MC zeigten von den insgesamt 40962 exprimierten Genen 24071 eine unveränderte und 16891 eine veränderte Expression. Der Vergleich zwischen orthotopen PC und metaplastischen PC bei CU umfasste 40956 Gene, von denen 19805 eine unveränderte und 21151 eine veränderte Expression zeigten. In den orthotopen PC waren 11539 Gene hochreguliert und 9612 Gene herunter reguliert. Zwischen den metaplastischen PC bei CU und MC

zeigten von den insgesamt 40967 exprimierten Genen, 18691 eine unveränderte und 22276 eine veränderte Genexpression. Von den veränderten Genen waren 10027 Gene in den metaplastischen PC bei CU im Vergleich zu MC hochreguliert und 12249 Gene herunter reguliert. Anhand der eben genannten Zahlen und ihrer bildlichen Darstellung (Abb. 12) zeigte sich im Vergleich der Kontroll-RNA mit den orthotopen PC eine deutliche Mehrheit der verändert exprimierten Gene als in den Vergleichen zwischen den PC. Die verwendete Kontroll-RNA des Colon asc. besteht aus vielen differenten Zellpopulationen des humanen Colon asc. und die Genexpression ist dementsprechend vielfältiger.

Exprimierte Gene	Kontrolle C. asc. vs orthotope PC	orthotope PC vs metapl PC MC	orthotope PC vs metapl PC CU	metapl PC CU vs metapl PC MC
gesamt	40811	40962	40956	40967
unverändert	12292 <b>(30,1%)</b>	24071 <b>(58,8%)</b>	19805 <b>(48,4%)</b>	18691 <b>(45,6%)</b>
verändert	28519 <b>(69,9%)</b>	16891 <b>(41,2%)</b>	21151 <b>(51,6%)</b>	22276 <b>(54,4%)</b>
hochreguliert	13729 <b>(48,1%)</b>	7667 <b>(45,4%)</b>	11539 <b>(54,6%)</b>	10027 <b>(45,0%)</b>
herunter reguliert	14790 <b>(51,9%)</b>	9224 <b>(54,6%)</b>	9612 <b>(45,4%)</b>	12249 <b>(55,0%)</b>

**Tabelle 11: Übersicht der Genexpression in den Ratioexperimenten**



### **3.5 Genexpressionsanalyse der orthotopen und metaplastischen Panethzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Bei der Untersuchung auf Expressionsunterschiede wurde der Vergleich zwischen orthotopen Panethzellen und metaplastischen Panethzellen von MC und CU durchgeführt. Ziel ist dabei die Detektion von Unterschieden der Expressionsstärke der panethzellspezifischen Gene, sowie spezieller Gene des Wnt-Signalwegs und der NALP-Proteine um eine Aussage über die Funktion und Rolle in der Pathogenese der Panethzellen bei CED treffen zu können.

#### **3.5.1 Expression von HDEFA5, HDEFA6, PLA2 und SLPI**

Die HDEFA5-Expression der orthotopen PC ist im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. mit einer FC von -100 deutlich niedriger exprimiert ( $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC zeigen im Vergleich zu den orthotopen PC eine Überexpression von HDEFA5 mit einer FC von +8,5 ( $p < 0,01$ ). Eine deutliche Überexpression von HDEFA5 zeigen die metaplastischen PC bei CU im Vergleich zu den orthotopen PC (FC +100,  $p < 0,01$ ). Dahingegen ist die HDEFA5-Expression der metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu den metaplastischen PC bei CU deutlich herunter reguliert (FC -46,28,  $p < 0,01$ ).

HDEFA6 wird von den orthotopen PC ist im Vergleich zur RNA des humanen Colon asc. deutlich niedriger exprimiert (FC -100,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC zeigen im Vergleich zu den orthotopen PC eine dezente Überexpression von HDEFA6 (FC +4,99,  $p < 0,01$ ). Eine deutliche Überexpression von HDEFA6 zeigen die metaplastischen PC bei CU im Vergleich zu den orthotopen PC (FC +100,  $p < 0,01$ ). Die HDEFA6-Expression der metaplastischen PC bei MC ist im Vergleich zu den metaplastischen PC bei CU deutlich erniedrigt (FC -100,  $p < 0,01$ ).

Die PLA2-Expression der orthotopen PC ist im Vergleich zur RNA des humanen Colon asc. stark hochreguliert (FC +100,  $p < 0,01$ ). Sowohl die metaplastischen PC bei MC als auch bei CU zeigen eine dezent erniedrigte PLA2-Expression verglichen mit den orthotopen PC (FC<sub>MC</sub> -3,45, FC<sub>CU</sub> -11,99,  $p < 0,01$ ). Die PLA2-Expression zeigt sich im Vergleich zwischen den metaplastischen PC bei MC und CU unverändert (FC +1,98,  $p < 0,01$ ).

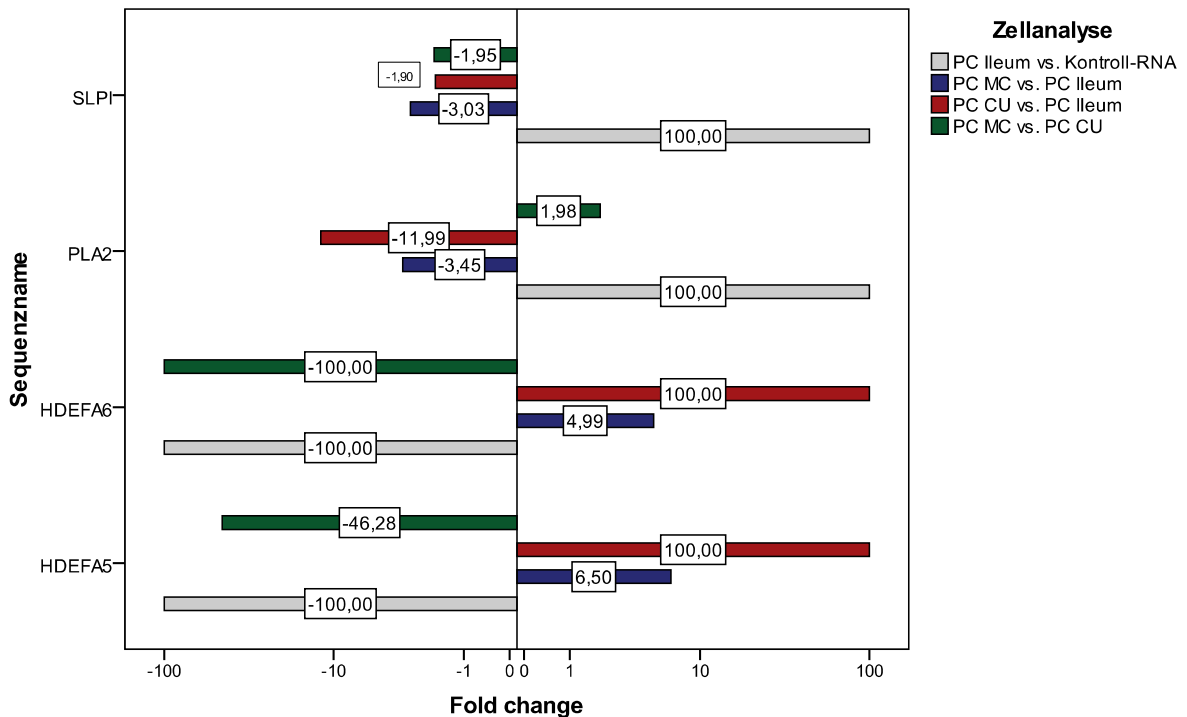
Die SLPI-Expression der orthotopen PC ist im Vergleich zu den Zellen des Colon asc. stark hochreguliert (FC +100,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC zeigen im Ver-

gleich zu den orthotopen PC eine leicht erniedrigte Expression von SLPI (FC -3,03,  $p < 0,01$ ). Der Vergleich von metaplastischen PC bei CU mit orthotopen PC wird bei einem  $p > 0,05$  als statistisch nicht signifikant gewertet.

Als weiterer panethzellspezifischer Marker wird die Expression von MMP-7 untersucht. In den Ratioexperimenten stellen sich hierbei hinsichtlich der ermittelten Fold Change keine statistisch signifikanten Unterschiede dar ( $p > 0,05$ ). Die Expression des TLR9-Transkripts, als panethzellspezifischer zytoplasmatischer Rezeptor, zeigt in den Experimenten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Zusammenfassend kann bezüglich der Expressionsanalyse panethzellspezifischer Gene eine deutlich erniedrigte Expression von HDEFA5 und HDEFA6 in orthotopen PC im Vergleich zur Kontroll-RNA ermittelt werden. Außerdem kann eine signifikante Überexpression von HDEFA5 und -6 bei CU im Vergleich zu orthotopen PC gezeigt werden. Weiterhin ist die HDEFA5 und -6-Expression der metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU signifikant erniedrigt.

Die orthotopen PC zeigen eine signifikante Überexpression der panethzellspezifischen Marker PLA2 und SLPI im Vergleich zu Kontroll-RNA des Colon asc. PLA2 wird in metaplastischen PC bei MC und CU im Vergleich zu orthotopen PC vermindert exprimiert.



**Abbildung 13: Darstellung der Genexpression der panethzellspezifischen Gene HDEFA5, HDEFA6, PLA2 und SLPI**

### 3.5.2 Expression von Genen des WNT Signalweges

Bei der Expressionsanalyse des Wnt-Signalweges wurde zwischen extrazellulären und intrazellulären Komponenten unterschieden. Nach Aktivierung der Signalkaskade durch die Wnt-Proteine wird der GSK-3 $\beta$ /APC/Axin-Komplex inaktiviert. Das somit freie  $\beta$ -Catenin häuft sich im Zytoplasma an und transferiert in den Zellkern, wo es an TCF4 bindet und die Transkription verschiedener Gene auslöst, die zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle führen.

Die WNT1-Expression der orthotopen PC ist im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. niedriger (FC -9,00,  $p < 0,01$ ). Eine erniedrigte Expression von WNT1 zeigen weiterhin die metaplastischen PC bei CU im Vergleich zu den orthotopen PC (FC -24,69,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC zeigen im Vergleich zu den orthotopen PC und den metaplastischen PC bei CU keine Unterschiede der WNT1-Expression.

WNT3 wird von den orthotopen PC ist im Vergleich zu Zellen des humanen Colon asc. deutlich niedriger exprimiert (FC -34,71,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC und CU zeigen im Vergleich zu den orthotopen PC eine dezente Überexpression von WNT3 (FC<sub>MC</sub>

+2,14,  $FC_{CU} +4,35$   $p < 0,01$ ). Eine dezent höhere Expression zeigen die metaplastischen PC bei CU im Vergleich zu den metaplastischen PC bei MC ( $FC +2,19$ ,  $p < 0,01$ ).

Die WNT3a-Expression der orthotopen PC ist im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. niedriger ( $FC -19,47$ ,  $p < 0,01$ ). Eine gering erhöhte Expression von WNT3a zeigen die metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu den orthotopen PC ( $FC +2,35$ ,  $p < 0,01$ ). Ansonsten stellt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zellpools hinsichtlich der WNT3a-Expression dar.

WNT5b zeigt bis auf eine erniedrigte Expression ( $FC -4,21$ ,  $p < 0,01$ ) in orthotopen PC im Vergleich zu Zellen des humanen Colon asc, keine signifikanten Unterschiede.

