

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
Campus Benjamin Franklin

der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

### **T-Zell-Subtypen im Fettgewebe -**

**Die Beziehung zwischen Fettgewebsinflammation und intestinaler  
Inflammation bei Patienten mit Morbus Crohn und Adipositas *per magna***

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Joanna Jödicke

aus

Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2019

*Für Marlies Holst,  
Eveline und Diether Neubert*

## **Vorwort**

Hiermit wird darauf hingewiesen, dass Teile dieser Arbeit in Form des Artikels „*T-cell Composition in Ileal and Colonic Creeping Fat – Separating Ileal from Colonic Crohn´s Disease*“ am 01.01.2019 im *Journal of Crohn´s and Colitis* publiziert wurden.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
1 Zusammenfassung auf Deutsch und Englisch .....	11
2 Einleitung.....	15
2.1 Immunologische Funktionen des Fettgewebes.....	15
2.2 Adipositas <i>per magna</i> .....	17
2.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese .....	17
2.2.2 Inflammation im Fettgewebe bei Adipositas .....	18
2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	20
2.3.1 Epidemiologie, Ätiologie, klinisches Bild, Therapie .....	20
2.3.2 Pathogenese des Morbus Crohn.....	22
2.3.3 Bedeutung des <i>Creeping Fat</i> bei Morbus Crohn.....	23
2.4 T-Lymphozyten-Subtypen und ihre Rolle bei Adipositas und Morbus Crohn .....	25
2.4.1 T-Helfer-Zellen (CD4 <sup>+</sup> Zellen).....	26
2.4.2 Zytotoxische T-Zellen (CD8 <sup>+</sup> Zellen).....	28
2.4.3 T-Gedächtniszellen .....	29
2.4.4 Regulatorische T-Zellen (T <sub>reg</sub> ) .....	30
2.4.5 TCR- $\gamma\delta$ -Zellen .....	32
2.4.6 Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen).....	33
2.4.7 Rezeptor-vermitteltes Darm-spezifisches <i>homing</i> von T-Zellen .....	34
2.5 Fragestellung .....	35
3 Material und Methoden .....	36
3.1 Materialien .....	36
3.2 Gewinnung, Isolation und Färbung von T-Zellen aus Gewebeproben .....	40
3.2.1 Patienteneinschluss und Entnahme der Gewebeproben .....	40
3.2.2 Histopathologie/ Immunhistologie.....	40
3.2.3 Isolation mononukleärer Zellen aus dem Fettgewebe.....	41

3.2.4	Isolation mononukleärer Zellen aus entzündlich veränderter Darmmukosa .....	42
3.2.5	T-Zell-Stimulation .....	43
3.2.6	Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung.....	43
3.3	Durchflusszytometrie.....	45
3.4	<i>Cytometric Bead Array</i> .....	48
3.5	CED – Klassifikationen und Scores .....	49
3.6	Statistische Analyse .....	51
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Patientenkollektiv .....	53
4.2	Makroskopie.....	57
4.3	Histopathologie .....	58
4.4	Zytokinproduktion im Fettgewebe.....	60
4.5	T-Zell-Subpopulationen im Fettgewebe bei Patienten mit Adipositas .....	62
4.5.1	Expression von Darm-spezifischen <i>homing</i> -Rezeptoren .....	67
4.6	T-Zell-Subpopulationen in Mukosa und mesenterialem Fettgewebe bei CED .....	68
4.6.1	Expression von Darm-spezifischen <i>homing</i> -Rezeptoren .....	74
4.6.2	Korrelationsanalyse der T-Zell-Subpopulationen mit klinischen Parametern .....	76
4.7	<i>Creeping Fat</i> – Vergleich mit viszeralen Fettgewebe bei Adipositas.....	78
4.7.1	Expression von Darm-spezifischen <i>homing</i> -Rezeptoren .....	82
5	Diskussion .....	83
6	Zusammenfassung .....	100
7	Literaturverzeichnis.....	102
8	Eidesstattliche Versicherung.....	112
9	Anteilsklärung an Publikationen.....	113
10	Publikationsliste.....	114
11	Lebenslauf .....	115
12	Danksagung .....	116

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ATIS	<i>adipose-tissue-inflammation-score</i>
BMI	<i>body-mass-index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CCL2	C-C-Chemokinligand-2
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD (engl.)	<i>Crohn´s disease</i>
CDAI	<i>Crohn´s disease activity index</i>
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CF	<i>creeping fat</i>
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
Cy	Cyanin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
FoxP3	<i>forkhead-box-protein-P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GWAS	<i>genome-wide association studies</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEV	Hochendotheliale Venulen
HBI	Harvey-Bradshaw-Index
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPF	<i>high-power-field</i>
IBD (engl.)	<i>inflammatory bowel disease</i>
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
Mad-Cam-1	<i>mucosal addressin-cell adhesion molecule-1</i>

MALT	<i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>
MAO	<i>metabolically abnormal obese</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHO	<i>metabolically healthy obese</i>
MC (iMC; cMC)	Morbus Crohn (des Ileums; des Colons)
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
<i>NOD2</i>	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
ROR $\gamma$ t	<i>retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor-<math>\gamma</math>t</i>
RPMI	Kulturmedium, entwickelt am „Roswell Park Memorial Institute“
SSC	<i>side scatter</i>
SVC	<i>stromal vascular cells</i>
T <sub>CM</sub>	<i>central memory T-Zellen</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>EM</sub>	<i>effector memory T-Zellen</i>
T <sub>EMRA</sub>	<i>effector memory T-Zellen mit CD45RA-Expression</i>
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TLR	<i>toll-like-Rezeptor</i>
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
VAT (engl.)	<i>visceral adipose tissue</i>
UC (engl.)	<i>ulcerative colitis</i>
VF	viszerales Fettgewebe

## Abbildungsverzeichnis

Nr.	Abbildungsüberschrift	Seitenzahl
Abbildung 1	Resektat einer Ileumstenose mit <i>creeping fat</i> bei einem Patienten mit Morbus Crohn.	S. 23
Abbildung 2	T-Zell-Subpopulationen im Überblick.	S. 25
Abbildung 3	Oberflächenantigene von naiven und Gedächtnis-T-Zellen, modifiziert nach Sallusto 1999.	S. 30
Abbildung 4	Gating-Strategie zur Auswertung durchflusszytometrischer Rohdaten.	S. 47
Abbildung 5	Repräsentative Operationspräparate makroskopisch.	S. 57
Abbildung 6	Histologische Charakteristika der Fettgewebe.	S. 59
Abbildung 7	Mithilfe eines <i>cytometric Bead Array</i> bestimmte Konzentrationen der Interleukine (IL) 6, 8, 10, 1 $\beta$ sowie des Tumornekrosefaktors $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) in Fettgewebsüberständen.	S. 61
Abbildung 8	CD4 <sup>+</sup> bzw. CD8 <sup>+</sup> T-Zellen, T-Helferzell-Subgruppen und regulatorische T-Zellen im Fettgewebe bei Adipositas <i>per magna</i> .	S. 64
Abbildung 9	CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> Memory-T-Zellen im Fettgewebe bei Adipositas <i>per magna</i> .	S. 65
Abbildung 10	TCR $\gamma\delta$ Zellen und natürliche-Killer-T-Zellen im Fettgewebe bei Adipositas <i>per magna</i> .	S. 66
Abbildung 11	Integrin-exprimierende CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> -Zellen im Fettgewebe bei Patienten mit Adipositas <i>per magna</i> .	S. 67
Abbildung 12	Anteil von CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ermittelt durch Immunhistologie und Durchflusszytometrie.	S. 69
Abbildung 13	Anteil von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen in mesenterialem Fettgewebe und Mukosa bei Patienten mit Morbus Crohn des Ileums, des Colons und Colitis ulcerosa.	S. 72
Abbildung 14	Anteil von CD4 <sup>+</sup> bzw. CD8 <sup>+</sup> Subgruppen von T-Gedächtniszellen im Vergleich von mesenterialem Fettgewebe und Mukosa bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.	S. 73
Abbildung 15	Anteil von TCR $\gamma\delta$ -Zellen und natürlichen Killer-T-Zellen in mesenterialem Fettgewebe und Mukosa bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.	S. 74
Abbildung 16	Anteil Integrin-exprimierender Zellen an CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> -Zellen in Mukosa und mesenterialem Fettgewebe bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.	S. 75



Abbildung 17	Korrelation von <i>Crohn's disease activity index</i> und T-Helferzell/ $T_{reg}$ -Häufigkeit im <i>creeping fat</i> des Ileums und des Colons bei Patienten mit Morbus Crohn.	S. 77
Abbildung 18	Anteil von $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Zellen, T-Helferzell-Subgruppen und regulatorischen T-Zellen im Fettgewebe im Vergleich zwischen viszeralem Fettgewebe adipöser Patienten und <i>creeping fat</i> von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums.	S. 79
Abbildung 19	Anteil von Memory-T-Zellen an $CD8^+$ Zellen im viszeralen Fettgewebe von Patienten mit Adipositas <i>per magna</i> und im <i>creeping fat</i> von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums.	S. 80
Abbildung 20	Anteil von $TCR\gamma\delta$ Zellen und natürlichen-Killer-T-Zellen im viszeralen Fettgewebe von Patienten mit Adipositas <i>per magna</i> und im <i>creeping fat</i> von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums.	S. 81
Abbildung 21	Anteil von Integrin-exprimierenden Zellen an $CD8^+$ und $CD4^+$ Zellen im Vergleich zwischen viszeralem Fettgewebe adipöser Patienten und <i>creeping fat</i> von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums.	S. 82
Abbildung 22	Hypothesenmodelle zur Fettgewebsinflammation bei Patienten mit Adipositas, Morbus Crohn sowie Patienten mit einer Kombination aus beiden Erkrankungen.	S. 101

## Tabellenverzeichnis

Nr.	Tabellenüberschrift	Seitenzahl
Tabelle 1	Zusammensetzung der Antikörper-Panel zur Zellfärbung für die Durchflusszytometrie.	S. 44
Tabelle 2	Montreal Klassifikation, modifiziert nach Silverberg MS et al 2005.	S. 49
Tabelle 3	<i>Crohn´s disease activity index (CDAI)</i> modifiziert nach Best et al 1976.	S. 50
Tabelle 4	<i>Harvey-Bradshaw-Index (HBI)</i> , modifiziert nach Harvey und Bradshaw 1980.	S. 50
Tabelle 5	Patientencharakteristika,	S. 54
Tabelle 6	Metabolische Begleiterkrankungen von Patienten mit <i>Adipositas per magna</i> .	S. 54
Tabelle 7	Montreal Score der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.	S. 55
Tabelle 8	Liste der aktuellen und früheren Therapien der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.	S. 55

# 1 Zusammenfassung auf Deutsch und Englisch

## Einleitung:

Die Inzidenz von Adipositas und Morbus Crohn (MC) steigt weltweit an. Beide Erkrankungen zeigen eine Inflammation des viszeralen Fettgewebes (VF). Im hypertrophierten VF adipöser Patienten besteht eine chronische niedriggradige Entzündung, die mit der Entwicklung einer Insulinresistenz assoziiert ist. Zudem ist bei Adipositas die intestinale Barrierefunktion gestört und bei gleichzeitig bestehendem MC besteht ein schwererer Krankheitsverlauf.

Beim MC wurde das pathognomonische *creeping fat* (CF) um entzündete Darmanteile herum durch Burrill B. Crohn identifiziert. Die Funktion dieses Gewebes aus hyperplastischen Adipozyten und infiltrierenden Immunzellen bleibt ungeklärt. Protektive sowie entzündungsaggravierende Funktionen werden diskutiert.

In dieser Arbeit wurden T-Zell-Subpopulationen im Fettgewebe von Patienten mit Adipositas *per magna* und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) untersucht. Dabei wurde auch ein Fokus auf die Expression des Darm-spezifischen *homing*-Integrins  $\alpha 4\beta 7$  gelegt.

## Methoden:

Fettgewebs- und (bei CED) Mukosaproben wurde in krankheitsassoziierten Operationen von 47 Patienten entnommen. Die Gewebeproben wurden teils fixiert und immunhistochemisch untersucht oder daraus Immunzellen isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In Fettgewebsüberständen wurde mittels *cytometric bead array* Zytokine quantifiziert.

## Ergebnisse:

Im VF exprimierte ein signifikant höherer Anteil der T-Zellen  $\alpha 4\beta 7$  als im subkutanen Fettgewebe bei vorherrschendem pro-inflammatorischen T-Zell-Milieu.

Das ileale und colonische CF bei MC-Patienten unterschied sich makroskopisch sowie histologisch, wobei verkleinerte Adipozyten und eine hohe absolute T-Zell-Infiltration nur im ilealen CF zu finden waren. Das CF des Colons ähnelte stärker dem mesocolischen Fett von Colitis ulcerosa (CU)-Patienten. Es zeigten sich distinkte T-Zell-Populationen im Fettgewebe, wobei das ileale CF durch einen höheren Anteil von

regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und *central-memory* T-Zellen hervorstach. Zudem unterschieden sich die T-Zell-Subgruppen zwischen ilealem CF und Mukosa.

Eine Korrelation zwischen im Fett ansässigen T-Helferzellen und  $T_{reg}$  mit der Krankheitsaktivität war invers bei Patienten mit ilealem und colonischen MC.

Das VF adipöser Patienten beherbergte einen höheren Anteil pro-inflammatorischer T-Zellen als das ileale CF bei MC, zudem exprimierten mehr T-Zellen  $\alpha 4\beta 7$  als im CF.

#### Schlussfolgerungen:

Bei Patienten mit Adipositas finden sich im VF  $\alpha 4\beta 7^+$  T-Zellen in einem überwiegend pro-inflammatorischen Milieu. Diese Zellen könnten durch intestinales *homing* an der Barriestörung bei Adipositas und der Krankheitsaggravierung bei gleichzeitigem MC beteiligt sein.

Das ileale CF von MC-Patienten zeigte eine ausgeglichene T-Zell-Infiltration im Vergleich zum VF adipöser Patienten. Interessanterweise unterschieden sich ileales und colonisches CF makroskopisch, histologisch sowie hinsichtlich der T-Zell-Zusammensetzung und deren Korrelation mit der Krankheitsaktivität. Diese Erkenntnisse unterstützen genetische Daten, welche die Crohn-Colitis als eigene Entität zwischen ilealem MC und CU ansiedeln und sprechen dafür, dass verschiedene Ausprägungsformen des CF im Rahmen des MC existieren.

## **Abstract**

### Introduction:

Obesity and Crohn's disease (CD) represent diseases increasing worldwide. Both involve an inflammation of visceral adipose tissue (VAT). In hypertrophic, obese VAT, a low-grade inflammation has been associated with insulin resistance. Observations in obese patients imply an impairment of intestinal barrier function and an altered disease course in obese CD patients.

In CD patients a pathognomonic fat wrapping occurs around inflamed regions of the intestine, the so-called *creeping fat (CF)*. However, the exact function of this tissue, consisting of a hyperplasia of small-sized adipocytes and infiltrating leukocytes, remains unsolved. Both a protective and a contributing role towards intestinal inflammation are discussed.

This study characterized T-cell subpopulations in VAT from obese patients as well as adipose tissue and adjacent mucosa in inflammatory bowel disease (IBD) patients. The study also focuses on expression of the gut-homing integrin  $\alpha 4\beta 7$ .

### Methods:

VAT (and in IBD patients mucosal) samples were obtained from 47 patients undergoing disease-related surgery. Fractions were fixed and stained for immunohistochemistry. Immune cells were isolated, stained and analyzed by flow cytometry. *Cytometric bead array (CBA)* was performed to quantify cytokine release in adipose tissue supernatants.

### Results:

In obese VAT a high proportion of T-cells expressed integrin  $\alpha 4\beta 7$ , significantly more than in subcutaneous adipose tissue. VAT was dominated by a pro-inflammatory T-cell milieu.

Macroscopic differences were found between colonic and ileal CF. Histology showed significantly smaller adipocytes and a high absolute T-cell infiltration only in ileal CF. Colonic CF resembled fat from UC patients. T-cell populations differed between IBD groups, ileal CF standing out by a higher amount of regulatory T-cells ( $T_{reg}$ ) and central memory T-cells. Furthermore, T-cells in ileal CF and mucosa consisted of distinct subgroups.

Correlation of adipose tissue T-helper cell and T<sub>reg</sub> share with disease activity was inverse in ileal and colonic CF.

When comparing obese VAT with ileal CF, VAT showed a higher amount of pro-inflammatory T-cells, also significantly more T-cells were  $\alpha 4\beta 7$ -positive.

Conclusion:

In obese VAT  $\alpha 4\beta 7^+$  T-cells are present in a pro-inflammatory milieu. These cells could be involved in intestinal barrier impairment and exacerbation of CD in obese individuals.

Ileal CF from CD patients presents a more balanced T-cell infiltration compared to VAT in obese individuals.

Interestingly, ileal and colonic CF differ regarding macroscopic and histological aspects, composition of T-cells and correlation with disease activity. This supports genetic data placing colonic CD between ileal CD and UC.

## 2 Einleitung

### 2.1 Immunologische Funktionen des Fettgewebes

Fettgewebe wurde lange Zeit ausschließlich als Energiespeicher des menschlichen Körpers angesehen. Erst später erkannte man weitere funktionelle Eigenschaften der Fettzellen (Adipozyten) wie die Produktion appetitregulierender Hormone (1), die Regulation von Insulinsensitivität (2) und die Interaktion mit Immunzellen (3). Heute wird das Fettgewebe als endokrines Organ mit spezifischen metabolischen und immunologischen Funktionen betrachtet.

Beim Menschen werden braunes und weißes Fettgewebe unterschieden. Braunes Fettgewebe hat seine Bedeutung vor allem in der Thermogenese bei Neugeborenen, wobei seine Rolle beim Erwachsenen nicht vollkommen verstanden ist. Das beim Erwachsenen dominierende weiße Fettgewebe, welches im Untersuchungsfokus dieser Arbeit steht, kann man entsprechend seiner Lokalisation in subkutanes und viszerales Fettgewebe unterteilen, was auch von funktioneller Bedeutung ist. So zeigt das viszerale (abdominelle) Fettgewebe, wenn es im Rahmen von Übergewicht hypertrophiert ist, die stärkste Korrelation mit der Entwicklung einer Insulinresistenz, Typ 2 - Diabetes und Arteriosklerose, während ein verstärktes Auftreten von subkutanem Fettgewebe nicht mit schweren metabolischen Konsequenzen assoziiert ist (4).

Weißes Fettgewebe setzt sich aus Adipozyten sowie verschiedenen Stromazellen (*stromal-vascular-cells*, SVCs) zusammen. Hierzu gehören Präadipozyten, die Vorläuferzellen der Adipozyten, mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, aber auch Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten. Im gesunden nicht-hypertrophierten Fettgewebe kontrollieren verschiedenste Zellen das Milieu und verhindern durch regulatorische Aktivität eine Immunzellaktivierung (5, 6).

Eine Fettgewebsinflammation geht daher immer mit einem kompletten oder partiellen Verlust dieses regulatorischen Milieus einher. So kommt es bei steigendem Übergewicht zu einer Ansammlung pro-entzündlicher Zellen im viszeralen Fettgewebe (vorrangig von Makrophagen und Lymphozyten) (7, 8).

Eine weitere Form der Fettgewebsinflammation stellt das *creeping fat* bei Patienten mit Morbus Crohn dar. Hierbei handelt es sich um ein zellulär infiltriertes, morphologisch verändertes mesenteriales Fettgewebe in direkter Nähe zu den entzündeten

Darmabschnitten, dessen genaue immunologische Bedeutung nur unvollständig verstanden ist (9).

Am Beispiel der Beziehung von viszeraler Fettgewebsentzündung und Insulinresistenz wird deutlich, dass das entzündlich veränderte Fettgewebe bei Adipositas systemische Auswirkungen hat. Auch das *creeping fat* könnte im Rahmen des Morbus Crohn spezifische Funktionen hinsichtlich der benachbarten chronischen Entzündung ausüben. In dieser Arbeit werden die beiden beschriebenen Formen der Fettgewebsinflammation vergleichend betrachtet und ihre potentiellen systemischen und lokalen Auswirkungen diskutiert.



## 2.2 Adipositas *per magna*

### 2.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese

Pathologisch erhöhtes Körpergewicht stellt eine immer größer werdende Bedrohung für die Gesundheit vieler Menschen weltweit dar. Zwischen 1980 und 2008 kam es zu einer weltweiten Verdopplung der Prävalenz der Adipositas, wobei eine Beschleunigung des Anstiegs seit 2000 beobachtet werden konnte (10).

Adipositas ist mit einer Erhöhung der Gesamtmortalität verbunden und stellt einen zentralen Risikofaktor für kardiovaskuläre, endokrinologische, muskuloskelettale und neoplastische Erkrankungen dar (11).

Die Adipositas ist definiert als eine Vermehrung des Körperfetts über die Norm hinaus, was unter anderem über den sogenannten *body-mass-index* (BMI) quantifiziert wird. Dieser ergibt sich aus Körpergewicht (in Kilogramm) geteilt durch das Quadrat der Körpergröße (in Metern) und liegt bei normalgewichtigen Erwachsenen zwischen 18,5 und 25 kg/m<sup>2</sup>. Ein BMI von unter 18,5 kg/m<sup>2</sup> gilt als Untergewicht, über 25 kg/m<sup>2</sup> als Übergewicht. Ein BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> entspricht Adipositas Grad I, ab 35 kg/m<sup>2</sup> Grad II und ab 40 kg/m<sup>2</sup> Adipositas Grad III, welche auch als Adipositas *per magna* bezeichnet wird (12). Ein Anstieg des BMI im Rahmen des Übergewichts ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (12).

Die Ätiologie der Adipositas liegt in der Diskrepanz zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch durch die Zufuhr fetthaltiger und hochkalorischer Nahrung in Verbindung mit ungenügender körperlicher Aktivität und in Zusammenhang mit genetischen Faktoren und psychosozialen Komponenten. Auch die Einnahme von Medikamenten (z.B. Glukokortikoide, Psychopharmaka) kann das Risiko für Adipositas erhöhen.

Pathomorphologisch ist eine Zunahme des Körperfettanteils (sowohl subkutan als auch viszeral) zu beobachten, wobei die Akkumulation von viszeralem Fettgewebe den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Folgeerkrankungen darstellt. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die dort stattfindenden Veränderungen in engem Zusammenhang mit systemischen metabolischen Vorgängen, beispielsweise Insulinresistenz und Arteriosklerose, stehen (13, 14). Paradoxerweise gibt es eine Gruppe von Patienten mit Adipositas, welche trotz langjähriger Dauer der Erkrankung keine Insulinresistenz entwickeln. Man bezeichnet diese Patienten, welche je nach

genauer Definition ca. 9-40% der adipösen Patienten ausmachen (15, 16), als „metabolisch gesund“ (*metabolically healthy obese* = MHO) (16, 17). Diese Personen entwickeln erstaunlicherweise seltener Typ II Diabetes und kardiovaskuläre Begleiterkrankungen (18), allerdings weisen sie im Vergleich zur normalgewichtigen Bevölkerung eine erhöhte Mortalität auf (15). Der konkrete Mechanismus für die fehlenden Komorbiditäten ist noch nicht komplett verstanden, ein erhöhter Plasma-Adiponektin-Spiegel konnte jedoch beispielsweise mit dem MHO-Phänotyp assoziiert werden (19). Ebenfalls konnte bei Frauen mit dem MHO-Phänotyp eine geringere Masse an viszeralem Fettgewebe sowie eine niedrigere Konzentration an C-reaktivem Protein (CRP) im Blut im Vergleich zu adipösen Patientinnen mit gestörter Insulinsensitivität festgestellt werden (20). Die Verteilung von subkutanem und viszeralem Fettgewebe sowie das inflammatorische Milieu in den jeweiligen Kompartimenten scheinen daher einen entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus adipöser Patienten zu haben.

### **2.2.2 Inflammation im Fettgewebe bei Adipositas**

Den Veränderungen im hypertrophierten Fettgewebe bei Adipositas liegen zwei pathophysiologische Vorgänge zugrunde: Eine Dysfunktion der Adipozyten und eine chronische niedriggradige Inflammation des Fettgewebes.