Eine erniedrigte WNT6-Expression wird in orthotopen PC im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. gezeigt ( $FC -16,13$ ,  $p < 0,01$ ). Sowohl die metaplastischen PC bei MC als auch bei CU zeigen im Vergleich mit orthotopen PC eine erhöhte WNT6-Expression ( $FC_{MC} +2,71$ ,  $FC_{CU} +11,96$   $p < 0,01$ ). Weiterhin zeigt sich ein Unterschied in der WNT6-Expression zwischen den metaplastischen PC bei MC und CU. Die Expression ist bei PC bei MC erniedrigt ( $FC -5,54$ ,  $p < 0,01$ ).

Orthotope PC zeigen eine signifikant erniedrigte Expression von WNT7a ( $FC -5,76$ ,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontroll-RNA des humanen Colon asc. Die WNT7a-Expression der metaplastischen PC bei MC ist im Vergleich zu orthotopen PC vermindert ( $FC -8,08$ ,  $p < 0,01$ ). Ein Unterschied im Vergleich CU und orthotopen PC findet sich nicht. Darüber hinaus zeigt sich eine deutlich höhere WNT7a-Expression in metaplastischen PC bei CU als bei MC ( $FC +12,95$ ,  $p < 0,01$ ).

Orthotope PC zeigen eine signifikant erniedrigte Expression von WNT7b ( $FC -17,04$ ,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontroll-RNA des humanen Colon asc. Die WNT7b-Expression der metaplastischen PC bei MC und CU ist im Vergleich zu orthotopen PC erhöht ( $FC_{MC} +2,21$ ,  $FC_{CU} +3,47$ ,  $p < 0,01$ ).

Eine erniedrigte WNT8a-Expression wird in orthotopen PC im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. gezeigt ( $FC -34,28$ ,  $p < 0,01$ ). Sowohl die metaplastischen PC bei MC als auch bei CU zeigen im Vergleich mit orthotopen PC eine erhöhte WNT8a-Expression ( $FC_{MC} +2,64$ ,  $FC_{CU} +2,44$   $p < 0,01$ ).

Eine erniedrigte WNT9b-Expression wird in orthotopen PC im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. gezeigt. (FC -4,44,  $p < 0,01$ ). Die WNT9b-Expression der metaplastischen PC bei CU ist im Vergleich zu orthotopen PC vermindert (FC -2,92,  $p < 0,01$ ). Weiterhin zeigt sich ein Unterschied in der WNT9b-Expression zwischen den metaplastischen PC bei MC und CU. Die Expression ist in PC bei MC erhöht (FC +3,14,  $p < 0,01$ ).

Orthotope PC zeigen eine signifikant erniedrigte Expression von WNT10a (FC -8,57,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontroll-RNA des humanen Colon asc. Die WNT10a-Expression der metaplastischen PC bei MC ist im Vergleich sowohl zu orthotopen PC (FC +2,43,  $p < 0,01$ ) als auch zu metaplastischen PC bei CU (FC +2,46,  $p < 0,01$ ) erhöht.

Die WNT10b-Expression ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontroll-RNA signifikant erhöht (FC 16,49,  $p < 0,01$ ). Die WNT10b-Expression in metaplastischen PC bei CU ist im Vergleich zu orthotopen PC vermindert (FC -5,08,  $p < 0,01$ ).

Eine erniedrigte WNT11-Expression wird in orthotopen PC im Vergleich zur Humanen RNA des Colon asc. gezeigt. (FC -5,86,  $p < 0,01$ ). Weiterhin zeigt sich ein Unterschied in der WNT11-Expression zwischen den metaplastischen PC bei MC und CU. Die Expression ist in PC bei MC erhöht (FC +6,90,  $p < 0,01$ ). Im Vergleich orthotoper PC und metaplastische PC bei MC scheint eine geringer Überexpression von WNT11 auf Seiten der PC bei MC zu liegen (FC +3,59,  $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend zeigt die Genexpressionanalyse extrazellulärer Wnt-Komponenten eine mehrheitlich signifikant verminderte Expression in orthotopen Panethzellen im Vergleich zur Kontroll-RNA des C. asc., mit Ausnahme des WNT10B, welches mit einer FC von +16,49 in orthotopen PC hochreguliert scheint. Weiterhin zeigen WNT3, WNT6 und WNT7A eine verminderte Expression in metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu CU. Hingegen scheinen WNT9B, WNT10A und WNT11 in metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu CU hochreguliert. Weiterhin zeigen WNT3, WNT3A, WNT6, WNT7B und WNT8A eine signifikant verstärkte Expression in metaplastischen Panethzellen sowohl bei MC als auch bei CU im Vergleich zu orthotopen PC. WNT1, WNT9B und WNT10B scheinen signifikant vermindert exprimiert in metaplastischen PC bei CU verglichen mit orthotopen PC.

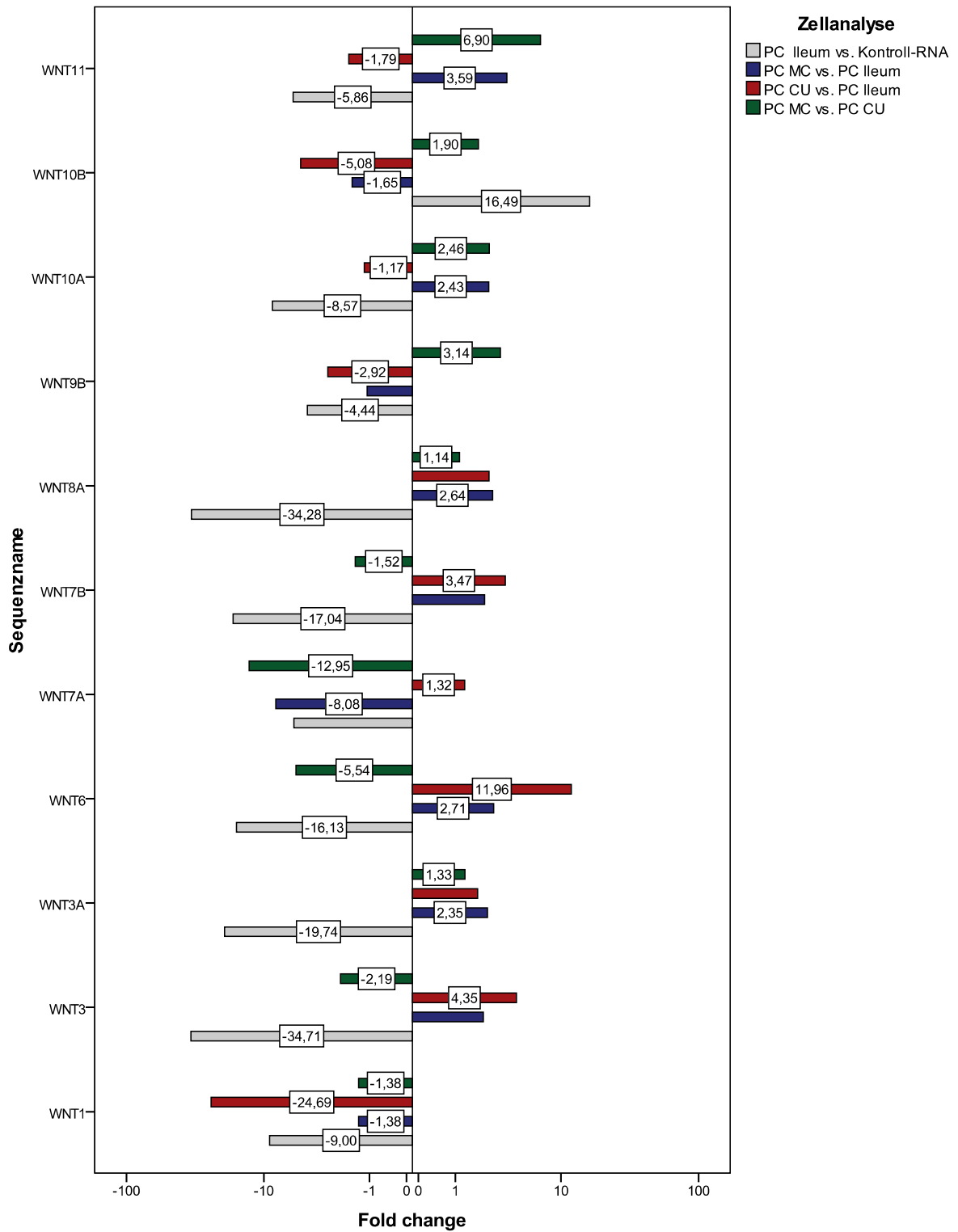


Abbildung 14: Darstellung der Expression extrazellulärer Wnt-Gene

Orthotope PC zeigen eine signifikante Überexpression von  $\beta$ -Catenin (FC +100,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontroll-RNA des humanen Colon asc. Die  $\beta$ -Catenin-Expression der metaplastischen PC bei MC und CU weist keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den orthotopen PC auf ( $p > 0,05$ ). Darüber hinaus zeigt sich auch kein signifikanter Unterschied in der  $\beta$ -Catenin-Expression von metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU ( $p > 0,05$ ).

Die Expression von TCF4 ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (FC +15,10,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC weisen im Vergleich zu den orthotopen PC eine dezente Erhöhung der TCF4-Expression auf (FC +4,23,  $p < 0,01$ ). Zwischen metaplastischen PC bei CU und orthotopen PC können hinsichtlich der TCF4-Expression keine Unterschiede nachgewiesen werden (FC +1,75,  $p < 0,01$ ). In metaplastischen PC bei MC ist die TCF4-Expression im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU leicht erhöht (FC +2,47,  $p < 0,01$ ).

Die Expression von TCF1 ist in den orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (FC +1,71,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC weisen im Vergleich zu den orthotopen PC eine deutlich erniedrigte TCF1-Expression auf (FC -100,  $p < 0,01$ ). Zwischen metaplastischen PC bei CU und orthotopen PC können hinsichtlich der TCF1-Expression keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ). Metaplastische PC bei MC zeigen eine signifikant erniedrigte TCF1-Expression im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU (FC -100,  $p < 0,01$ ).

Orthotope PC zeigen eine erniedrigte Expression von Fzd5 im Vergleich zur Kontrolle, RNA des humanen Colon asc (FC -3,32,  $p < 0,01$ ). Die Fzd5-Expression der metaplastischen PC bei MC kann im Vergleich zu orthotopen PC als dezent erhöht nachgewiesen werden (FC+ 3,74,  $p < 0,01$ ). Auch metaplastische PC bei CU weisen im Vergleich zu orthotopen PC eine signifikant erhöhte Fzd5-Expression auf (FC +7,76,  $p < 0,01$ ). Es kann kein signifikanter Unterschied in der Fzd5-Expression von metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU gezeigt werden (FC -1,99,  $p < 0,01$ ).

Die Expression von Dvl3 ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (FC +100,  $p < 0,01$ ). Zwischen metaplastischen PC bei MC und orthotopen PC wird hinsichtlich der Dvl3-Expression kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen (FC -1,38,  $p > 0,05$ ). Metaplastische PC bei CU weisen im Vergleich zu orthotopen PC eine stark erniedrigte Dvl3-Expression auf (FC -100,  $p < 0,01$ ). Im Vergleich zwischen metaplas-

tischen PC bei MC und metaplastischen PC bei CU ist Dvl3 deutlich überexprimiert (FC +100,  $p < 0,01$ ).

Orthotope PC zeigen eine erniedrigte Expression von WIF1 im Vergleich zur Kontroll-RNA des humanen Colon asc. (FC -15,83,  $p < 0,01$ ). Hinsichtlich der WIF1-Expression metaplastischer PC bei MC besteht im Vergleich zu orthotopen PC kein Unterschied (FC +1,98,  $p < 0,01$ ). Metaplastische PC bei CU weisen im Vergleich zu orthotopen PC eine erniedrigte WIF1-Expression auf (FC -44,84,  $p < 0,01$ ). Im Vergleich zwischen metaplastischen PC bei MC und metaplastischen PC bei CU ist WIF1 deutlich überexprimiert (FC +100,  $p < 0,01$ ).

Die SFRP2-Expression ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (FC +100,  $p < 0,01$ ). Weiterhin weist die SFRP2-Expression der metaplastischen PC bei MC und CU keine signifikanten Unterschiede zu den orthotopen PC auf ( $p > 0,05$ ). Darüber hinaus zeigt sich auch kein signifikanter Unterschied in der SFRP2-Expression von metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU ( $p > 0,05$ ).

Zusammenfassend kann in der Expressionsanalyse der Wnt-Gene gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin von den orthotopen PC vermehrt exprimiert wird.

TCF4 wird von den metaplastischen PC bei MC stärker exprimiert als von den orthotopen PC oder metaplastischen PC bei CU. Weiterhin zeigt die Analyse, dass die TCF1-Expression in metaplastischen PC bei MC deutlich herunter reguliert scheint im Vergleich zu orthotopen PC und CU.



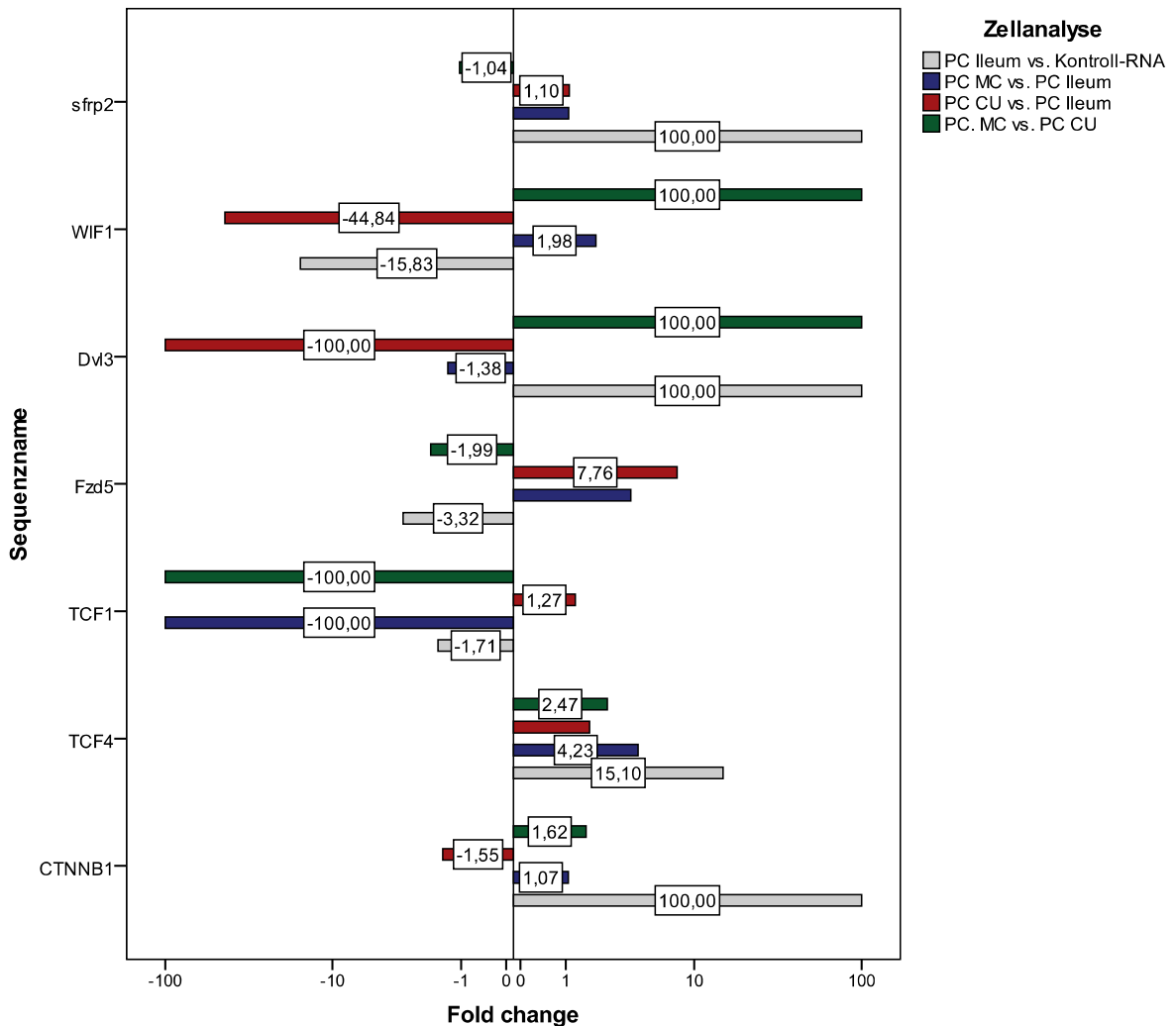


Abbildung 15: Darstellung der Expression intrazellulärer Gene des Wnt-Signalweges

### 3.5.3 Expression von CED-Genen

Die Expressionen der CED-Gene CARD 15 (auch bekannt als NOD2), Atg16L1 und PTPN22 zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpools. Die Expression von IL23R ist sowohl in den orthotopen PC als auch in den metaplastischen PC bei MC und CU im Vergleich zur Kontroll-RNA signifikant erniedrigt ( $FC_{PC\ Ileum} = 9,65$ ;  $FC_{MC} = -9,27$ ;  $FC_{CU} = -8,21$ ;  $p < 0,01$ ).

Die IBD-assoziierten Gene IRGM, IBD5 und TRIF wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nicht untersucht.

### 3.5.4 Genexpression von NALP-Proteinen

Die Expression von NALP1 ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt (FC -100,  $p < 0,01$ ). Die NALP1- Expression in metaplastischen PC bei MC ist signifikant erhöht im Vergleich zu orthotopen PC (FC +100,  $p < 0,01$ ). Metaplastische PC bei CU weisen im Vergleich zu orthotopen PC eine signifikante Überexpression von NALP1 auf (FC +100,  $p < 0,01$ ). Im Vergleich zwischen metaplastischen PC bei MC und metaplastischen PC bei CU scheint NALP1 vermindert exprimiert (FC -4,35,  $p < 0,01$ ).

Hinsichtlich der NALP2-Expression zeigt sich in orthotopen PC kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Zellen des Colon asc. Mukosa (FC -1,86,  $p < 0,01$ ).

Die NALP2-Expression in metaplastischen PC bei MC und CU zeigt im Vergleich zu orthotopen PC keine signifikanten Unterschiede (FC<sub>MC</sub> +2,00,  $p < 0,01$ , FC<sub>CU</sub> +1,40  $p > 0,05$ ). Zwischen metaplastischen PC bei MC und CU kann bezüglich der NALP2-Expression kein Unterschied ermittelt werden (FC +1,53,  $p < 0,01$ ).

Die Expression von NALP5 ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt (FC -6,95,  $p < 0,01$ ). Die NALP5- Expression in metaplastischen PC bei MC ist im Vergleich zu orthotopen PC dezent erniedrigt. (FC -2,31,  $p < 0,01$ ). Metaplastische PC bei CU weisen im Vergleich zu orthotopen PC keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der NALP5- Expression auf ( $p > 0,05$ ). Im Vergleich zwischen metaplastischen PC bei MC und metaplastischen PC bei CU zeigte sich ebenfalls kein Unterschied der NALP5- Expression. ( $p < 0,01$ ).

Die Expression von NALP6 ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt (FC -11,69,  $p < 0,01$ ). Weiterhin weist die NALP6-Expression der metaplastischen PC bei MC und CU eine dezent erhöhte Expression verglichen mit orthotopen PC auf (FC<sub>MC</sub> +2,48, FC<sub>CU</sub> +2,19,  $p < 0,01$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der NALP6-Expression von metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU ( $p > 0,05$ ).

NALP7 wird von orthotopen PC im Vergleich zu Zellen des humanen Colon asc. deutlich niedriger exprimiert (FC -89,04,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC zeigen im Vergleich zu den orthotopen PC eine erhöhte Expression von NALP7 (FC +31,35,  $p < 0,01$ ). Eine Überexpression von NALP7 zeigen auch die metaplastischen PC bei CU im Ver-

gleich zu orthotopen PC (FC +43,59,  $p < 0,01$ ). Die NALP7-Expression der metaplastischen PC bei MC unterscheidet sich nicht von der metaplastischer PC bei CU ( $p < 0,01$ ).

Die Expression von NALP8 ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt (FC -12,69,  $p < 0,01$ ). Die NALP8-Expression der metaplastischen PC bei MC zeigt keinen signifikanten Unterschied zu derer in orthotopen PC ( $p > 0,05$ ). Es zeigt sich kein eine leicht verminderte NALP8-Expression in metaplastischen PC bei CU im Vergleich zu orthotopen PC (FC -2,85,  $p < 0,01$ ). Im Vergleich von metaplastischen PC bei MC und CU zeigt sich eine erhöhte NALP8- Expression bei MC (FC +8,72,  $p < 0,01$ ).

Zwischen orthotopen PC und Kontroll- RNA besteht hinsichtlich der NALP11-Expression kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ). NALP11 wird von metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu orthotopen PC niedriger exprimiert (FC -22,27,  $p < 0,01$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen metaplastischen PC bei CU und orthotopen PC in der NALP11-Expression besteht nicht ( $p > 0,05$ ). Weiterhin besteht eine verminderte NALP11-Expression in metaplastischen PC bei MC verglichen mit metaplastischen PC bei CU (FC -24,87,  $p < 0,01$ ).

NALP12 wird von orthotopen PC im Vergleich zu Zellen des humanen Colon asc. vermindert exprimiert (FC -15,48,  $p < 0,01$ ). Die metaplastischen PC bei MC zeigen im Vergleich zu den orthotopen PC eine leicht erhöhte Expression von NALP12 (FC +2,70,  $p < 0,01$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen metaplastischen PC bei CU und orthotopen PC in der NALP12- Expression besteht nicht ( $p > 0,05$ ). Eine leichte Überexpression von NALP12 zeigen die metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU (FC +2,60,  $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend zeigt die Genexpressionanalyse der NALP-Proteine eine signifikant verminderte Expression von NALP 1, 5, 6, 7, 8, 12 in orthotopen PC verglichen mit den Zellen des humanen Colon asc. Weiterhin besteht eine deutliche Überexpression von NALP1 und NALP7 in metaplastischen PC bei MC und CU verglichen mit orthotopen PC. NALP11 wird von metaplastischen PC bei MC signifikant vermindert exprimiert im Vergleich zu orthotopen PC und metaplastischen PC bei CU. Die Expression von NALP2, 5, 6, 12 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den metaplastischen PC und den orthotopen PC.

Die Genexpressionen von NALP 3, 4, 9, 10, 13 und 14 zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpools und werden daher nicht im Detail aufgeführt.