Die Dysfunktion der mit Lipiden überbeladenen, hypertrophierten Adipozyten resultiert in einer Veränderung der Adipokin- und Zytokinsekretion, wobei eine Zunahme der pro-inflammatorischen Zytokine  $TNF\alpha$  (2) und IL-6 (21) sowie eine Abnahme des anti-inflammatorischen Adiponektins beobachtet wurde (22). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere hypertrophierte Adipozyten eine höhere Expression von MHC-II-Molekülen (MHC=major histocompatibility complex) aufweisen und somit verstärkt T-Helferzellen aktivieren können (23).

Die zellulären Komponenten dieser Fettgewebsinflammation bilden vor allem pro-inflammatorische Makrophagen und T-Lymphozyten (21, 24). Pro-inflammatorische T-Lymphozyten infiltrieren mehrerer experimenteller Arbeiten zufolge das hypertrophierte Fettgewebe zuerst und führen durch die Ausschüttung von Zytokinen zu einer Chemoattraktion von Makrophagen (24, 25). Ebenso sezernieren die hypertrophierten Adipozyten selbst Chemokine (*monocyte chemoattractant protein-1* = MCP-1/ C-C-Chemokinligand-2 = CCL2), welche zu einer Einwanderung von Makrophagen ins

Fettgewebe führen (26). Diese tragen wiederum ihrerseits durch Zytokinproduktion zum Milieu innerhalb des Fettgewebes bei.

Insgesamt wirkt sich das pro-inflammatorische Milieu im hypertrophierten Fettgewebe systemisch aus, indem es unter anderem über die verstärkte Ausschüttung von TNF $\alpha$  direkt an der Entwicklung einer Insulinresistenz beteiligt ist (2). In tierexperimentellen Studien konnte diese Wirkung vor allem über die Inhibition von zentralen Molekülen im Insulinsignalweg, vor allem der Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase, erklärt werden (27).

Die genauen Mechanismen, die zu inflammatorischen Vorgängen bei Adipositas führen, sind nicht vollständig geklärt. Ursächlich diskutiert werden eine Lipid-Überladung der Adipozyten (28), eine Gewebshypoxie im Rahmen der Hypertrophie (29), ein erhöhter ER (endoplasmatisches Retikulum)-Stress (30), sowie die Anwesenheit von bakteriellen Antigenen. Letztere zeigt sich in einer erhöhten Plasmakonzentration von Lipopolysaccharid (LPS) bei Adipositas, wobei auch eine Assoziation von Adipositas und intestinaler Barrierestörung bekannt ist (31-33).

## **2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

### **2.3.1 Epidemiologie, Ätiologie, klinisches Bild, Therapie**

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind eine Erkrankungsgruppe, zu der sowohl der Morbus Crohn als auch die Colitis ulcerosa gezählt werden. Beide haben gemeinsam, dass es sich um chronische Erkrankungen handelt, die häufig ein schubförmiges Verlaufsbild zeigen und verschiedene Lokalisationen im Gastrointestinal-Trakt (GI-Trakt) betreffen können. Die Prävalenz der CED in Deutschland liegt bei ca. 100-200/100.000 Einwohner (34). In den letzten Jahrzehnten konnte eine weltweite Zunahme der Inzidenz von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa festgestellt werden (35). Der Morbus Crohn betrifft vor allem Menschen in Nordamerika und Europa, mit steigender Inzidenz auch in Asien, mit einer weltweit ähnlichen Häufigkeit bei Männer und Frauen (35).

Pathomorphologisch imponiert bei Morbus Crohn eine transmurale Entzündung aller Darmwandabschnitte, wobei histologisch die Bildung von Epitheloidzellgranulomen charakteristisch ist (36). Makroskopisch zeigt sich beim Morbus Crohn eine diskontinuierliche Entzündung mit intermittierend gesunden Darmarealen (sogenannte *skip lesions*), wobei alle Anteile des GI-Traktes betroffen sein können, während sich die Entzündung bei der Colitis ulcerosa kontinuierlich vom Rektum nach oral entlang des Colons ausbreitet und fast ausschließlich die Mukosa betrifft (37). Histologisch typisch ist hier das Vorkommen von Kryptenabszessen (38). Die Begrenzung der Colitis ulcerosa auf das Colon (abgesehen von einer sogenannten Backwash-Ileitis) begründet auch die letztendlich besseren Therapieoptionen, da die Colitis ulcerosa durch eine komplette Proktokolektomie behandelbar ist.

Der Morbus Crohn hat seinen Krankheitsbeginn häufig zwischen dem 10. und 40. Lebensjahr mit einem zweiten, schwächeren Altersgipfel zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr (39). Dies bedeutet, dass der Großteil der Patienten in einer frühen Lebensphase mit der Diagnose konfrontiert wird und oft lebenslang unter den Folgen der Erkrankung leidet. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher nicht vollständig geklärt, wobei eine Interaktion zwischen genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren, einer gestörten intestinalen Barriere sowie einer Dysregulation des intestinalen Immunsystems im Zusammenspiel mit den lokalen Mikrobiota diskutiert werden (40, 41). Die bisherigen Hypothesen zur Pathogenese des Morbus Crohn sind in Kapitel 2.3.2 dargestellt.

Patienten mit Morbus Crohn zeigen häufig ein schubförmig auftretendes Beschwerdebild. Klinische Zeichen sind kolikartige Bauchschmerzen, Diarrhoen, eine tastbare abdominale Resistenz, Gewichtsverlust und Fieber (insbesondere bei intra-abdominellen Abszessen) (42). Fünfundzwanzig bis vierzig Prozent der Patienten sind auch von extra-intestinalen Manifestationen wie Anämie, Arthritis, Uveitis, Mundaphten, Erythema nodosum, Pyoderma gangränosum, primär sklerosierender Cholangitis oder Autoimmunhepatitis betroffen (43).

Am häufigsten ist das terminale Ileum entzündlich verändert, weshalb die Erkrankung in ihrer Erstbeschreibung auch als Ileitis terminalis bezeichnet wurde (44). Ebenso können die Ausbreitungsformen Colitis, Ileocolitis, perianaler Befall oder Befall des oberen GI-Traktes vorkommen. Als Komplikation der chronischen Entzündungsreaktion können sich Stenosen, Fisteln und Abszesse bilden, letztere insbesondere auch bei perianaler Beteiligung (45, 46).

Die Therapie des Morbus Crohn erfolgt in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität, der Lokalisation und des Krankheitsverhaltens. Therapeutisch wird zwischen Remissionsinduktion und Remissionserhaltung unterschieden. Zur Remissionsinduktion verwendete Medikamentengruppen sind systemische oder lokal applizierte Glukokortikoide,  $TNF\alpha$ -, IL-12/-23- und Integrinantikörper ggf. in Kombination mit einem klassischen Immunsuppressivum wie Thiopurinanaloga oder Methotrexat (47). Zur Erhaltung der Remission im schubfreien Intervall werden Thiopurinanaloga, Methotrexat und  $TNF\alpha$ -, Integrin-Antikörper sowie IL-12/23-Antikörper eingesetzt (47). Stehen statt der akuten Entzündung narbige Stenosen im Fokus oder besteht ein therapierefraktärer Verlauf bei lokalisierter Erkrankung, kann neben endoskopischen Ansätzen auch eine sparsame Chirurgie indiziert sein (34, 47).

Obwohl Übergewicht per se keinen Risikofaktor für die Entwicklung des Morbus Crohn darstellt, hat das Körpergewicht einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. So leiden übergewichtige Patienten mit Morbus Crohn unter schwerwiegenderen (insbesondere perianalen) Komplikationen, wobei oftmals ein schlechteres Therapieansprechen und frühere chirurgische Interventionen beobachtet werden konnten (48, 49).

### 2.3.2 Pathogenese des Morbus Crohn

Man vermutet, dass Morbus Crohn durch eine Interaktion aus Umweltfaktoren (inklusive intestinalen Mikrobiota) und Immunmechanismen bei Personen mit genetischer Suszeptibilität entsteht. Die familiäre bzw. genetische Komponente des Morbus Crohn ist mittlerweile gut untersucht. Zwillingsstudien konnten zeigen, dass ein deutlicher genetischer Einfluss besteht, wobei jedoch häufige Diskonkordanzen bei eineiigen Zwillingen (nur ein an Morbus Crohn erkrankter Zwilling) die Bedeutung von äußeren Einflussfaktoren unterstreichen (50). Genom-weite Assoziationsstudien (*genome-wide association studies*, GWAS) konnten bisher über 70 Loci für Suszeptibilitätsgene identifizieren, die unter anderem für Proteine kodieren, die essenziell für die intestinale Barrierefunktion oder auch für die Regulation von Immunantworten sind (51). Zahlreiche Umweltfaktoren, wie z.B. sozioökonomische Einflüsse und Ernährung wurden untersucht (52), wobei das Rauchen am deutlichsten mit einer Risikoerhöhung für Morbus Crohn assoziiert ist (53). Die Zusammensetzung der Darmflora, die bereits bei Gesunden erhebliche Variationen aufweist, ist bei Patienten mit Morbus Crohn dysbiotisch verändert, was insbesondere eine verminderte Diversität der Bakterienspezies (54), sowie eine vermehrtes Vorkommen potentiell adhärenter Spezies mit potentieller Invasivität zeigt (55). Interessanterweise scheint gerade das Zusammentreffen von Dysbiose und genetischer Suszeptibilität (und damit verbundener gestörter intestinaler Barrierefunktion) für die Entwicklung der Erkrankung notwendig zu sein. Aufgrund der gestörten Barriere erfolgt in der Krankheitspathogenese eine bakterielle Translokation in die Darmwand (56) und in das umgebende Fettgewebe (57). Das angeborene Immunsystem, vorwiegend Makrophagen und dendritische Zellen, erkennt diese über Rezeptoren für bakterielle Antigenmuster (*toll-like-receptor* = TLR/ *nucleotide-binding oligomerization domain - containing protein 2* = NOD2), wobei es zur Zytokinausschüttung und T-Zellaktivierung kommt. Genmutationen, die *NOD2* betreffen, können zu einer verminderten Phagozytose und damit fehlender Elimination der Bakterien führen und sind spezifisch für den Morbus Crohn beschrieben (58). Zusätzlich ist der natürliche Mechanismus der „oralen Toleranz“, welcher beim gesunden Menschen eine Immunantwort auf kommensale Bakterien und Bestandteile des körpereigenen Darminhalts verhindert, bei Morbus Crohn gestört (59). Letztendlich kommt es zu einer überschießenden Immunantwort und zu einer chronischen Aufrechterhaltung der Entzündung. Gestörte

oder fehlende regulatorische Mechanismen werden hierbei diskutiert. Weiterführend sind die einzelnen Akteure der T-Zell-Antwort und ihre Bedeutung bei Morbus Crohn in Kapitel 2.4 dargestellt.

### 2.3.3 Bedeutung des *Creeping Fat* bei Morbus Crohn

Das *creeping fat* (CF) ist ein für den Morbus Crohn pathognomonisches Phänomen, welches bereits in der Beschreibung der Erkrankung durch Burrill B. Crohn im Jahre 1932 erwähnt wurde (44). Es handelt sich um eine Hyperplasie des mesenterialen Fettgewebes, das sich um den Darm herum bis auf die antimesenteriale Seite ausbreitet und mindestens die Hälfte der Zirkumferenz des Darmes umfasst (siehe **Abbildung 1**).



**Abbildung 1.** Resektat einer Ileumstenose mit *creeping fat* bei einem Patienten mit Morbus Crohn. Zu beobachten ist eine Ausdehnung des Fettgewebes vom Mesenterium (oben) bis auf die Serosa des Darmes. Mindestens 50% der Zirkumferenz des Darmes sind von Fettgewebe umgeben.