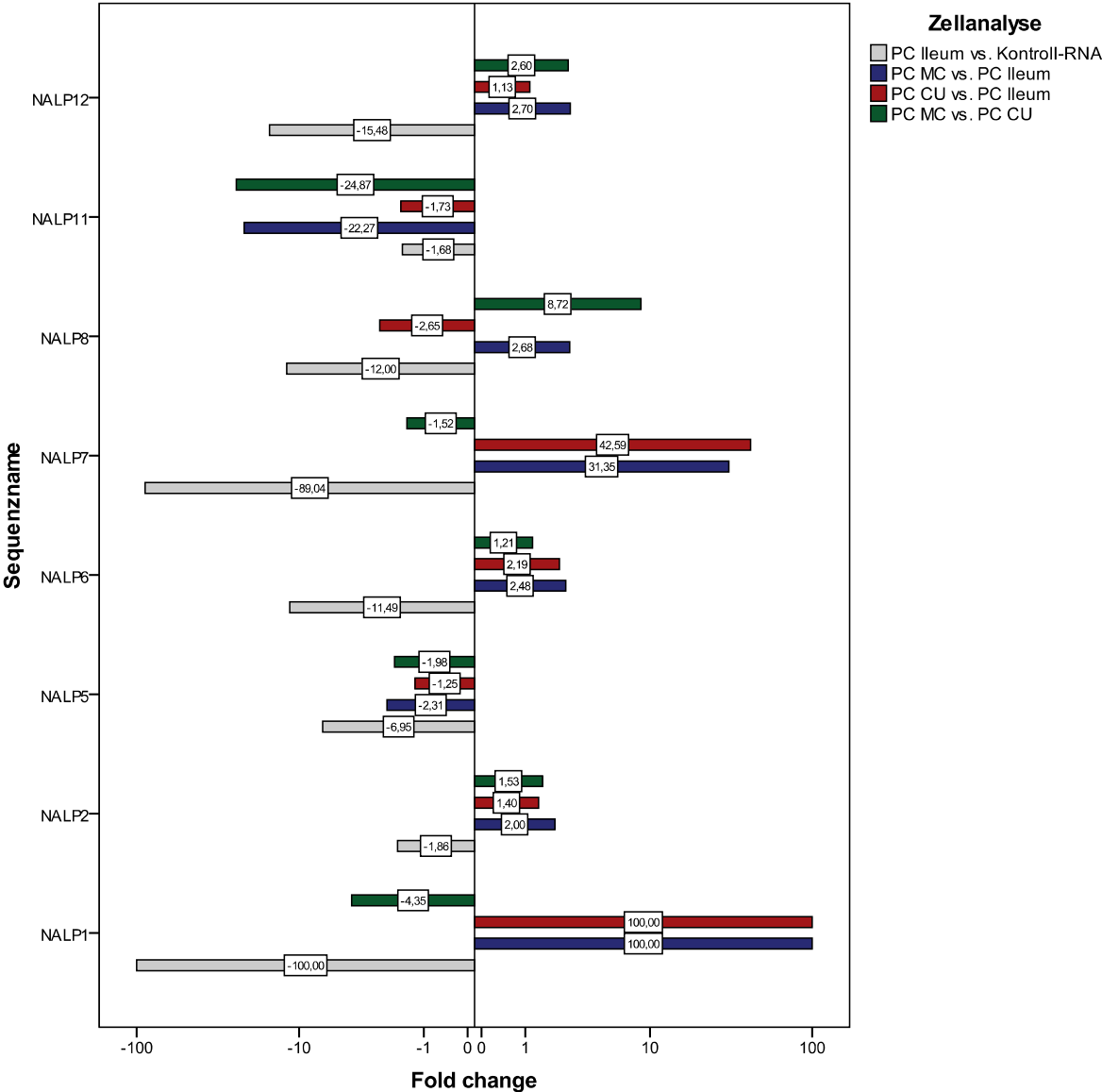


Abbildung 16: Darstellung der Expression der NALP-Gene

Die Daten der Expressionsanalyse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene sind im Anhang in tabellarischer Form hinterlegt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Immunhistochemie

Panethzellen gehören wegen der Produktion und Sekretion einer Vielzahl antimikrobieller Peptide, vor allem HDEFA5 und HDEFA6, zum adaptiven Immunsystem des menschlichen Organismus. Das Auftreten von Panethzellen außerhalb des Dünndarms wird als Panethzellmetaplasie bezeichnet und wird bei entzündlichen Entitäten des Kolons, wie CED, aber auch Divertikulitis<sup>3</sup> und Strahlenkolitis<sup>56</sup> beobachtet. Die bereits von Cunliffe 2001 beschriebenen metaplastischen Panethzellen bei CED zeigten keine Morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den Panethzellen des Dünndarms<sup>26</sup>.

Die immunhistochemische Darstellung des HDEFA6 in den Panethzellen im Kolonepithel zeigt ein klares Ergebnis. Eine Anreicherung des HDEFA6-Proteins in Panethzellen tritt bei 66,67% der Proben mit M. Crohn und 64,1% der Proben mit Colitis Ulcerosa auf. Im untersuchten Gewebe des C. ascendens von Patienten ohne CED lassen sich keine Panethzellen nachweisen. Die HDEFA6-positiven Panethzellen zeigen keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den Panethzellen des Dünndarms. Anhand der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung kann die Aussage getroffen werden, dass bei dem mehrheitlichen Teil der Patienten mit CED metaplastische Panethzellen im C. ascendens auftreten. Es ist jedoch anzumerken, dass es Unterschiede hinsichtlich des zahlenmäßigen Vorkommens gibt. Der mehrheitliche, als Panethzell-positiv-getestete Teil der Proben zeigt nur ein geringes Vorkommen.

Das Ergebnis des immunhistochemischen HDEFA6-Nachweises bei CED unterstreicht die in verschiedenen Untersuchungen bereits nachgewiesene Panethzellmetaplasie bei entzündlichen Entitäten des Colons.

Aufgrund eines bisher nicht geklärten Stimulus, der möglicherweise durch proinflammatorische Mediatoren erzeugt wird, erfolgt die Differenzierung der Intermediärzellen zu Panethzellen.

Wie vorangegangen beschrieben kann eine Panethzellmetaplasie in der Kolonschleimhaut beim kolorektalen Karzinom auftreten. Das in dieser Arbeit durchgeführte immunhistochemische Screening des Kontrollgewebes, welches von Patienten mit kolorektalem Karzinom stammt, zeigten keine metaplastischen Panethzellen in diesen Proben. Es wurde jedoch bewusst nur Gewebe mit einem > 10cm messenden Abstand zum Tumor gewählt.

## 4.2 Microarray

### 4.2.1 Antimikrobielle Peptide

**Defensine** sind Peptide mit hoher antimikrobieller Aktivität, die für eine adäquate Elimination Darm schädigender Mikroorganismen sorgen, so dass der Kontakt von eingedrungenen Mikroben mit der Darmmukosa unterbleibt, folglich wird auch die Entzündungsreaktion verhindert<sup>72</sup>.

Die Genexpression der panethzellspezifischen antimikrobiellen Proteine **HDEFA5 und HDEFA6** zeigte in den verschiedenen Gruppen interessante Ergebnisse. Die orthotopen PC zeigten im Vergleich zur Kontrolle (gemittelte RNA des humanen *C. ascendens*) eine signifikant verminderte HDEFA5- und HDEFA6-Expression (FC -100). Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses besteht darin, dass die Genexpressionsanalyse mittels Microarray, die Genaktivität eines Genes detektiert. Ist das Gen jedoch im inaktivierten Zustand wird es in der Analyse nicht mit erfasst. So scheint im nicht entzündeten Zustand die Defensinproduktion der Panethzellen auf ein grundlegendes Level reduziert zu sein. Es ist anzunehmen, dass sich die nicht aktivierten PC in einer Art „Ruhezustand“ befinden und die intrazelluläre Signalkaskade erst auf einen bakteriellen Stimulus hin, über spezielle Rezeptoren TLR und NOD, aktiviert wird. HDEFA5 und HDEFA6 gelten als panethzellspezifische Marker, jedoch erfolgt ihre Expression, vergleichsweise geringer, auch durch andere intestinale Epithelzellen, was die Defensinexpression im *C. ascendens* erklärt<sup>26, 73</sup>.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression der humanen  $\alpha$ -Defensine HDEFA5 und HDEFA6 in metaplastischen PC bei MC und CU. Ein interessantes Ergebnis stellt die Überexpression beider  $\alpha$ -Defensine bei MC dar. Die Arbeitsgruppe von Wehkamp et al. konnte eine deutlich verminderte  $\alpha$ -Defensin-Expression im terminalen Ileum bei MC zeigen. Weiterhin stellte sich heraus, dass der  $\alpha$ -Defensin-Verlust unabhängig vom Grad der Entzündung war und bei MC des Colons, CU oder Pouchitis nicht beobachtet wurde<sup>74, 75, 76</sup>. Jedoch konnte in verschiedenen Arbeiten am Mausmodell ein Zusammenhang zwischen NOD2-Mutation, M. Crohn des Ileums und den verminderten  $\alpha$ -Defensinen der Panethzellen gezeigt werden<sup>74, 64, 77</sup>. In der vorliegenden Arbeit ist die Defensinexpression in metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn mit Kolonbefall deutlich erhöht was auch in den vorhin genannten Arbeiten nachgewiesen wurde. Somit besteht die Vermutung, dass der entzündliche Befall des Colons mit dem Auftreten metaplastischer Panethzellen assoziiert ist, was wiederum mit einer erhöhten Defensinexpression verbunden ist.

Es muss jedoch bei der Betrachtung dieses Ergebnisses folgendes berücksichtigt werden: Neben den differenzierten Panethzellen befinden sich in direkter Nachbarschaft so genannte Intermediärzellen. Diese treten selten in normaler intestinaler Mukosa auf, es konnte jedoch kürzlich in Untersuchungen gezeigt werden, dass Intermediärzellen ebenfalls  $\alpha$ -Defensine exprimieren<sup>29</sup>. Die Methodik der Mikrodissektion zur Gewinnung des Zellmaterials ist präzise, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch benachbarte Zellen, z. B. Intermediärzellen, im Zellkollektiv befinden.

Ferner soll berücksichtigt werden, dass HDEFA6 als Protein-Selektionsmarker in den immunhistologischen Voruntersuchungen verwendet wurde, um die metaplastischen Panethzellen zu detektieren. Das Ergebnis des Microarrays zeigt eine deutlich niedrigere HDEFA6-Expression in orthotopen PC.

Weiterhin ergab sich ein beachtenswertes Ergebnis bezüglich der deutlichen Überexpression von HDEFA5 und HDEFA6 in metaplastischen Panethzellen bei CU im Vergleich zu orthotopen PC (FC +100) und zu metaplastischen PC bei MC (FC +100). Dieses Resultat führt zu der Annahme, dass bei Colitis ulcerosa eine unphysiologisch hohe Defensinproduktion besteht, die wiederum durch Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren die Entzündungsreaktion bedingt<sup>78</sup>.

Jedoch sollte bei Betrachtung und Interpretation der mittels Microarray ermittelten Ergebnisse der  $\alpha$ -Defensinexpression berücksichtigt werden, dass sich die gemessenen Signalintensitäten auf die m-RNA-Level der Defensine beziehen. Defensine werden posttranslational reguliert. In humanen PC werden HDEFA5 und 6 als Pro-HDEFA5 und -6 gespeichert und nach der Sekretion durch Trypsin am N-terminalen Ende in die biologisch aktive Form gespalten<sup>79</sup>.

Demzufolge muss es trotz hoher mRNA-Expression nicht zwangsläufig zur Translation oder translationalen Prozession kommen. Durch die Kenntnis der mRNA-Level kann demnach nur eine indirekte Aussage über die Expression biologisch aktiver  $\alpha$ -Defensine getroffen werden.

**PLA2 und SLPI** sind Enzyme, die als panethzellspezifisch gelten und sowohl durch antimikrobielle als auch antiinflammatorische Eigenschaften gekennzeichnet sind. Die Expression von PLA2 und SLPI zeigte in der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchung eine signifikante Überexpression beider Enzyme in orthotopen PC (FC +100) im

Vergleich zu Kontrolle. Damit kann die Annahme unterstützt werden, dass es sich um panethzellspezifische Produkte handelt. Weiterhin unterstreicht das Ergebnis die bedeutende Rolle der orthotopen Panethzellen in der intestinalen angeborenen Immunabwehr. Die PLA2-Expression zeigte in den metaplastischen PC bei MC und CU eine signifikante Erniedrigung verglichen mit orthotopen PC. Hinsichtlich der SLPI-Expression zeigte sich eine signifikant verminderte Expression nur in den metaplastischen PC bei MC. Anhand dieser Ergebnisse kann diskutiert werden, dass die sekretorische Funktion der metaplastischen Panethzellen an das Vorhandensein von Mediatoren gekoppelt ist, welche im entzündlichen Kolonepithel unzureichend vorhanden sind.

#### **4.2.2 WNT-Signalweg**

Die Differenzierung des intestinalen Epitheliums wird über verschiedene Signalwege reguliert. Als der wohl am besten untersuchte und in seiner Rolle dominierende wird der Wnt-Signalweg beschrieben. Wnt-vermittelt erfolgt sowohl die Aufrechterhaltung des Pools der undifferenzierten Progenitor/Vorläuferzellen, als auch die Differenzierung der Panethzellen und deren Reifung und korrekte Ausrichtung entlang der Krypten-Villus-Achse<sup>80</sup>. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs erfolgt nach Bindung extrazellulärer Wnt-Proteine an Frizzled-Rezeptoren, die wiederum zur Aktivierung von Dvl führt, woraufhin die APC-Protein-Komplex-vermittelte Degradation von  $\beta$ -Catenin entfällt. Das ungebundene  $\beta$ -Catenin häuft sich im Zytoplasma an und wandert in den Nukleus, wo es an TCF4 bindet und die Transkription von Targetgenen initiiert.

Gegenwärtig sind 20 humane Wnt-Gene<sup>81</sup> bekannt, von denen 19 in der durchgeführten Genexpressionsanalyse untersucht wurden. Bei insgesamt 11 Wnt-Genen (Wnt1, Wnt3, Wnt3A, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11) zeigen sich Expressionsunterschiede in den jeweiligen Proben. Ausgenommen Wnt10B, wurde eine signifikant verminderte Expression in orthotopen PC im Vergleich zur Kolon-RNA detektiert. Im nichtentzündlichen Zustand scheint die Expression von Wnt-Proteinen in den Panethzellen herunter reguliert. Da Wnt-Proteine nicht paneth-zellspezifisch exprimiert werden, besteht Grund zur Annahme, dass im nicht entzündeten Zustand die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch die intestinalen Epithelzellen gleichermaßen im Sinne der Homöostase reguliert wird.



Die **Wnt-Proteine WNT3, WNT3A, WNT6, WNT7B, WNT8** zeigen eine Überexpression in metaplastischen PC bei MC und CU im Vergleich zu orthotopen PC. Somit liegt die Vermutung nahe, dass metaplastische PC auf einen noch unbekanntem Stimulus hin durch erhöhte Expression von Wnt-Genen die Aktivierung des Wnt-Signalweges bewirken. Die gesteigerte Aktivität des Wnt-Signalweges könnte wiederum Einfluss auf die Differenzierung von intestinalen Stammzellen im Kolon haben. Das Auftreten metaplastischer Panethzellen kann also die Folge der gesteigerten Wnt-Aktivierung sein.

Wodarz und Nusse beschrieben das neoplastische Potenzial der Wnt-Gene<sup>23, 82</sup>. Eine Studie von Lee et al. ergab, dass eine verstärkte Aktivierung von WNT1, WNT3 und WNT10B die Tumorbildung in der Brustdrüse von Mäusen fördert<sup>83</sup>. Eine von Gregorieff et al. durchgeführte Genexpressionsanalyse ergab eine Überexpression von Wnt3, Wnt6, Wnt9B in den Kryptenepithelzellen. Weiterhin zeigten auch Wnt2B, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B eine erhöhte Expression im intestinalen Epithelium<sup>28</sup>.

Bezüglich der  **$\beta$ -Catenin**-Expression zeigen orthotope PC eine signifikante Überexpression (FC +100) im Vergleich zur Kontroll-RNA des humanen Colon asc. Da im inaktiven Zustand des Wnt-Signalweges  $\beta$ -Catenin im APC-Komplex gebunden ist und nachfolgend der Degradierung im Proteasom zugeführt wird, kann angenommen werden, dass die gemessene Genexpression die mRNA des freien  $\beta$ -Catenins angibt. Dieses Ergebnis bestätigt die Wnt-vermittelte Differenzierung der Panethzellen im Vergleich zum Kolonepithel. Interessanterweise zeigt die  $\beta$ -Catenin-Expression in metaplastischen PC bei MC und CU keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den orthotopen PC. Es zeigt sich auch kein signifikanter Unterschied in der  $\beta$ -Catenin-Expression von metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu metaplastischen PC bei CU. Die Expression von **TCF4** ist in orthotopen PC im Vergleich zur Kontroll-RNA signifikant erhöht. Weiterhin weisen die metaplastischen PC bei MC sowohl im Vergleich zu orthotopen PC als auch zu metaplastischen PC bei CU eine verstärkte Expression auf. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in metaplastischen PC bei MC eine verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalweges mit nachfolgender TCF4-vermittelter Transkription von Zielgenen abläuft. Bei CU kann eine derartige Überexpression nicht nachgewiesen werden.

**TCF1** wird anhand genetischer Hinweise als Antagonist von TCF4 vermutet<sup>84</sup>. Interessanterweise ist die TCF1-Expression in metaplastischen PC bei MC im Vergleich zu orthot-

open PC und metaplastischen PC bei CU deutlich erniedrigt (FC -100). Die metaplastischen PC bei CU weisen hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede auf.

Möglicherweise kann durch dieses Ergebnis, der TCF4-Überexpression und TCF1-Minderexpression bei MC, der vermutete Antagonismus beider Transkriptionsfaktoren bestätigt werden. Weiterhin kann die verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs in metaplastischen PC bei MC angenommen werden.

Die Expression des wichtigsten Rezeptors des Wnt-Signalwegs, **Fzd5**, ist in den metaplastischen PC sowohl bei MC als auch bei CU im Vergleich zu orthotopen PC erhöht. Das hochregulierte Rezeptorgen kann zu der Annahme führen, dass der inflammatorische Zustand eine verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs, was wiederum eine direkte Auswirkung auf den Differenzierungsgrad der PC hat.

**WIF1** und **SFRP** (secreted Frizzled-related protein) sind Wnt-Antagonisten und interferieren durch direkte Bindung der Wnt- Liganden <sup>85</sup>.

Die WIF1-Expression ist in orthotopen PC und metaplastischen PC bei CU deutlich herunter reguliert. Während die WIF1-Expression in metaplastischen PC bei MC im Vergleich zur CU deutlich erhöht scheint. Bezüglich der metaplastischen PC bei CU kann dies als Folge der verminderten Aktivierung des Wnt-Signalweges verstanden werden. Im Gegenteil dazu kann die Überexpression bei MC als Regulation der verstärkten Wnt-Aktivierung verstanden werden.

Die SFRP2-Expression ist in den orthotopen PC im Vergleich zur Kontroll-RNA deutlich erhöht. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der SFRP2-Expression in metaplastischen PC bei MC und CU keine signifikanten Unterschiede. Somit kann auch durch dieses Ergebnis eine regulatorische Funktion in Wnt-aktiven Panethzellen angenommen werden.

### 4.2.3 NALP-Proteine

NALP-Proteine umfassen zytoplasmatische Proteine, die aufgrund ihrer Funktion in den Fokus von Untersuchungen zur Pathogenese der CED gerieten.

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Genexpressionsanalyse eine signifikante Überexpression von NALP1 in metaplastischen PC bei MC und CU (FC +100,  $p < 0,01$ ) im Ver-

gleich zu orthotopen PC des terminalen Ileums im nicht entzündlichen Zustand gezeigt werden. Die Untersuchungen ergaben weiterhin einen geringen Unterschied der NALP1-Expression zwischen metaplastischen PC bei MC und CU, wobei die Expression bei MC geringfügig erniedrigt ist. Die Aktivierung von NALP1 bewirkt die Formation eines Komplexes, der als Inflammasom bezeichnet wird. Inflammasome werden durch verschiedene endogene und mikrobielle Stimuli aktiviert und vermitteln daraufhin die Reifung proinflammatorischer Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33, durch Kontrolle der Aktivierung der inflammatorischen Caspase-1 und -5<sup>67</sup>. Die Überexpression von NALP1 in metaplastischen PC als Aktivator von proinflammatorischen Zytokinen unterstützt die Annahme der bedeutenden regulatorischen Fähigkeit der Panethzellen innerhalb der adaptiven Immunabwehr. Eine Beteiligung der NALP-Proteine an der Pathogenese von CED scheint aufgrund der Ergebnisse sehr wahrscheinlich.

### **4.3 Fehlerbetrachtung**

Die Isolierung von RNA aus formalinfixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Gewebeproben zur Durchführung von Expressionsanalysen stellt derzeit durch die Entwicklung entsprechender Kits eine etablierte Methode dar. Dennoch kann auch bei exakter Handhabung sowohl die Lagerung der FFPE-Proben sowie die mittels Mikrodissektion präparierten Zellen einen deutlichen Einfluss auf die RNA-Qualität und -Quantität sowie auf die folgende quantitative Analytik bedeuten<sup>86</sup>.

Aufgrund dieser Kenntnis erfolgte in der vorliegenden Arbeit die sorgfältige Präparation und Umgang mit den Proben unter streng RNase-freien Kautelen. Weiterhin wurden RNA-Qualität und -Quantität der verwendeten Proben vor Beginn des Microarray gemessen und als geeignet für die weiteren Arbeitsschritte befunden. Dennoch ist nicht sicher auszuschließen, dass Verunreinigungen stattgefunden haben und somit Einfluss auf die RNA-Qualität ausübten.

Die als Kontrollkollektiv verwendeten Gewebe, sowohl das Kolongewebe in den immunhistochemischen Voruntersuchungen, als auch das Ileumgewebe, woraus die orthotopen Panethzellen disseziert wurden, entstammen Patienten mit einer Tumorerkrankung des Kolons (C. ascendens, C. transversum oder C. descendens). Da es nicht möglich ist von gesunden Menschen Darmresektate zu erhalten, war die Wahl der Tumorkontrollgruppe unumgänglich.