Die ungewöhnliche Fettummantelung wurde für Chirurgen zu einem Hinweis auf versteckte Läsionen. Es existiert nachweislich ein Zusammenhang der Ausbildung des CF mit der lokalen intestinalen, transmuralen Inflammation (60). Das CF zeigt einige Eigenschaften, die es von anderem viszeralem Fettgewebe unterscheiden. Insbesondere finden sich hier verkleinerte Adipozyten (9), welche durch beispielsweise eine stärkere Produktion von  $\text{TNF}\alpha$ , sowie eine erhöhte Leptinausschüttung ein verändertes Zytokinexpressionsmuster aufweisen (61, 62). Im CF ist zudem eine erhöhte Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins Adiponektin zu beobachten, die für dieses Gewebe im Gegensatz zu gesundem oder hypertrophiertem viszeralem Fettgewebe spezifisch und einzigartig ist (63). Interessanterweise handelt es sich beim

CF um ein Phänomen, das sowohl bei adipösen als auch bei kachektischen Patienten auftritt (64, 65). Dies lässt vermuten, dass weniger generalisierte metabolische Einflüsse, sondern vielmehr die krankheitsspezifischen lokalen Bedingungen zur Entwicklung des CF beitragen. Dadurch würde es sich grundlegend von der viszeralen Fettgewebshypertrophie im Rahmen der Adipositas unterscheiden.

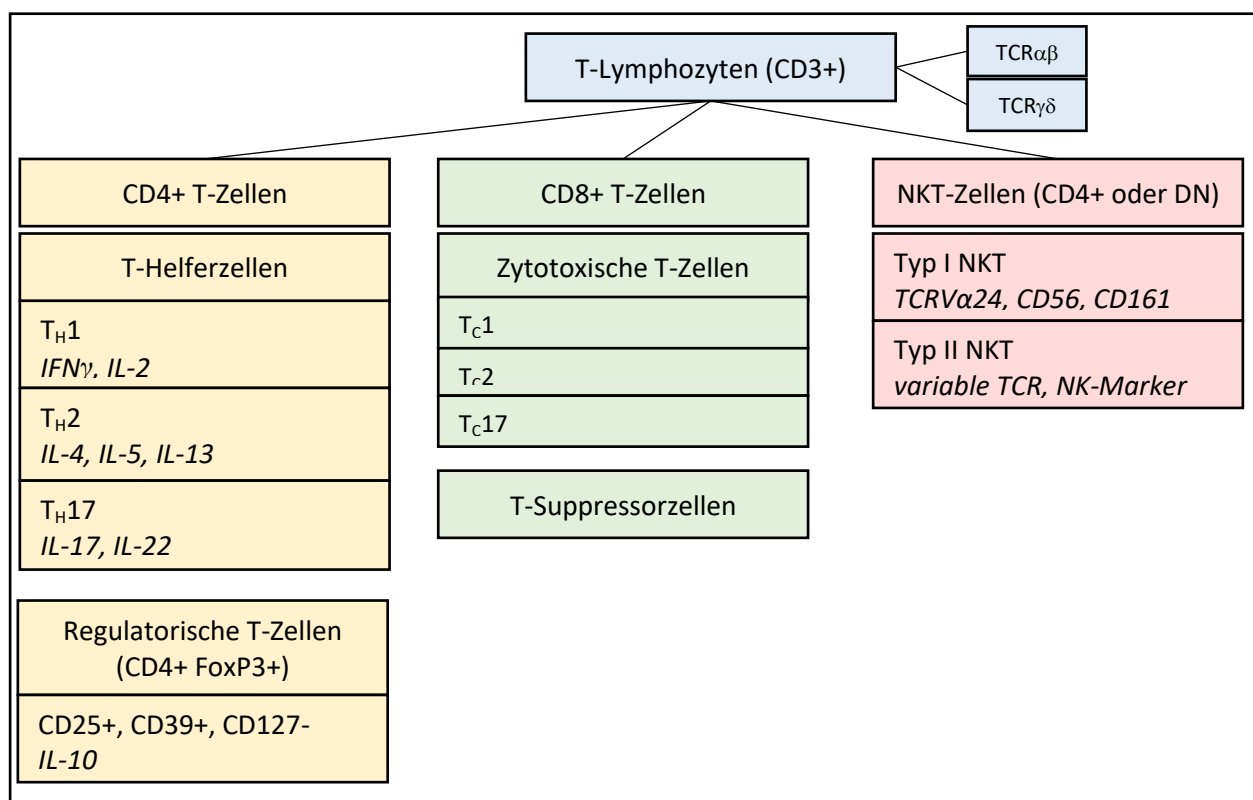
Eine der ersten Hypothesen zur Bedeutung des CF sieht dessen Entwicklung als direkte Folge der transmuralen Entzündung, welche sich in das umgebende Gewebe ausbreitet (60). Neuere Erkenntnisse weisen diesem Gewebe eine mögliche protektive Funktion in Form einer immunologischen Barriere zu, insbesondere im Rahmen einer bakteriellen Translokation, welche bei diesen Patienten vermehrt vorkommt (57). So zeigte sich im Makrophagenkompartiment dieses Gewebes eine Dominanz der regulatorischen Makrophagen, die durch das lokale Milieu zur Produktion anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10) stimuliert werden konnten (66).

Aufgrund des unterschiedlichen Entzündungsverhaltens bei Morbus Crohn (transmural stenosierend und fistulierend) und Colitis ulcerosa (mukosal ulzerierend) leitet sich ab, dass das darmnahe Fettgewebe unterschiedlich in das Entzündungsgeschehen involviert ist. Im Gegensatz zum Morbus Crohn existiert bei Patienten mit Colitis ulcerosa kein CF und weder eine Verkleinerung von Adipozyten noch eine bakterielle Translokation konnte im mesocolischen Fettgewebe dieser Patienten festgestellt werden (67).



## 2.4 T-Lymphozyten-Subtypen und ihre Rolle bei Adipositas und Morbus Crohn

T-Lymphozyten gehören zu den wichtigsten Akteuren des erworbenen, zellulären Immunsystems. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich anhand ihrer Eigenschaften und Oberflächenmoleküle weiter in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterteilen lassen, wobei weitere Untergruppen bekannt sind (**Abbildung 2**). Nach ihrer Bildung im Thymus zirkulieren naive T-Zellen zwischen Blut und Lymphknoten, bis sie gegebenenfalls durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden. Dies geschieht über die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen im Lymphfollikel (68).



**Abbildung 2.** T-Zell-Subpopulationen im Überblick. **Abkürzungen:** T-Zell-Rezeptor (TCR), T-Helfer-Zelle (T<sub>H</sub>), zytotoxische T-Zelle (T<sub>C</sub>), Interferon (IFN), Interleukin (IL), Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), doppelt negativ (DN), *forkhead-box-protein-P3* (FoxP3).

### 2.4.1 T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup> Zellen)

T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>-Zellen) nehmen eine Mediatorfunktion ein, indem sie andere Immunzellen wie Makrophagen, B-Zellen, oder Granulozyten aktivieren oder deaktivieren. Sie erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptidantigene von Erregern, die ihnen von Antigen-präsentierenden Zellen auf ihrer Zelloberfläche präsentiert werden. Je nach Zytokinmilieu können sich naive T-Zellen bei der Antigenpräsentation im Lymphfollikel zu T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 oder T<sub>H</sub>17-Zellen differenzieren. (68)

T<sub>H</sub>1-Zellen reagieren auf Antigenpräsentation mit der Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), was zur Makrophagenaktivierung beiträgt. Sie sind an Prozessen wie der Reifung zytotoxischer T-Zellen beteiligt und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine. (68)

T<sub>H</sub>2-Zellen haben ihre Hauptaufgabe in der Aktivierung von B-Zellen, bei denen sie einen Wechsel des Immunglobulin (Ig)- Isotyps von beispielsweise IgM zu IgG (über IL-4-Expression) oder im Darm auch von IgM zu IgA (über IL-5-Expression) bewirken. Zusätzlich können sie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 sezernieren und durch Toleranzinduktion immuninhibitorisch an T-Zellen und Makrophagen wirken. Des Weiteren aktivieren sie eosinophile Granulozyten. (68)

Initial ging man von einem antagonistischen T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Dogma ohne Überlappungen dieser Zelltypen aus, was sich insbesondere auf Daten aus murinen T-Helferzellen stützte (69). Allerdings gibt es insbesondere beim Menschen fließende Übergänge, so sind beispielsweise Zellen beschrieben, die nach Stimulation in der Lage sind IFN $\gamma$  und IL-4 zu produzieren (70).

Eine Erweiterung zu der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Theorie bildete die Entdeckung der T<sub>H</sub>17-Zellen (71). T<sub>H</sub>17-Zellen stellen konstitutive Bestandteile des Mukosa-assoziierten Immunsystems (MALT) im Darm dar (72). Sie produzieren IL-17A, IL-17B, IL-17F sowie weitere Zytokine und haben ihre Aufgabe in der Abwehr pathogener Bakterien und Pilze an der intestinalen Barriere. Dies gelingt durch ihre Beteiligung an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sowie an der Produktion von antimikrobiellen Peptiden (73). Zudem wird T<sub>H</sub>17-Zellen eine große Bedeutung im Rahmen autoimmuner Prozesse zugesprochen, insbesondere wenn sich ihr Phänotyp zugunsten pro-inflammatorischer Funktionen verändert (74).

### **CD4<sup>+</sup> Zellen im gesunden und entzündeten Fettgewebe**

Hinsichtlich des Auftretens von T<sub>H</sub>-Zellen im Fettgewebe gibt es Unterschiede zwischen gesundem und hypertrophiertem Fettgewebe. Bei normalgewichtigen Personen herrscht ein anti-inflammatorisches Milieu unter T<sub>H</sub>2-Dominanz, während der Anteil an IFN<sub>γ</sub>-produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen im Fettgewebe bei Adipositas zunimmt, was mit einer reduzierten Insulinsensitivität in Verbindung steht (75). T<sub>H</sub>17-Zellen im Fett haben sowohl einen hemmenden Einfluss auf die Adipogenese als auch auf die Entwicklung von Insulinresistenz und Adipositas im Mausmodell (76).

### **CD4<sup>+</sup> Zellen bei Morbus Crohn**

Im Rahmen der intestinalen Entzündung bei Morbus Crohn ging man lange von einer überwiegenden T<sub>H</sub>1-Antwort gegenüber der T<sub>H</sub>2-Antwort aus (77). Es hat sich jedoch gezeigt, dass insbesondere T<sub>H</sub>17-Zellen in der entzündeten Mukosa akkumulieren, wobei sie sich in allen Wandschichten bis in die Submukosa ausbreiten und somit eine wichtige Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung der transmuralen intestinalen Entzündung spielen (73). Auch einige T<sub>H</sub>17-Zellen sind hier in der Lage, T<sub>H</sub>1-Zytokine wie IFN<sub>γ</sub> zu exprimieren und so selbst einen entzündungsfördernden Charakter anzunehmen, was unter dem lokalen Einfluss von IL-23 geschieht (78). Diese IL-17/IFN<sub>γ</sub>-koproduzierenden Zellen im Darm sind spezifisch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu finden (79). Zwischen T<sub>H</sub>17-Zellen und regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) besteht normalerweise ein Gleichgewicht, da diese aus der gleichen Vorläuferzelle je nach vorherrschendem Zytokinmilieu eine entgegengesetzte Differenzierung vollziehen, wobei dem Transkriptionsfaktor ROR<sub>γ</sub>t (*retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor-γ*t) eine entscheidende Bedeutung für die Differenzierung zu T<sub>H</sub>17-Zellen zukommt (80).

### **2.4.2 Zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup> Zellen)**

CD8-positive zytotoxische T-Zellen haben ihre Aufgabe in der Abtötung von intrazellulär infizierten Zellen (viral oder durch intrazelluläre Bakterien), sowie Zellen mit anderweitig pathologisch veränderter Proteinexpression (z.B. Tumorzellen). Dies gelingt durch die Interaktion ihres TCR mit Peptidantigenen der Körperzelle. Identifiziert eine zytotoxische T-Zelle eine solche pathologische Zelle, tötet sie sie entweder durch die Ausschüttung penetrierender und apoptoseinduzierender Stoffe wie Perforin und Granzym oder durch Zell-Zell-Interaktion über die Apoptose-Signalmoleküle FasLigand/Fas ab. (68)

#### **CD8<sup>+</sup> Zellen im gesunden und entzündeten Fettgewebe**

Im Rahmen der Fettgewebsinflammation spielen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Rolle als Initiatoren pro-inflammatorischer Prozesse, insbesondere bei der Anlockung von Makrophagen. Im Mausmodell konnte ein Umschwenken des CD4/CD8-Verhältnisses im epididymalen Fettgewebe mit Zunahme der Adipositas beobachtet werden (24).

#### **CD8<sup>+</sup> Zellen bei Morbus Crohn**

Im GI-Trakt sind CD8<sup>+</sup>-Zellen insbesondere als intraepitheliale Zellen in der Mukosa zu finden. Dort stehen sie in engem Kontakt mit luminalen Antigenen und angrenzenden Enterozyten und haben eine Rolle in der Aufrechterhaltung der mukosalen Integrität und der Regulation des lokalen Immunmilieus.

Andererseits existieren Studien, die zeigen, dass CD8<sup>+</sup>-Zellen an der initialen Entwicklung intestinaler Läsionen beteiligt sind und so wesentlich zur Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beitragen (81). Dabei wird CD8<sup>+</sup>-Zellen eine frühere Rolle in der intestinalen Entzündung zugesprochen als beispielsweise pro-inflammatorischen CD4<sup>+</sup>-Zellen, die möglicherweise erst auf den Reiz einer bakteriellen Translokation hin angelockt oder aktiviert werden.

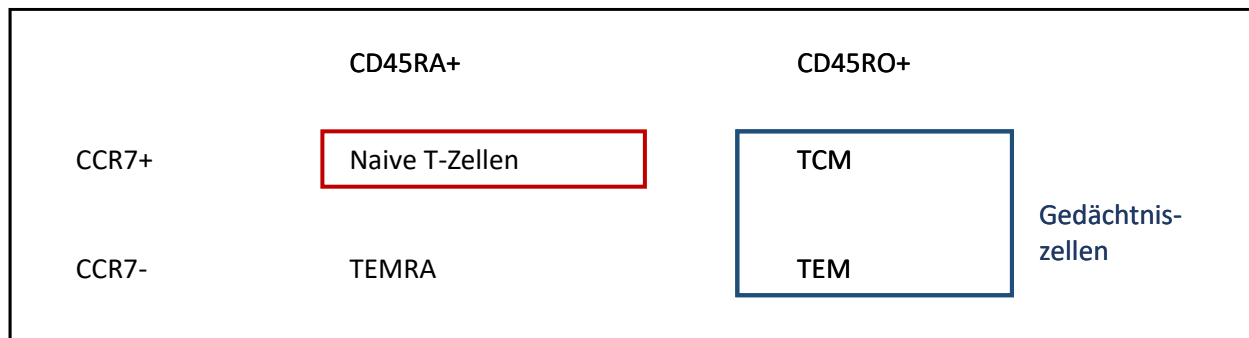
### 2.4.3 T-Gedächtniszellen

Je nachdem, ob eine T-Zelle bereits Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatte oder nicht, wird sie als naive oder Effektor-T-Zelle klassifiziert. T-Zellen können eine Gedächtnisfunktion ausüben und so bei einem zweiten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen prompt eine schnelle Abwehrreaktion gewährleisten.

Der Pan-Leukozytenmarker CD45 existiert in verschiedenen Isoformen (CD45RA, CD45RO), welche den Gedächtnis- oder Aktivierungszustand der Zelle widerspiegeln (82). Naive T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>) pendeln bis zu ihrer Aktivierung durch Antigenpräsentation zwischen Blut und lymphatischen Geweben hin und her, was ihnen die Expression spezifischer Homing-Rezeptoren (z.B. C-C-Chemokinrezeptor-7 = CCR7) ermöglicht. Eine Aktivierung dieser Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen im Lymphfollikel geht in der Regel mit einem Verlust dieses Markers einher. Es handelt sich dann um Effektorzellen, die an den Ort der Infektion zurückkehren und dort eine Immunantwort gegen ihr jeweiliges spezifisches Antigen bewirken. Einfache Effektorzellen (T<sub>EFF</sub>, CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RO<sup>-</sup>) verbleiben am Ort der Inflammation und gehen dort, nachdem ihre Funktion erfüllt ist, zugrunde.

Im Gegensatz dazu gehen Gedächtniszellen (CD45RO<sup>+</sup>) nach ihrem ersten Antigenkontakt nicht zugrunde, sondern stehen für weitere Immunreaktionen zur Verfügung. Je nach verbliebener Expression von CCR7 kann man zwischen Effektor-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub> = *effector memory*) und den zentralen Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub> = *central memory*) unterscheiden (siehe **Abbildung 3**). T<sub>EM</sub>-Zellen verbleiben in dem Gewebe, in dem der letzte Antigenkontakt stattgefunden hat und sorgen vor Ort für eine Aufrechterhaltung der spezifischen Immunantwort oder bekämpfen erneute Infektionen. T<sub>CM</sub>-Zellen verweilen in den drainierenden Lymphknoten und können im Falle eines zweiten Antigenkontakts schnell proliferieren und umgehend als Effektorzellen agieren (83).

Erst kürzlich wurde beim Menschen eine Unterform von CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert – die T<sub>EMRA</sub>-Gruppe (T *effector memory* mit CD45RA-Expression). Sie stellt die am weitesten differenzierte Gruppe der Gedächtniszellen dar, deren Funktion bisher nicht vollständig geklärt ist (84).



**Abbildung 3.** Oberflächenantigene von naiven und Gedächtnis-T-Zellen, modifiziert nach Sallusto 1999 (83). Abkürzungen: C-C-Chemokinrezeptor-7 (CCR-7), *effector memory* T-Zellen mit CD45RA-Expression (TEMRA), *central memory* T-Zellen ( $T_{CM}$ ), *effector memory* T-Zellen ( $T_{EM}$ ).

#### 2.4.4 Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ )

Im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen Helferzellen  $T_H1/ T_H17$  sind regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) an der Eindämmung und Verhinderung ungewollter Immunreaktionen, zum Beispiel gegen Autoantigene, beteiligt. Dies geschieht durch verschiedenste Mechanismen, beispielsweise der Ausschüttung von IL-10 (85) und TGF $\beta$ , sowie durch Zell-Zell-Kontakt vermittelte Suppression und Anergie von Effektorzellen (86).  $T_{reg}$  und  $T_H17$ -Zellen sind entgegengesetzt reguliert, so wie auch  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen sich gegenseitig hemmen und ein Gleichgewicht bilden (87).  $T_{reg}$ -Zellen stellen eine kleine Gruppe CD4-positiver Zellen dar, die sich entweder als distinkte Zelllinie im Thymus entwickeln (natürliche  $T_{reg} = nT_{reg}$ ) oder erst peripher induziert werden (induzierte  $T_{reg} = iT_{reg}$ ). Sie können über den Oberflächenmarker CD25 (IL-2-Rezeptor  $\alpha$ ) charakterisiert werden und sind durch das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors *forkhead-box-protein-P3* (FoxP3) in ihrem Zellkern definiert, welcher die regulatorischen Eigenschaften dieser Zellen vermittelt (88).

#### $T_{regs}$ im gesunden und entzündeten Fettgewebe

In murinem weißen Fettgewebe konnten  $T_{regs}$  in größerem Maße gefunden werden als in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben der Maus (5). Diese  $T_{reg}$ -Population war kleiner in adipösen Mäusen (5, 89). In einer späteren Studie zeigte sich hingegen eine vermehrte mRNA-Expression von FoxP3 bei adipösen Mäusen (90). In bisherigen Studien mit humanen Fettgewebe wurde kein Unterschied zwischen viszeralem und subkutanem Fettgewebe festgestellt (91).

Eine Akkumulation regulatorischer T-Zellen im Fettgewebe führte zu einer Verbesserung metabolischer Auswirkungen der Adipositas im Mausmodell, was für

einen protektiven Effekt dieser Zellen im Rahmen einer Fettgewebshypertrophie spricht (92).

### **T<sub>regs</sub> bei Morbus Crohn**

Obwohl man aufgrund der immunsuppressiven Eigenschaften der T<sub>regs</sub> von einer Verminderung dieser Zellen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen ausgeht, sind T<sub>regs</sub> bei Patienten mit Morbus Crohn paradoxerweise vermehrt in der Lamina propria zu finden (93). Trotz der vorliegenden chronischen Entzündung sind diese Zellen nicht in ihrer Funktion eingeschränkt, sondern zeigen sogar erhöhte Aktivitätsparameter im Vergleich mit T<sub>regs</sub> in gesundem Gewebe (94). Eine gestörte Interaktion mit Effektorzellen erscheint möglich, eine Resistenz von T<sub>H</sub>17-Zellen gegenüber diesen regulatorischen T-Zellen könnte eine Ursache für die ausbleibende regulatorische Aktivität sein (95). Hierzu ist jedoch noch kein genauer Pathomechanismus bekannt. Bisher wird die erhöhte T<sub>reg</sub>-Aktivität als Gegenregulation zur chronischen Inflammation interpretiert, welche jedoch aus noch unbekanntem Gründen nicht kontrolliert werden kann (94). Diskutiert wird unter anderem ein Defekt des IL-10 Rezeptors, wodurch die Zielzellen, wie beispielsweise T<sub>H</sub>1-Zellen, nicht in ihrer pro-inflammatorischen Zytokinexpression reguliert werden (96).

#### **2.4.5 TCR- $\gamma\delta$ -Zellen**

T-Zellen erkennen ihre spezifischen Antigene über ihren TCR, der in zwei verschiedenen Isoformen auftritt: ca. 90% der T-Zellen exprimieren den TCR $\alpha\beta$ , aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, während nur ein kleiner Teil (variabel je nach Gewebe 0,5% bis 15% der T-Lymphozyten) den rekombinanten TC-Rezeptor aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette aufweist (97). Die Zellen mit TCR $\gamma\delta$ -Rezeptor sind häufig hinsichtlich CD4 und CD8 doppelt negativ (98) und erkennen Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen auf nicht-klassischem Wege präsentiert werden (99, 100).

TCR $\gamma\delta$ -Zellen, die beim Menschen einen nur geringen Anteil an peripheren T-Zellen bilden, sind in der intestinalen Mukosa verhältnismäßig häufiger lokalisiert. Insbesondere intraepitheliale Lymphozyten, die sich zwischen Enterozyten in das Darmepithel einreihen, sind im Dünndarm in 5-15% und im Colon bis zu 40% TCR $\gamma\delta$ -Zellen (101). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr pathogener Keime und reagieren bei Erstkontakt mit pathogenen Erregern besonders schnell (102). Zudem sind sie in besonderem Maße an der Aufrechterhaltung der Integrität des intestinalen Epithels beteiligt, indem sie geschädigte Zellen erkennen und neben ihren pro-inflammatorischen Funktionen auch immuninhibierend wirken können (101).

#### **TCR- $\gamma\delta$ -Zellen im gesunden und entzündeten Fettgewebe**

Bezüglich des Vorkommens von TCR $\gamma\delta$ -Zellen im humanen Fettgewebe existieren bislang keine Daten. Im Mausmodell wurde ein Anstieg von TCR $\gamma\delta$ -Zellen mit pro-inflammatorischem Phänotyp im Fettgewebe nach fettreicher Ernährung festgestellt (103).

#### **TCR- $\gamma\delta$ -Zellen bei Morbus Crohn**

In entzündeten Darmabschnitten bei Morbus Crohn sind TCR $\gamma\delta$ -Zellen vermehrt, ihre Verteilung im Gewebe ist verändert (nicht nur im Epithel, auch in der Lamina propria) und ihre Zytokinexpression zugunsten pro-inflammatorischer Zytokine (insbesondere IFN $\gamma$ ) verschoben (104).



#### **2.4.6 Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen)**

Eine weitere Untergruppe der T-Zellen, die nur in geringer Anzahl vorkommt (um 1%), sind die sogenannten natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen). Diese zeigen typische Oberflächenmarker natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), wie z.B. CD16, CD161 und CD56, bei gleichzeitiger Expression des T-Zell-Markers CD3. NKT-Zellen stellen somit eine Verbindung des angeborenen (natürliche Killerzellen) mit dem erworbenen (T-Zellen) Immunsystem dar.