Durch Microarrays kann die gleichzeitige Untersuchung der Expression zahlreicher Genabschnitte erfolgen<sup>71</sup>. Mit der Generierung vieler Ergebnisse steigt allerdings gleichzeitig das Risiko vieler falschpositiver Resultate. Außerdem handelt es sich bei Messung der mRNA nur um einen Surrogatparameter für die Aktivität eines Gens. Ferner ist aufgrund der verwendeten Technik eine hohe Fehleranfälligkeit gegeben, was bei der Auswertung adäquat berücksichtigt werden muss. Es gibt bisher noch keine einheitlichen Standards anhand derer die Ergebnisse von Microarray-Studien beurteilt werden. Zur Überprüfung der biologischen Aktivität eines Proteins wären weiterführende Untersuchungen erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

Panethzellen sind Zylinderepithelzellen, die sich durch die charakteristische Lage (orthotop) in der Tiefe der Lieberkühnkrypten des Dünndarms, insbesondere des terminalen Ileums und die Produktion und Sekretion antimikrobieller Peptide (HDEFA5 und HDEFA6, PLA2, SLPI u.a.) auszeichnen. Aufgrund der Zellprodukte wird den Panethzellen eine wichtige Rolle in der intestinalen Immunabwehr zugeschrieben. Bereits in früheren Arbeiten wurde das Auftreten von Panethzellen außerhalb des Dünndarms (metaplastisch), insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, beschrieben. Außerdem zeigten Untersuchungen an orthotopen Panethzellen eine veränderte Expression der antimikrobiellen Peptide bei CED. Ausgehend von diesen bereits bekannten Untersuchungen erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die immunhistologische Detektion metaplastischer Panethzellen im Colon ascendens bei M. Crohn und Colitis ulcerosa aus Paraffin-eingebetteten Gewebeproben. Nach Separierung der metaplastischen PC durch die lasergestützte Mikrodissektion und Bildung der Untersuchungsgruppen (MC, CU, PC Ileum, Kontrolle) erfolgte die Genexpressionsanalyse dieser Zellen. Die immunhistologischen Untersuchungen mit dem Selektionsmarker HDEFA6 zeigten bei 66,7% der Patienten mit M. Crohn, bei 64,1% der Patienten mit Colitis ulcerosa und bei 0% der Kontrollgruppe metaplastische Panethzellen im Colon ascendens. Die detektierten metaplastischen Panethzellen wiesen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den orthotopen Panethzellen des Dünndarms auf. Die Expressionsanalyse panethzellspezifischer Gene ergab eine signifikant erniedrigte Expression von HDEFA5 und HDEFA6 in orthotopen Panethzellen, sowie eine signifikante Überexpression von HDEFA5 und 6 bei Colitis ulcerosa und M. Crohn. Unterschiede zeigten sich auch zwischen den metaplastischen Panethzellen, die HDEFA5 und HDEFA6-Expression ist bei M. Crohn im Vergleich zu metaplastischen Panethzellen bei Colitis ulcerosa signifikant erniedrigt. Die panethzellspezifischen Marker PLA2 und SLPI zeigten eine signifikante Überexpression in orthotopen Panethzellen, waren jedoch in den metaplastischen Panethzellen herunter reguliert.

Die Expressionsanalyse extrazellulärer Wnt-Gene ergab bis auf Ausnahme des WNT10B eine signifikant verminderte Expression in orthotopen Panethzellen. Die Wnt-Proteine WNT3, WNT3A, WNT6, WNT7B, WNT8 zeigen eine Überexpression in metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zu orthotopen Panethzellen.

WNT1, WNT9B und WNT10B scheinen signifikant vermindert exprimiert bei Colitis ulcerosa. Die Expressionsanalyse der intrazellulären Wnt-Gene ergab eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin in den orthotopen Panethzellen. Es zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede von  $\beta$ -Catenin zwischen den metaplastischen Panethzellen. TCF4 zeigte sich sowohl in den orthotopen Panethzellen als auch in den metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn mit signifikant erhöhter Expression, während die TCF1-Expression in metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn deutlich herunter reguliert war. Das Frizzled5-Gen zeigte eine signifikante Überexpression in den metaplastischen Panethzellen. Der Wnt-Antagonist WIF1 zeigte eine signifikant verminderte Expression in orthotopen Panethzellen und metaplastischen Panethzellen bei Colitis ulcerosa und eine signifikante Überexpression in metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn. Die SFRP2-Expression, ebenfalls ein Wnt-Antagonist, zeigte eine Überexpression in orthotopen Panethzellen und keine signifikanten Unterschiede in den metaplastischen Panethzellen.

Die Genexpressionanalyse der NALP-Proteine zeigte eine signifikant verminderte Expression von NALP 1, 5, 6, 7, 8, 12 in orthotopen Panethzellen. Weiterhin bestand eine deutliche Überexpression von NALP1 und NALP7 in metaplastischen Panethzellen bei CED. NALP11 wurde von metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn signifikant vermindert exprimiert. Die Expression von NALP2, 5, 6, 12 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den metaplastischen Panethzellen und den orthotopen Panethzellen. Die Genexpressionsanalyse von NALP 3, 4, 9, 10, 13 und 14 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpools.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die antimikrobielle Funktion der Panethzellen, in normalem sowie in entzündetem Gewebe und weisen gleichermaßen auf einen inaktivierten Zustand der orthotopen Panethzellen hin. Die Ergebnisse des Wnt-Signalweges unterstreichen die regulatorische Funktion der Panethzellen für die Aktivierung im inflammatorischen Zustand, was sich direkt auf den Differenzierungsgrad der Panethzellen auswirkt. Weiterhin scheint aufgrund der Ergebnisse eine Beteiligung der NALP-Proteine an der Pathogenese von CED wahrscheinlich. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bestimmte Gene in den metaplastischen Panethzellen bei M. Crohn und Colitis ulcerosa unterschiedlich reguliert sind. Das unterstützt die Vorstellung einer multifaktoriellen Genese dieser Erkrankungen. Zusammengefasst können die Ergebnisse dieser Arbeit als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Paneth J. Ueber die secernierenden Zellen des Duenndarmepithels. Archiv mikroskop Anatomie 1888;31:113-191.
2. Schwalbe G. Beitrage zur Kenntnis der Druesen in den Darmwandungen, in's Besondere der Brunnerschen Druesen. Archiv mikroskop Anatomie 1872;8:92-140.
3. Sandow MJ, Whitehead R. The Paneth cell. Gut 1979;20(5):420-431.
4. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. Cell Mol Life Sci 2002;59(1):156-170.
5. Clark G. Displacement. Stain Technol 1979;54(3):111-119.
6. Lendrum AC. The phloxine- tartrazine method as a general histological stain and for the demonstration of inclusion bodies. J Pathol Bacteriol 1947;59:399-404.
7. Evans GS, Chwalinski S, Owen G, et al. Expression of pokeweed lectin binding in murine intestinal Paneth cells. Epithelial Cell Biol 1994;3(1):7-15.
8. Fano RA, Moretti F. Fluorescent demonstration of the Paneth cell granules. Appl Pathol 1983;1(1):31-33.
9. Bevins CL. Paneth cells, defensins, and IBD. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008;46 Suppl 1:E14-15.
10. Helmrath MA, Fong JJ, Dekaney CM, Henning SJ. Rapid expansion of intestinal secretory lineages following a massive small bowel resection in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;292(1):G215-222.
11. Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. Science 2001;294(5549):2155-2158.
12. Nye JS, Kopan R. Developmental signaling. Vertebrate ligands for Notch. Curr Biol 1995;5(9):966-969.
13. Bry L, Falk P, Huttner K, et al. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91(22):10335-10339.
14. Mallow EB, Harris A, Salzman N, et al. Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. J Biol Chem 1996;271(8):4038-4045.
15. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. Science 2005;307(5717):1904-1909.

16. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382(6592):638-642.
17. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280(5363):596-599.
18. Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, et al. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 2001;412(6842):86-90.
19. Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A, et al. Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev Cell* 2003;4(3):407-418.
20. Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998;19(4):379-383.
21. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 1997;275(5307):1784-1787.
22. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275(5307):1787-1790.
23. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005;15(1):28-32.
24. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5449-5453.
25. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr Opin Hematol* 1997;4(1):53-58.
26. Cunliffe RN, Rose FR, Keyte J, et al. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48(2):176-185.
27. Nevalainen TJ, Gronroos JM, Kallajoki M. Expression of group II phospholipase A2 in the human gastrointestinal tract. *Lab Invest* 1995;72(2):201-208.
28. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005;129(2):626-638.
29. Cunliffe RN, Mahida YR. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* 2004;75(1):49-58.
30. Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7(1):43-50.



31. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 1989;84(2):553-561.
32. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 1992;267(32):23216-23225.
33. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 2005;54(12):1802-1809.
34. Klockars M, Reitamo S. Tissue distribution of lysozyme in man. *J Histochem Cytochem* 1975;23(12):932-940.
35. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2. *J Biochem* 2002;131(3):285-292.
36. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, et al. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res* 2006;7:29.
37. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, et al. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000;1(2):113-118.
38. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272(5258):50-53.
39. Fernie-King B, Seilly DJ, Davies A, Lachmann PJ. Subversion of the innate immune response by micro-organisms. *Ann Rheum Dis* 2002;61 Suppl 2:ii8-12.
40. Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 2004;41(11):1099-1108.
41. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(1):1-14.
42. Rumio C, Besusso D, Palazzo M, et al. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* 2004;165(2):373-381.
43. Tanabe H, Ayabe T, Bainbridge B, et al. Mouse paneth cell secretory responses to cell surface glycolipids of virulent and attenuated pathogenic bacteria. *Infect Immun* 2005;73(4):2312-2320.
44. Lala S, Ogura Y, Osborne C, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125(1):47-57.
45. Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003;52(11):1591-1597.
46. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124(4):1001-1009.

47. Berrebi D, Languetin J, Ferkdadji L, et al. Cytokines, chemokine receptors, and homing molecule distribution in the rectum and stomach of pediatric patients with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37(3):300-308.
48. Chamailard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003;5(9):581-592.
49. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, et al. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124(4):993-1000.
50. Lee KR, Trainer TD. Adenocarcinoma of the uterine cervix of small intestinal type containing numerous Paneth cells. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114(7):731-733.
51. Mills SE, Fechner RE, Cantrell RW. Aggressive sinonasal lesion resembling normal intestinal mucosa. *Am J Surg Pathol* 1982;6(8):803-809.
52. Wong WM, Stamp GW, Elia G, Poulosom R, Wright NA. Proliferative populations in intestinal metaplasia: evidence of deregulation in Paneth and goblet cells, but not endocrine cells. *J Pathol* 2000;190(1):107-113.
53. Smith VC, Genta RM. Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neoplasia. *Microsc Res Tech* 2000;48(6):313-320.
54. Stappenbeck TS. Paneth cell development, differentiation, and function: new molecular cues. *Gastroenterology* 2009;137(1):30-33.
55. Symonds D. Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum. *Arch Pathology* 1974;97:343-347.
56. Watanabe H. Experimentally induced intestinal metaplasia in Wistar rats by X-ray irradiation. *Gastroenterology* 1978;75(5):796-799.
57. Wada R, Yamaguchi T, Tadokoro K. Colonic Paneth cell metaplasia is pre-neoplastic condition of colonic cancer or not? *J Carcinog* 2005;4(1):5.
58. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347(6):417-429.
59. Ott C, Obermeier F, Thielers S, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20(9):917-923.
60. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(3):254-261.
61. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115(1):182-205.

62. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16(6):933-943.
63. Wehkamp J, Stange EF. Paneth cells and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22(6):644-650.
64. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53(11):1658-1664.
65. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314(5804):1461-1463.
66. Li ZR, Guo HY, Zhang ZP. [Studies on pyridonecarboxylic acids as anti-bacterial agents. IX. Study on prodrugs of some pyridonecarboxylic acids]. *Yao Xue Xue Bao* 1991;26(2):111-116.
67. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(2):95-104.
68. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002;10(2):417-426.
69. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274(5289):998-1001.
70. Hitzler H. Cutting- Edge Technology in Laser Microdissection. *American Biotechnology Laboratory* 2006;24 number 1:8.
71. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270(5235):467-470.
72. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002;23(6):291-296.
73. Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20(2):82-88.
74. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(50):18129-18134.
75. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(4):370-378.
76. Wehkamp J, Wang G, Kubler I, et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007;179(5):3109-3118.

77. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307(5710):731-734.
78. Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut* 2009;58(6):882-883; discussion 883-884.
79. Ouellette AJ. Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol* 2005;27(2):133-146.
80. van Es JH, Jay P, Gregorieff A, et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 2005;7(4):381-386.
81. Katoh Y, Katoh M. Identification and characterization of rat Wnt1 and Wnt10b genes in silico. *Int J Oncol* 2005;26(3):841-845.
82. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59-88.
83. Lee FS, Lane TF, Kuo A, Shackleford GM, Leder P. Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fgf-3 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(6):2268-2272.
84. Roose J, Huls G, van Beest M, et al. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 1999;285(5435):1923-1926.
85. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 13):2627-2634.
86. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):126-139.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Adenomatous polyposis coli
Aqua dest.	Aqua destillata
ASC/PYCARD	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
Atg16L1	Autophagy-related protein 16-1
bp	Basenpaare
C. asc.	Colon ascendens
CARD15	caspase recruitment domain-containing protein 15
CD	Crohns Disease
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
CU	Colitis ulcerosa
Cy3	Cytochrom3
DAB	Diaminobenzidin
DMPC	Dimethyldicarbonat
Dvl3	Dishevelled 3
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGF	Epidermal-Growth-Factor
FES	Feature Extraction Software
FFPE	formalinfixierten, Paraffin-eingebettet
FU	Fluorescence
Fz	Frizzled
Fzd5	Frizzled-5- Rezeptor
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDEFA5	humanes Defensin alpha- 5
HDEFA6	human Defensin alpha 6
HES	hairy enhancer of split

ID	Identität
IgG	Immunglobulin G
IL-18	Interleukin-18
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
IL-33	Interleukin-33
I $\kappa$ B $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrollgruppe
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LMM	Laser Microbeam Microdissection
LMPC	Laser Microdissection and Pressure Catapulting
log	Logarithmus
LPC	Laser Pressure Catapulting
LRP	LDL receptor related protein
LRR	Leucine-rich repeat
MATH1	basic helix–loop–helix transcription factor
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramylidipeptid
MEK	Methylethylketon
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Milimeter
MMP-7	matrix metalloproteinase-7
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NALP	Mitglied der Nod-like-Rezeptoren-Familie
ND-1000	NanoDrop-1000
NF-kappaB	Nuclear Factor of kappaB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
nt	nucleotides
p	Korrelationskoeffizient
p.a.	Polymeren-angereichert
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	phosphate buffered saline
PC	Panethzellen

PLA2	Phospholipase A2
POD	Peroxidase
PRR	pattern recognition receptor
PRRs	pattern recognition receptors
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time- Polymerase Chain Reaction
sek	Sekunden
sFRP	secreted Frizzled- related- protein
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
SLPI	sekretorischer Leukozytenprotease Inhibitor
SSPE	Saline- Sodium Phosphate- EDTA
TAE-Puffer	Tris- Azetat- EDTA- Puffer
TCF1	Transcription factor 1
TCF4	Transcription factor 4
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UC	Ulcerative Colitis
vs	versus
WIF1	Wnt-inhibitory factor-1
Wnt	Wingless- type

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Der kanonische Wnt-Signalweg.....	10
Abbildung 2: Kolonepithel immunhistochemisch mit anti-HDEFA6 gefärbt.....	33
Abbildung 3: orthotope Panethzellen in einer Lieberkühnkrypte des term. Ileums .....	34
Abbildung 4: Aufbau und Funktion des Palm Robo® Systems.....	36
Abbildung 5: Darstellung der lasergestützten Mikrodissektion.....	36
Abbildung 6: Prinzip des One-Colour Agilent Microarray.....	41
Abbildung 7: Kolonepithel immunhistochemisch mit anti-HDEFA6 gefärbt.....	45
Abbildung 8: fehlende Panethzellexpression im Colon asc. bei der Kontrolle .....	45
Abbildung 9: Verteilung der Panethzellen bei Patienten mit MC und CU .....	46
Abbildung 10: Gel-Image (A) und Elektropherogramme (B) .....	50
Abbildung 11: Detektion der fluoreszierenden Intensitätssignale .....	52
Abbildung 12: Streudiagramme der gemessenen Signalintensitäten .....	55
Abbildung 13: Darstellung der Genexpression der panethzellspezifischen Gene HDEFA5, HDEFA6, PLA2 und SLPI.....	59
Abbildung 14: Darstellung der Expression extrazellulärer Wnt-Gene .....	62
Abbildung 15: Darstellung der Expression intrazellulärer Gene des Wnt-Signalweges ..	65
Abbildung 16: Darstellung der Expression der NALP-Gene .....	68
Tabelle 1: Patientenkollektive .....	28
Tabelle 2: Automatische Entwässerung und Paraffinierung .....	29
Tabelle 3: Aufstellung der mikrodissezierten Panethzellen und der Patientenpools.....	38
Tabelle 4: Übersicht Hybridisierung.....	42
Tabelle 5: Übersicht der Ratio- Experimente basierend auf den einzelnen Intensitätsprofil. ....	42
Tabelle 6: Übersicht der mittels Software durchgeführten Vergleiche der einzelnen Single-colour-Microarrays.....	43
Tabelle 7: Kriterien zur Bewertung der immunhistochemischen Untersuchung.....	44
Tabelle 8: Übersicht der Patientenkollektive und Anzahl der mikrodissezierten Panethzellen.....	47
Tabelle 9: Übersicht der gebildeten Patientenpools .....	48
Tabelle 10: Ergebnis der spektrophotometrischen Messung.....	49
Tabelle 11: Übersicht der Genexpression in den Ratioexperimenten.....	56
Tabelle 12: Charakteristika und Gegenüberstellung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	95
Tabelle 13: Microarray-Ergebnisse panethzellspezifischer Proteine .....	96
Tabelle 14: Microarray-Ergebnisse extrazellulärer Wnt-Gene .....	98
Tabelle 15: Microarray-Ergebnisse extrazellulärer Wnt-Gene .....	99
Tabelle 16: Microarray-Ergebnisse NALP-Proteine.....	101



## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit auf ihre Art und Weise beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank Frau Dr. med. Nadia Slavova für die Betreuung, Unterstützung und Motivation während der gesamten Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei PD Dr. med. A.- J. Kroesen und Prof. Dr. med. J. H. Buhr für die Bereitstellung und Überlassung des Themas danken.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors der Charite-Campus Benjamin Franklin, insbesondere Sonja Dullat, Marco Arndt und Birgit Hotz.

Nicht versäumen will ich, mich bei Herrn Dr. Hans-Joachim Mollenkopf und Herrn Dr. Alexander Visekruna für die vielfältigen Anregungen und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich der AG Fischer am Campus Virchow Klinikum, Berlin, für die Unterstützung und Bereitstellung des Palm® Lasers Systems.

Nicht zuletzt gehört aber der größte Dank meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Publikationsliste

1. Slavova, N., A. Drescher, et al. "NALP expression in Paneth cells provides a novel track in IBD signaling." Langenbecks Arch Surg **395**(4): 351-7

2. A. Drescher, H.-J. Buhr, A.-J. Kroesen, N. Slavova

Expressionsmuster bei Metaplastischen Paneth Zellen im Colon bei CED.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie,  
Berlin, Oktober 2008 (Poster)

## 12 Erklärung

„Ich, Drescher, Anja, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genexpression humaner Panethzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Untersuchung antimikrobieller Peptide, des Wnt-Signalweges und von NALP-Proteinen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum      14.10.2012

Unterschrift

13 Anhang

		Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
<b>Lokalisation</b>		Befall des gesamten GIT möglich 25-40% nur term. Ileum, 15-35% nur Kolon, 40-55% Ileum und Kolon, 15-25% nur Rektum Selten Ösophagus, Magen	40-50% alleiniger Befall des Rektums und Rektosigmoids 30-40% über Sigma hinaus, 20% Pancolitis mit mgl. Befall der distalen 1-2 cm des terminalen Ileums („Backwash-Ileitis“)
<b>Befallsmuster</b>		Diskontinuierlich, segmental	Kontinuierlich vom Rektum nach proximal
<b>Klinisches Bild intestinaler Symptome</b>	Diarrhoe	Gelegentlich schleimig	Häufig schleimig- blutig, eitrig
	Schmerzen	Kolikartig, vorwiegend im rechten Unterbauch, besonders postprandial, Besserung nach Defäkation	Mild, krampfartig in Bauchmitte, Tenesmen, diffuse Schmerzen im Unterbauch
	Palpation	Resistenz im Abdomen, Konglomerattumor, periproktitischer Abzess	Druckschmerz besonders im linken Unterbauch
		Malabsorption, anale Läsionen	
		<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>extraintestinale Symptome</b>	systemisch	Fieber, Anämie (megalozytär bei Vit. B12- Mangel), allg. Krankheitsgefühl, Gewichtsverlust	Fieber, Anämie, Krankheitsgefühl, Gewichtsverlust
	dermatologisch	Erythema nodosum (15 %), selten Pyoderma gangraenosum	Erythema nodosum (10%), Pyoderma gangraenosum
	Rheumatisch	Arthritis, Spondylitis ankylosans, Sakroileitis	Sakroileitis, seltener Arthritis, Spondylitis ankylosans
	Ophthalmologisch	Konjunktivitis, Uveitis/Iritis, Episkleritis	Konjunktivitis, Uveitis/Iritis

	hepatobiliär	Steatosis hepatis, Cholelithiasis (10-35%), primär sklerosierende Cholangitis (1-5 %)	primär sklerosierende Cholangitis (1-5 %), Steatosis hepatis
	urologisch	Nephrolithiasis (10-20%)	
	hämatologisch	Thromboembolische Ereignisse	Thromboembolische Ereignisse
<b>Differentialdiagnose</b>		<p>Infektiöse Kolitiden durch Campylobacter jejuni / coli, Yersinien, Salmonellen, Shigellen, Amöben, Chlamydien, Tuberkulose, CMV, HSV, HIV</p> <p>Pseudomembranöse Colitis</p> <p>Colitis ulcerosa</p> <p>Akute Appendizitis</p> <p>Divertikulitis</p> <p>Ischämische, radiogene, kollagene Colitis, Malignom des Dünn- oder Dickdarms</p> <p>Medikamentös induziert (NSAID, Laxantien)</p>	<p>Infektiöse Kolitiden durch Salmonellen, Shigellen, Campylobacter jejuni / coli, Yersinien, Amöben, Chlamydien, Tuberkulose, CMV, HSV, HIV</p> <p>Pseudomembranöse Colitis</p> <p>M. Crohn des Colons</p> <p>Divertikulitis</p> <p>Ischämische, radiogene, kollagene Colitis,</p> <p>Kolorektales Karzinom</p> <p>Medikamentös induziert (NSAID, Laxantien)</p>
		<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>Diagnose</b>	- endoskopisch	Aphten, Ulzera in normaler oder entzündeter Mukosa, fissurale Ulzera, Plastersteinrelief, Engstellung des Lumens	<p>Gerötete, feingranulierte Mukosa, Verlust der Gefäßzeichnung, Petechien, Blutung, Eiter, konfluierende oberflächliche Schleimhautulzera, Pseudopolypen (entzündlich, nicht neoplastisch)</p> <p>Inaktives Stadium: blasse, atrophe Schleimhaut mit Pseudopolypen</p>
	- radiologisch	Ulzerationen, Plastersteinrelief, aufgehobene Distension des Darmes, Wandverdickung, Lumeneinengung, Stenose, Fisteldarstellung	Granulierte Mukosa, Spiculae, Ulzera, Kragenknopfulzera, Haustrenverlust, „Gartenschlauchphänomen“, Pseudopolypen