Es gibt zwei Gruppen von NKT-Zellen: Typ I NKT-Zellen (auch iNKTs = invariant NKTs) zeichnen sich durch ihren speziellen T-Zell-Rezeptor (beim Menschen TCRV $\alpha$ 24Ja18) aus, mit dem sie in der Lage sind, Lipid-Antigene zu erkennen. Typ II-NKT-Zellen sind weniger gut verstanden und zeigen eine höhere Variabilität an T-Zell-Rezeptoren. Außerdem reagieren sie nicht auf die von CD1d präsentierte Lipid-Antigene und konnten somit in der Forschung bisher kaum erfasst werden (105). NKT-Zellen zeichnen sich durch die außergewöhnliche Eigenschaft aus, nach Stimulation schnell sowohl T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>2-zugehörige Zytokine zu produzieren (106). Dieses duale Verhalten spiegelt sich auch in ihren Effektorfunktionen wider, da sie sowohl in der Lage sind, immunologische Prozesse zu stimulieren als auch zu inhibieren.

#### **NKT-Zellen im gesunden und entzündeten Fettgewebe**

Durch ihre Affinität zu Lipid-Antigenen sind NKT-Zellen auch im Fettgewebe angesiedelt. Sie sind in normalem Fettgewebe an der Prävention von Adipozytendysfunktion und Insulinresistenz beteiligt (107). Allerdings kommt es zu einer abnehmenden NKT-Zellinfiltration bei steigendem Übergewicht (108), wodurch dieser Effekt nicht mehr zum Tragen kommt.

#### **NKT-Zellen bei Morbus Crohn**

Sowohl Typ I als auch Typ II NKT-Zellen kommen in der gesunden Mukosa vor, wo sie an der Modulation von Immunantworten beteiligt sind (105). Bei Morbus Crohn kommt es zu einer Abnahme der Anzahl der NKT-Zellen in der Mukosa, wobei die genaue Funktion dieser Zellen in der Pathogenese des Morbus Crohn weiterhin als komplex erachtet wird (105).

#### 2.4.7 Rezeptor-vermitteltes Darm-spezifisches *homing* von T-Zellen

In den letzten Jahren lag das Augenmerk der Forschung insbesondere auf der Frage, wie es zur Anreicherung der Lymphozyten bei der intestinalen Entzündung, vor allem im Rahmen von CED, kommt. Man weiß, dass spezifische Oberflächenmoleküle des Gefäßendothels aus der Gruppe der Integrine für die Lymphozytenadhäsion von zentraler Bedeutung sind. Mithilfe dieser heterodimeren Moleküle interagieren auch im Blut zirkulierende T-Zellen, worüber eine Extravasation in das jeweilige Zielgewebe vermittelt wird (109). Dieser Vorgang wird *homing* genannt (aus dem Englischen *to home* = anzielen, anpeilen). In den vergangenen Jahren konnte für zwei Integrine eine Schlüsselrolle für das darmspezifische *homing* von Immunzellen nachgewiesen werden: Die Integrine  $\alpha 4\beta 7$  und  $\alpha E\beta 7$ . Obwohl sich diese nur in ihrer alpha-Untereinheit unterscheiden, zeigen sie eine unterschiedliche Funktion: Das Integrin  $\alpha 4\beta 7$  interagiert mit dem spezifisch auf den Endothelzellen hochendothelialer Venulen (HEV) des Darms exprimierten Molekül *MAd-Cam-1* und sorgt so für einen Übertritt von Immunzellen aus der Blutbahn in das intestinale MALT (110). Hingegen interagiert das Integrin  $\alpha E\beta 7$  mit dem auf Darmepithelzellen exprimierten *E-Cadherin* und bewirkt dort einen Verbleib der Zellen, weshalb es auf dem Großteil der intraepithelialen Lymphozyten zu finden ist (111). Die Interaktion des Integrins  $\alpha 4\beta 7$  mit seinem spezifischen Bindungspartner bewirkt sowohl das *homing* in normales MALT als auch in entzündete Darmabschnitte im Rahmen von CED. Bei diesen Erkrankungen kommt es zu einer verstärkten Expression von *MadCam-1* in den HEV in entzündeten Arealen (112), wobei beim Morbus Crohn im Vergleich zur Colitis ulcerosa eine stärkere und vor allem transmural ausgedehnte Hochregulierung dieses Moleküls erfolgt. Die Bedeutung des Integrins  $\alpha 4\beta 7$  für die Initiierung intestinaler Inflammation zeigt sich auch in deren Nutzung als Therapietarget, aktuell in der Entwicklung und Erprobung neuer humanisierter Antikörper (Vedolizumab gegen  $\alpha 4\beta 7$ , Etrolizumab gegen  $\beta 7$ , MAd-Cam-Antagonisten) (113).

## 2.5 Fragestellung

In dieser Arbeit werden verschiedene Fettgewebekompartimente bei Patienten mit Adipositas *per magna* sowie Patienten mit CED hinsichtlich ihrer T-Zell-Infiltration charakterisiert. Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Adipositas:
  - a) Hinsichtlich der Unterschiede in der T-Zell-Infiltration zwischen subkutanem und viszeralem Fettgewebe existieren schon Vordaten. Wie ist das T-Zell-Milieu in dieser Stichprobe?
  - b) Welche Darm-assoziierten Integrine exprimieren die im Fett ansässigen T-Zellen?
2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen:
  - a) Bezüglich der T-Zell-Infiltration der Mukosa bei CED existieren bereits Vordaten. Wie ist die Infiltration von T-Zellen in dieser Stichprobe und wie unterscheiden sich die Subpopulationen von denen des benachbarten Fettgewebes?
  - b) Bezüglich der T-Zell-Infiltration des mesenterialen Fettgewebes bei CED existieren bislang keine Daten. Unterscheiden sich die Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums von dem von Patienten mit Morbus Crohn des Colons und Patienten mit Colitis ulcerosa?
  - c) Welche Funktion im Hinblick auf die angrenzende Entzündung könnten die T-Zellen im *creeping fat* haben? Sind die im mesenterialen und mesocolischen Fettgewebe ansässigen T-Zellen über die Expression spezifischer Integrine zum *homing* in den Darm fähig?
  - d) Welche Korrelationen zeigen sich zwischen der Fettgewebsinflammation und klinischen Parametern der Patienten mit Morbus Crohn?
3. Vergleich von viszeralem Fett bei Adipositas und *creeping fat* bei Morbus Crohn:
  - a) Wie unterscheiden sich das viszerale Fettgewebe bei Adipositas und das *creeping fat* bei Patienten mit Morbus Crohn hinsichtlich der Immunzellinfiltration und welche funktionellen Implikationen könnten die zellulären Milieus haben?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### Chemikalien, Pufferlösungen, Medien und Kits

Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Sévres, France
Brefeldin A 5mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o $\text{CaCl}_2$ /w/o $\text{MgCl}_2$	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Fötale Kälberserum (FCS)	Linaris, München, DE
FoxP3/Transcription Factor Fixation Kit(Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent)	eBioscience, San Diego, USA
FoxP3 Fixierungs-Puffer	Fixation/Permeabilization, <i>Concentrate</i> und <i>Diluent</i> im Verhältnis 1:4
FoxP3 Permeabilisierungs-Puffer	<i>Diluent</i> mit $\text{H}_2\text{O}$ (Ampuwa) im Verhältnis 1:10
Ionomycin Calcium-Salz 1mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich
Kollagenase II aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich
MACS ( <i>magnetic activated cell sorting</i> ) -Puffer	450 ml PBS 50 ml BSA (bovines Serumalbumin) 5% ± 2mM EDTA
Monensin Natrium-Salz 30mM in 100% EtOH	Sigma-Aldrich
OneComp eBeads	eBioscience
PBS	11,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 2 g KCl auf 10 L mit <i>Aqua dest.</i> pH 6,5–7,0
Penicillin 5000 U/ml, Streptomycin 5000 µg/ml	Life Technologies

PMA 1mg/ml in DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
RPMI1640 w/o HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypanblau, 0,5% (w/v) in physiologischer Kochsalzlösung	Biochrom, Berlin, DE
T-Zell-Komplettmedium	RPMI1640 mit Phenolrot 10 % FCS 1000 U/ml Penicillin 1 mg/ml Streptomycin

### Primäre Antikörper

Antigen (alle anti-human)	Klon	Fluorophor	Konzentration	Hersteller
CD3	UCHT1	PerCP/Cy5.5	1:100	BioLegend, San Diego, USA
CD3	HIT3a	PE	1:100	BioLegend
CD4	RPA-T4	Brilliant Violet 510™	1:100	BioLegend
CD8a	RPA-T8	FITC	1:100	BioLegend
CD25	M-A251	Brilliant Violet 421™	1:100	BioLegend
CD39	A1	PE/Cy7	1:100	BioLegend
CD45	H130	APC/Cy7	1:125	BioLegend
CD45RA	H100	PE/Cy7	1:110	BioLegend
CD45RO	UCHL1	PerCP/Cy5.5	1:110	BioLegend
CD56	HCD56	Brilliant Violet 421™	1:100	BioLegend
CD69	FN50	APC	1:110	BioLegend
CD103 (Integrin $\alpha$ E)	Ber-ACT8	PE	1:100	BioLegend
CD127	A019D5	APC	1:100	BioLegend

CD161	HP-3G10	PerCP/Cy5.5	1:100	BioLegend
CD194 (CCR4)	L291H4	PE	1:100	BioLegend
CD196 (CCR6)	G034E3	PE/Cy7	1:100	BioLegend
CD197 (CCR7)	G043E3	Brilliant Violet 421™	1:100	BioLegend
CCR9	L053E8	APC	1:100	BioLegend
TCR $\gamma\delta$	B1	Brilliant Violet 421™	1:60	BD Pharmingen San Diego, USA
TCR $\gamma\delta$	11F2	PE/Cy7	1:20	BD Pharmingen
TCRV $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18	6B11	APC	1:100	BioLegend
FoxP3	206D	AlexaFluor488	1:100	BioLegend
FoxP3	PCH101	AlexaFluor488	1:50	eBioscience, San Diego, USA
IFN $\gamma$	4S.B3	FITC	1:100	BioLegend
IL-4	MP4-25D2	PE	1:100	BioLegend
IL-17A	BL168	Brilliant Violet 421™	1:100	BioLegend
Integrin $\alpha$ 4	9F10	PE/Cy7	1:100	BioLegend
Integrin $\beta$ 7	FIB504	APC	1:100	BioLegend

**Primärantikörper für Immunhistochemie:**

anti-human CD4 (Klon 4B12, Novocastra reagents, Leica, Wetzlar, DE),

anti-human CD8 (Klon C8/144B, Dako, Glostrup, Dänemark),

anti-CD3 $\epsilon$  (polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, anti-human, IR #5036 1-2)

## Technische Materialien und Geräte

Analysenwaage; BP210D	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav; Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Axiolmager Z1, Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast	Zeiss, Berlin, DE
Begasungsbrutschrank; Heraecell 150	Heraeus, Hanau, DE
Durchflusszytometer; FACS Canto <sup>TM</sup> II mit Software FACS Diva <sup>TM</sup> (Version 6.1.3)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Einmalspritze 5 ml (Spritzenstempel)	Braun, Melsungen, DE
Eisbereiter, AF100	Scotsman, Bettolino di Poliano, Italien (IT)
FACS ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )-Röhrchen 5ml mit <i>cell strainer</i> Aufsatz	Corning®, Sigma-Aldrich
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Biberach, DE
Kühlzentrifuge; Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Kühlzentrifuge; Heraeus Multifuge 1S-R	Fisher Scientific, Schwerte, DE
Mixer; Vortex Reax 2000	Heidolph, München, DE
Petrischale	Nunclon, Roskilde, Denmark
Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom; Herasafe 1.8	Kendro, Langenselbold, DE
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, DE
Tiefkühlschrank -80 °C	SANYO Component Europe GmbH, München, DE
Wasserbad, Isotemp 210	Fisher Scientific, DE
Zählkammer: Neubauer <i>Improved</i>	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Zellkulturplatte: 6-Well, Flachboden	Sigma-Aldrich
Zellsieb <i>cell strainer</i> 40 µm, 100 µm	Corning®, Sigma-Aldrich

## **3.2 Gewinnung, Isolation und Färbung von T-Zellen aus Gewebeproben**

### **3.2.1 Patienteneinschluss und Entnahme der Gewebeproben**

In die Adipositas-Gruppe wurden Patienten über 18 Jahre mit einem BMI von über 40 eingeschlossen. Bei diesen Patienten wurden intraoperativ viszerale und subkutane Fettgewebeproben im Rahmen von Sleeve-Magen- oder Magen-Bypass-Operationen entnommen (Zentrum für Adipositas und Metabolische Chirurgie, Chirurgische Klinik, Charité Campus Mitte).