	- histologisch	Diskontinuierliche transmurale Entzündung mit Lymphozyteninfiltration, fokale, lymphoide Hyperplasie, Fibrosierung aller Wandschichten, Epitheloidzellgranulome in der Submukosa, selten Kryptenabzesse	Kontinuierliche polymorphkernige Infiltration, auf Mukosa begrenzt, Kryptenabzesse, Becherzellmasse reduziert
	Labor	BSG erhöht, Leukozytose, CrP erhöht, Hämoglobin erniedrigt Gesamteiweiß erniedrigt Eisen + Ferritin erniedrigt Vitamin B12, Folsäure, Zink und Magnesium erniedrigt	BSG nach Westergren erhöht Leukozytose, CrP erhöht Hämoglobin erniedrigt Gesamteiweiß erniedrigt Eisen + Ferritin erniedrigt
<b>Komplikationen</b>		Stenosen mit akutem Ileus oder chronischem (Sub-) Ileus, Fissuren, Perforation und Peritonitis, abdominale Abzesse, Schlingenabzess, Fisteln ( perianal, enteroenteral, enterokutan, enterovesikal, enterovaginal), selten: Toxisches Megakolon, schwere Blutung, obstruktive Uropathie, Neoplasie des Dünn- und Dickdarms	Strikturen, Ileus, Perforation, toxisches Megakolon, Peritonitis, massive Blutung Risiko für Entstehung eines kolorektalen Karzinoms erhöht bei: Krankheitsdauer > 10 Jahre Ausgedehnter Kolonbefall Häufige Krankheitsschübe Nachweis von Dysplasien

**Tabelle 12: Charakteristika und Gegenüberstellung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Sequenz-Name	Zellanalyse	Fold change	p-Wert	Accession #
<b>DEFA6, defensin, alpha 6, Paneth cell-specific</b>				NM_001926
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	100,00	1,54E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	100,00	1,60E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	23,84	1,13E-21	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	100,00	3,66E-23	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-4,99	4,56E-15	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-100,00	1,71E-23	
<b>DEFA5, defensin, alpha 5, Paneth cell-specific</b>				NM_021010
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	100,00	1,55E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	100,00	1,66E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	30,54	4,74E-22	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	46,28	1,35E-22	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-6,50	6,15E-17	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-100,00	1,98E-23	
<b>PLA2G10</b>				NM_003561
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-100,00	3,21E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-22,63	1,78E-21	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-8,40	2,30E-18	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,98	0,00066	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	3,45	0,04457	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	11,99	4,27E-12	
<b>SLPI</b>				NM_003064
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-100,00	2,27E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-57,40	8,92E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-52,13	1,06E-22	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,95	0,0003	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	3,03	0,00057	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,90	0,07084	

**Tabelle 13: Microarray-Ergebnisse panethzellspezifischer Proteine**



Sequenz-Name	Zellanalyse	Fold change	p-Wert	Accession #
<b>WNT1</b>				NM_005430
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	9,00	0,00251	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	24,69	1,21E-11	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	29,47	2,47E-20	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,38	0,28062	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	1,38	0,28062	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	24,69	1,21E-11	
<b>WNT3</b>				NM_030753
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	34,71	3,00E-19	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	18,96	1,36E-18	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	9,57	3,62E-18	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	2,19	3,53E-06	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,14	8,26E-06	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-4,35	3,48E-12	
<b>WNT3A</b>				NM_033131
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	19,74	6,25E-08	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	11,89	5,77E-06	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	16,78	2,09E-18	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,33	0,18251	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,35	0,00308	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,86	0,01205	
<b>WNT6</b>				NM_006522
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	16,13	7,83E-21	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	6,99	2,21E-17	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	1,28	0,08518	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	5,54	7,29E-16	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,71	3,20E-09	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-11,96	6,74E-20	
<b>WNT7A</b>				NM_004625
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	5,76	4,90E-07	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	48,79	1,48E-22	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	4,88	2,96E-14	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	12,95	4,28E-20	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	8,08	1,02E-17	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,32	0,17697	
<b>WNT7B</b>				NM_058238
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	17,04	1,29E-06	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	12,97	0,00002	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	9,21	6,38E-11	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,52	0,13795	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,21	0,01125	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-3,47	0,00029	
<b>WNT8A</b>				NM_031933
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	34,28	3,92E-14	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	23,99	3,05E-11	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	42,88	3,70E-21	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,14	0,43829	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,64	7,09E-06	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-2,44	0,00001	

<b>WNT9B</b>				NM_003396
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	4,44	0,01359	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	5,32	1,37E-06	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	16,14	1,90E-20	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-3,14	2,12E-09	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	1,08	0,81493	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	2,92	7,43E-06	
<b>WNT10A</b>				NM_025216
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	8,57	1,81E-18	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	3,75	1,37E-12	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	6,31	9,46E-17	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-2,46	3,73E-08	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,43	5,57E-08	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,17	0,27806	
<b>WNT10B</b>				NM_003394
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-16,49	1,78E-15	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-5,29	1,04E-10	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-2,02	0,00002	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,90	0,04586	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	1,65	0,58556	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	5,08	0,00044	
<b>WNT11</b>				NM_004626
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	5,86	1,16E-15	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	1,93	0,00003	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	8,42	2,14E-18	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-6,90	2,81E-17	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-3,59	1,09E-11	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,79	0,00013	

**Tabelle 14: Microarray-Ergebnisse extrazellulärer Wnt-Gene**

Sequenz-Name	Zellanalyse	Fold change	p-Wert	Accession #
<b>WIF1</b>				NM_007191
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	15,83	0,00002	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	14,14	1,50E-04	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	100,00	1,70E-23	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-100,00	3,57E-23	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,98	0,04547	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	44,84	1,59E-22	
<b>FZD5</b>				NM_003468
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	3,32	2,19E-08	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-1,15	4,56E-01	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-2,18	3,01E-06	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,99	0,00292	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-3,74	1,07E-08	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-7,76	9,92E-13	
<b>sfrp2</b>				NM_003013
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-100,00	4,15E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-100,00	2,55E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-100,00	2,13E-23	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,04	0,97903	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,08	0,9579	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,10	0,94861	
<b>DVL3</b>				NM_004423
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-100,00	4,98E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-42,54	1,87E-22	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	2,57	1,22E-08	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-100,00	2,67E-23	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	1,38	0,58026	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	100,00	2,20E-23	
<b>TCF4</b>				NM_003199
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-15,10	1,60E-20	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-91,64	4,79E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-20,35	2,18E-21	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-2,47	0,0001	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-4,23	9,60E-06	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,75	0,01155	
<b>TCF1</b>				NM_000545
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	1,71	0,00381	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	100,00	2,44E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	1,44	0,01356	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	100,00	2,28E-23	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	100,00	1,87E-23	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,27	0,16827	
<b>CTNNB1,catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</b>				NM_001904
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	-100,00	3,52E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-100,00	2,33E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-100,00	4,28E-23	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,62	0,58486	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,07	0,95942	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,55	0,62395	

Tabelle 15: Microarray-Ergebnisse extrazellulärer Wnt-Gene

Sequenz-Name	Zellanalyse	Fold change	p-Wert	Accession #
<b>NALP1</b>				NM_001033053
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	100,00	2,56E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	1,69	4,63E-03	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	-2,57	1,49E-07	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	4,35	1,05E-08	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-100,00	2,28E-23	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-100,00	1,80E-23	
<b>NALP4</b>				NM_134444
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	9,95	4,15E-07	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	7,91	6,27E-11	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	8,43	2,19E-17	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,02	0,91469	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,18	0,46855	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,26	0,29456	
<b>NALP12</b>				NM_033297
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	15,48	6,91E-18	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	6,76	2,52E-14	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	14,94	1,48E-20	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-2,60	1,56E-08	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,70	5,50E-08	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,13	0,40841	
<b>NALP5</b>				NM_153447
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	6,95	1,16E-14	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	18,23	4,88E-21	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	8,70	1,60E-18	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,98	9,87E-06	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	2,31	3,35E-07	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,25	0,14003	
<b>NALP7</b>				NM_139176
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	89,04	5,84E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	4,18	7,31E-09	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	3,04	1,31E-09	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,52	0,02001	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-31,35	4,80E-22	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-42,59	2,00E-22	
<b>NALP11</b>				NM_145007
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	1,68	0,53215	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	100,00	8,32E-23	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	5,26	4,57E-09	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	24,87	1,96E-21	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	22,27	7,55E-20	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,73	0,27825	
<b>NALP3</b>				NM_004895
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	9,21	2,97E-06	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	11,49	2,18E-14	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	10,45	1,64E-18	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	1,18	0,31129	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	1,27	0,27248	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,05	0,80973	
<b>NALP2</b>				NM_017852
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	1,86	0,00341	

	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	-1,15	0,4151	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	1,41	0,02051	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,53	0,01316	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,00	0,00254	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,40	0,08359	
<b>NALP6</b>				NM_138329
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	11,49	1,03E-12	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	4,68	2,59E-08	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	6,09	8,06E-16	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,21	0,25908	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,48	0,00002	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-2,19	0,00006	
<b>NALP8</b>				NM_176811
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	12,00	0,00869	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	5,64	0,05297	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	100,00	1,30E-22	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-8,72	8,64E-16	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-2,68	0,08898	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	2,65	0,00013	
<b>NALP9</b>				NM_176820
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	4,05	0,10519	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	3,61	0,13213	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	8,74	6,86E-07	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,13	0,78768	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,89	0,33849	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,90	0,28367	
<b>NALP10</b>				NM_176821
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	1,04	0,97525	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	1,02	0,98781	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	4,18	0,06382	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,64	0,57474	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,19	0,90406	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	1,33	0,76476	
<b>NALP14</b>				NM_176822
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	5,98	3,16E-11	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	12,49	1,58E-19	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	12,50	5,17E-20	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,12	0,41641	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	1,85	0,00015	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	2,11	5,93E-06	
<b>NALP13</b>				NM_176810
	human mRNA control vs Orthotopic Pc Ileum	5,02	0,01088	
	human mRNA control vs metaplastic Pc CD	4,68	0,00062	
	human mRNA control vs metaplastic Pc UC	5,50	1,23E-12	
	metaplastic Pc UC vs metaplastic Pc CD	-1,09	0,71413	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc CD	-1,35	0,46399	
	orthotopic Pc Ileum vs metaplastic Pc UC	-1,22	0,57563	

**Tabelle 16: Microarray-Ergebnisse NALP-Proteine**