In die CED-Gruppe wurden Patienten über 18 Jahre mit endoskopisch gesichertem Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa eingeschlossen. Alle Proben wurden im Rahmen krankheitsbezogener operativer Eingriffe gewonnen. Es handelte sich entweder um Darmsegmentresektionen, Ileozökalresektionen oder Kolektomien (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Charité Campus Benjamin Franklin). Patienten mit gesicherten oder vermuteten malignen Darmveränderungen wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Die Probenentnahme (mesenteriales/mesocolisches Fettgewebe sowie Mukosa) erfolgte unmittelbar nach der Resektion des Präparats, anschließend wurden die Proben in Kulturmedium transportiert.

Alle Patienten erteilten vor dem Eingriff ihre schriftliche Einwilligung zur Studie. Für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche lag eine Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor (Antragsnummer: EA4/089/14).

### **3.2.2 Histopathologie/ Immunhistologie**

Ein Teil des entnommenen Gewebes wurde unmittelbar in 4%iger Formalinlösung zur späteren histologischen Begutachtung fixiert, während der andere Teil unfixiert zur Isolation mononukleärer Zellen verwendet wurde (siehe Abschnitt 2.4.3).

Nach der Fixierung über Nacht wurden die Proben zur Aufbewahrung in Paraffin (Histosec<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, DE) eingebettet. Es wurden 1-2 µm dünne Schnitte angefertigt.

Um die durch die Paraffineinbettung demaskierten Antigene der Färbung zugänglich zu machen, wurden die Schnitte mit Xylollösung (10%) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe sowie *Aqua dest.* gewässert, um die Färbung mit



hydrophilen Antikörpern zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Demaskierung der Antigene mittels Hitzeinduktion (*heat-induced-epitope-retrieval*) für 5 Minuten in Zitratpuffer (100 µM, pH 6) unter Dampfdruck. Darauf folgend wurden unspezifische Epitope durch die Inkubation mit 100 µl Eselserum (für 30 Minuten bei Raumtemperatur) reduziert.

Die Färbung erfolgte mithilfe von antigenspezifischen Primärantikörpern (siehe Materialien) sowie einem unspezifischen, biotinylierten Sekundärantikörper, welcher zur Detektion der Primärantikörper eingesetzt wurde.

Die Färbung mukosaler T-Zellen erfolgte mittels primärer Antikörper, wobei diese durch das Opal 4-Color Automation Immunohistochemistry Kit detektiert wurden (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Die Auszählung erfolgte manuell und im Rahmen von multispektralen Färbungen mithilfe des Vectra<sup>®</sup>3 Systems (Perkin Elmer). Positive Zellen wurden pro 5 *high power fields* (HPF, Gesichtsfeld in 400facher Vergrößerung) ausgezählt. Dabei wurde eine Verblindung der Probengruppen durchgeführt.

Die Abschätzung der Fettgewebsfibrosierung erfolgte mithilfe einer Elastica van Gieson-Färbung.

Die allgemeine Immunezellinfiltration wurde mithilfe des ATIS-Scores (ATIS= adipose tissue infiltration score, entwickelt durch Frau PD Dr. Anja Kühl) evaluiert. Nach diesem Score gliederte sich die Einteilung in fünf Kategorien (1: fokale, minimale Infiltration; 2: multifokale, minimale Infiltration; 3: milde und multifokale Infiltration; 4: moderate und multifokale Infiltration; 5: schwere Infiltration).

### **3.2.3 Isolation mononukleärer Zellen aus dem Fettgewebe**

Die Isolation von Zellen aus dem Fettgewebe erfolgte nach Lagerung des Gewebes über Nacht (mindestens sieben Stunden) in Kulturmedium (RPMI1640 w/o HEPES, 10%FCS, Penicillin, Streptomycin) bei 37 °C. Zur Zellisolation wurde das Gewebe zunächst mithilfe einer Zellkulturschale und einem Skalpell von größeren Gefäßen befreit und zerkleinert. Dann erfolgte ein enzymatischer Verdau in 14 ml Kulturmedium mit 1-1,5 mg/ml Kollagenase II für 30 bis maximal 40 Minuten bei 37 °C in einem Schüttler. Anschließend wurde der Gewebsbrei mit der rauen Seite eines

Spritzenstempels unter Hinzugabe von 15 ml Kulturmedium über einen 100 µm Zellsieb gerieben und die Zelllösung bei 279xg für 10 Minuten zentrifugiert (bei 20 °C, um das Aushärten der Fettschicht zu vermeiden).

Nach der Abnahme des Adipozytenrings mit einer Pasteurpipette und einem Waschschrift mit Medium (394xg, 4 °C) wurden pro Probe 2 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 2 Minuten auf das aufgelockerte Pellet gegeben.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die isolierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt (nach 1:2 Verdünnung mit Trypanblau, Zählung vitaler Zellen in Neubauer Zählkammer) und in jeweils 1 ml Kulturmedium auf FACS-Röhrchen verteilt. Um eine aussagekräftige Messung zu gewährleisten wurden mindestens  $2 \times 10^5$  Zellen pro Färbung angesetzt, für die Stimulationsfärbung wurde eine Mindestanzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen festgelegt.

#### **3.2.4 Isolation mononukleärer Zellen aus entzündlich veränderter Darmmukosa**

Die Isolation von Zellen aus der intestinalen Mukosa erfolgte im direkten Anschluss an die Probengewinnung, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass diese Zellen, im Gegensatz zu den im Fett ansässigen Zellen, nach einer Kultur über Nacht zu einem Großteil avital waren. Aus dem gleichen Grund konnte hier keine enzymatische Extraktion der Zellen durchgeführt werden. Das Gewebe wurde mithilfe einer Zellkulturschale und einem Skalpell fein zerkleinert (2-5 mm) und die Zellen mechanisch durch das Reiben mit einem Spritzenstempel über einen 100 µm Zellsieb unter Nachspülen mit 15 ml Kulturmedium isoliert. Anschließend erfolgte eine Trennung der Zellen durch ein 40 µm Zellsieb.

Die entstandene Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 495xg und mit verringerter Bremse zentrifugiert, um das Auflockern des Pellets zu verhindern (abgewandeltes Protokoll mit freundlicher Genehmigung von Dr. Anna-Maria Globig, Universitätsklinikum Freiburg).

Nach der Aufnahme der Zellen in Kulturmedium und Zählung unter dem Mikroskop wurden die Zellen ebenfalls in jeweils 1 ml Kulturmedium auf FACS-Röhrchen verteilt.

### 3.2.5 T-Zell-Stimulation

Eine Aktivierung von T-Zellen *in vivo* mit nachfolgender Zytokinproduktion geschieht über die Interaktion von Oberflächenmolekülen mit spezifischen Liganden, wodurch intrazelluläre Signalwege initiiert werden. Beispielsweise kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die eine Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-tri-phosphat (IP<sub>3</sub>) bewirkt. DAG wiederum aktiviert als *second messenger* allosterisch die Proteinkinase C (PKC), welche für einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration sorgt, die letztendlich in der Aktivierung verschiedenster Signalwege der Zelle resultiert und zur Ausschüttung von Zytokinen führt.(114)

Substanzen, die für die *in vitro*-Stimulation von T-Zellen verwendet werden -Ionomycin und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) - greifen in genau diesen Signalweg ein. PMA hat eine ähnliche Struktur wie DAG und kann daher ebenfalls die PKC aktivieren. Das Calcium-Ionophor Ionomycin induziert die Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden und initiiert so den beschriebenen Signalweg. Außerdem zeigt es eine verstärkende Wirkung auf die Aktivierung der PKC und wirkt so synergistisch mit PMA. (115)

Die Zellproben, für die eine intrazelluläre Zytokinfärbung vorgesehen war, wurden unter Hinzugabe von 20 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inhibierung des Golgi-Apparats durch die Hinzugabe von 10 µg/ml Brefeldin und 0,7 µl/ml Monensin (GolgiSTOP™ von BD) und eine weitere Inkubation von drei Stunden. Durch die daraus resultierende Inhibierung des intrazellulären Transports von neu synthetisierten Proteinen an die Zelloberfläche konnte erreicht werden, dass die individuell produzierten Zytokine für eine Färbung im Zytoplasma der T-Zellen angereichert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit kaltem MACS-Puffer gewaschen.

### 3.2.6 Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung

Die Färbung mit Antikörpern erfolgte in fünf verschiedenen Ansätzen, die sich wie in **Tabelle 1** gezeigt zusammensetzten. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern geschah in MACS-Puffer bei 37 °C (wenn Antikörper gegen Chemokinrezeptoren im Panel waren: Panel 1,2 und 4) oder auf Eis (Panel 3.1, 3.2 und 5) für 25 Minuten. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit dem FoxP3-Fixation Kit (eBioscience) für 45

Minuten bei 4 °C fixiert. Der formaldehydhaltige Puffer führt zu einer Permeabilisierung der Zellen. Durch das anschließende Waschen mit dem Perm-Puffer können die entstandenen Poren offen gehalten werden, wodurch die intrazellulären Antikörper in das Zellinnere gelangten. Nach dem ersten Waschschrift wurden die fixierten Zellen über Nacht gelagert. Das Waschen erfolgte bei Oberflächenpanels (Panel 2, 3.1, 3.2, und 5) mit MACS-Puffer, da diese anschließend nicht intrazellulär gefärbt wurden, bei intrazellulär zu färbenden Panels (Panel 1, 4) mit dem Perm-Puffer aus dem FoxP3-FixationKit.

Die intrazelluläre Färbung erfolgte nach dem zweiten Waschschrift und wurde in 50 µl PermPuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend zur Analyse am Durchflusszytometer in 100 µl MACS-Puffer aufgenommen.

Fluoreszenzfarbstoffe	Panel 1* T <sub>H</sub> -Zellen	Panel 2 T-Memory	Panel 3.1 TCR $\gamma\delta$ , NKT	Panel 3.2° TCR $\gamma\delta$ , $\alpha 4\beta 7$	Panel 4 T <sub>reg</sub>	Panel 5 NKT
FITC	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	CD8	CD8	CD8	<b>FoxP3</b>	CD8
PE	<b>IL-4</b>	CD103	CD1d	CD103	CCR4	CD3
PerCPCy5.5	CD3	CD45RO	CD3	CD3	CD3	CD161
PE-Cy7	CCR6	CD45RA	TCR $\gamma\delta$	Integrin $\alpha 4$	CD39	CD39
APC	CCR9	CD69	TCRV $\alpha 24$	Integrin $\beta 7$	CD127	TCRV $\alpha 24$
APC-Cy7	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
BV421	<b>IL-17A</b>	CCR7	CD56	TCR $\gamma\delta$	CD25	CD56
BV510	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4

**Tabelle 1.** Zusammensetzung der Antikörper-Panel zur Zellfärbung für die Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Kombinationen der Antikörper in einem Färbepanel unter Berücksichtigung der Fluoreszenzfarbstoffe, die in jedem Panel nur jeweils einmal vorkommen können. **Abkürzungen:** T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen), T-Zell-Rezeptor (TCR), Natürliche-Killer-T-Zellen (NKT), regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>), Fluorescein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin Chlorophyll (PerCP), Cyanin (Cy), Allophycocyanin (APC), Brilliant Violet (BV), Interleukin (IL), Interferon (IFN).

**Erläuterung der Markierungen:**

\*Zellen wurden vor der Färbung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/Ionomycin stimuliert, °Erweiterung von Panel 3.1 ab dem 9.7.15 unter Auslagerung in neues Panel 5,

**Markierte Antikörper:** intrazelluläre Antikörper, Färbung erfolgte nach Fixierung und Permeabilisierung. Grau eingefärbte Markierungen: Antikörper wurden wegen unzureichender Populationsabgrenzung nicht in die finalen Auswertungen mit einbezogen.

### 3.3 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen anhand ihrer Oberflächeneigenschaften zu analysieren und zu zählen. Voraussetzung ist die Markierung der Zellen mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern, die von Lasern unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und von individuellen Detektoren auf ihre Lichtemission hin unterschieden werden können.

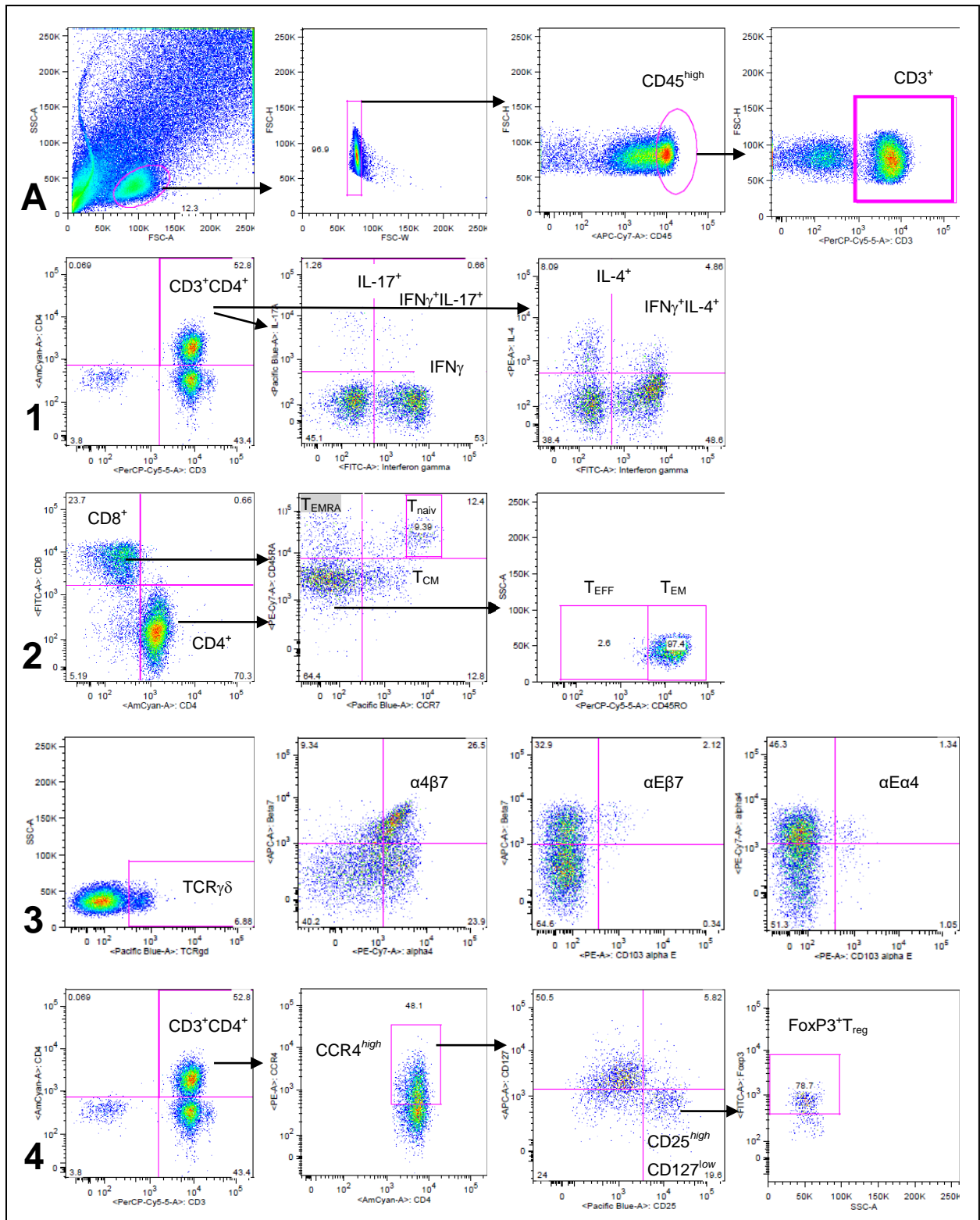
Die zu charakterisierenden Zellen (in Suspension vorliegend) werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom zu einem Einzelzellstrahl geformt, welcher anschließend die Laser passiert. Das Licht, das durch die Zellen gestreut wird, wird durch Detektoren erkannt und in elektrische Signale umgewandelt. Anhand der flachen Ablenkung des Lichtstrahls (*forward scatter* = FSC) an den einzelnen Zellen kann deren Größe, anhand der Reflexion des Lichtstrahls (*side scatter* = SSC) ihre Granularität gemessen werden.

Je nach individueller Expression von Oberflächenmolekülen unterscheiden sich die Zellen in ihrer Lichtemission nach Anregung durch den Laser. Durch das Vorschalten von Bandpassfiltern vor den Detektor ist es möglich, das emittierte Licht nach Wellenlängen aufzuteilen und so einzelne Antikörper voneinander zu unterscheiden. Jedes Gerät besitzt eine definierte Anzahl an Kanälen, die bestimmen, wie viele Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig detektiert werden können. Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer war das FACS Canto II (3-Laser, 8-Farben). Für die Überwachung des Messprozesses wurde die vorgesehene Standardsoftware FACS Diva™, für die anschließende Auswertung das Programm FlowJo™ Version 8.8.7 (LLC, Ashland, USA) verwendet.

Zur Auswertung der Rohdaten erfolgt ein *gating* der Zellgruppen anhand ihrer gemessenen Fluoreszenzemissionen. Dies bedeutet, dass man die Gesamtheit der Zellen hinsichtlich der einzelnen untersuchten Antikörper immer weiter aufteilt, sodass man letztendlich relative Anteile von Subpopulationen an der Gesamtzellpopulation erhält. Dazu werden die Daten in einem zweidimensionalen Koordinatensystem in Form eines *Dot-Plots* dargestellt, in dem man zwei Antikörperfluoreszenzen miteinander vergleicht und anschließend die Zellen ausgewählt, die die entsprechende Morphologie oder das gesuchte Expressionsmuster zeigen. Dies können einfach positive (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) oder auch mehrfach positive (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>) Zellen sein.

Das für diese Arbeit verwendete *gating* ist in **Abbildung 4** exemplarisch für alle gefärbten Panels dargestellt. Für die Charakterisierung der T-Zellen erfolgte zunächst die Abgrenzung der Lymphozyten von anderen im Fettgewebe vorkommenden Strukturen durch Größe (FSC) und Granularität (SSC) in Form der sich darstellenden Population (**Abb. 4 A**). Anschließend wurden die ausgewählten Zellen nach der Zellbreite (FSC-*width*) und der Zellhöhe (FSC-*height*) analysiert, um Dupletten (zwei Zellen, die aneinander haften und so größer erscheinen) von der Auswertung auszuschließen.

Es wurden nur Zellen betrachtet die  $CD45^{high}$  und  $CD3^+$  waren und somit der Gesamtpopulation an T-Lymphozyten entsprachen. Anschließend konnten (je nach verwendeten Antikörpern)  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen unterschieden und hinsichtlich ihrer Expressionsmuster getrennt betrachtet werden. Insgesamt erfolgte die Färbung von fünf Panels (Zusammenstellung von Antikörpern) mit jeweils acht verschiedenen Antikörpern. Diese wurden in Abschnitt 2.4.6 (**Tabelle 1**) dargestellt. Im T-Helferzell-Panel (Panel 1, **Abb. 4, 1**) wurden die verschiedenen Subgruppen wie folgt definiert:  $T_H1$ :  $CD3^+ CD4^+ IFN\gamma^+$ ,  $T_H2$ :  $CD3^+ CD4^+ IL-4^+$ ,  $T_H17$ :  $CD3^+ CD4^+ IL-17^+$ .  $IFN\gamma^+ IL-4^+$ -Zellen sowie  $IFN\gamma^+ IL-17^+$  - Zellen wurden als koexprimierende Zellen separat betrachtet. Im Gedächtnis-T-Zell-Panel ergaben sich folgende Subgruppen:  $T_{EM}$ :  $CD3^+ CCR7^- CD45RO^+$ ,  $T_{EFF}$ :  $CD3^+ CD45RA^- CCR7^- CD45RO^-$ ,  $T_{CM}$ :  $CD3^+ CD45RA^- CCR7^+$ ,  $T_{EMRA}$ :  $CD3^+ CD45RA^+ CCR7^-$ ,  $T_{naiv}$ :  $CD3^+ CD45RA^+ CCR7^+$  (**Abb. 4, 2**).  $TCR\gamma\delta$ -Zellen wurden durch die gleichzeitige Expression von CD3 und  $TCR\gamma\delta$  definiert, während die Expression der heterodimeren Integrine über die Koexpression der Untereinheiten Integrin  $\alpha4$ ,  $\alpha E$  und  $\beta7$  in verschiedenen Kombinationen untersucht wurde (**Abb. 4, 3**). Regulatorische T-Zellen wurden als  $CD3^+ CD4^+ CCR4^{high} CD25^{high} CD127^{low} FoxP3^{high}$  definiert (**Abb. 4, 4**). Zur Identifikation von NKT-Zellen diente neben dem T-Zell-Marker CD3 der NK-Marker CD56.



**Abbildung 4.** Gating-Strategie zur Auswertung durchflusszytometrischer Rohdaten. Gezeigt sind Punktwolken (*dot plots*), in denen jeder Punkt eine Zelle repräsentiert, die gemessen an ihrem Fluoreszenzverhalten im Koordinatensystem lokalisiert ist. Mithilfe von *gates* (rosa Kästen) wurde jeweils eine Zellpopulation eingegrenzt, die Beschriftung gibt die definierte Zellpopulation an. Die Pfeile markieren die Zellpopulation, die im jeweils nächsten Dot-Plot aufgetragen ist. **A** Basisgating für alle Panels. Die ermittelte  $CD45^{high}CD3^{+}$ -Population diente als Ausgangspopulation für die in **1-4** dargestellten spezifischen *gatings*. Alle nicht anderweitig durch Pfeile gekennzeichneten *dot plots* beinhalten ausschließlich diese Zellpopulation. **Abkürzungen:** *sideward scatter* (SSC), *forward scatter* (FSC), *area* (-A), *height* (-H), *width* (-W), *cluster of differentiation* (CD), Interleukin (IL), Interferon (IFN), *effector memory T-Zelle mit CD45RA-Expression* ( $T_{EMRA}$ ), *central memory T-Zelle* ( $T_{CM}$ ), *effector memory*

T-Zelle ( $T_{EM}$ ), Effektor-T-Zelle ( $T_{EFF}$ ), Natürliche Killer-T-Zelle (NKT), T-Zell-Rezeptor (TCR), C-C-Chemokinrezeptor (CCR), *forkhead-box-protein-P3* (FoxP3), regulatorische T-Zelle ( $T_{reg}$ ).

### 3.4 Cytometric Bead Array

Mithilfe des durchflusszytometrischen *Cytometric Bead Array* (CBA) lassen sich verschiedene Zytokine, Chemokine und andere lösliche Mediatoren quantitativ in einer Probe nachweisen. Für diese Arbeit wurden die Kulturüberstände der über Nacht gelagerten Fettgewebs-Proben auf inflammatorische Zytokine analysiert. Dies erfolgte mit dem BD<sup>TM</sup> Human Inflammatory Cytokines Kit, welches die gleichzeitige Detektion von IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  und IL-12p70 ermöglicht. Sogenannte *capture beads*, die an spezifische primäre Antikörper für je eines der sechs Zytokine gebunden sind, sind fluoreszenz-markiert und unterscheiden sich distinkt in ihrer Fluoreszenzintensität.

Je 17  $\mu$ l der aufgetauten Kulturüberstände wurden mit 17  $\mu$ l Capture Beads und 17  $\mu$ l Phycoerythrin (PE)-markierten Detektionsantikörpern für drei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 1 ml Waschpuffer (aus dem Kit) gewaschen und bei 200xg für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Beads resuspendiert und in 100  $\mu$ l Waschpuffer aufgenommen.

Bei der durchflusszytometrischen Messung wurde die Menge der in der Probe befindlichen Zytokine ermittelt und mit einer vorher erstellten Standard-Verdünnungsreihe verglichen, damit die Konzentration angegeben werden konnte.

Die markierten Zytokine wurden am FACS Canto II gemessen und ihre Konzentration mit der Software FCAP Array<sup>TM</sup>, Version 1.0.1 (BD<sup>TM</sup>) ausgewertet.



### 3.5 CED – Klassifikationen und Scores

Zur besseren Analyse der Patientengruppen wurden Informationen zur aktuellen Symptomatik und zum Krankheitsverlauf zusammengefasst und unter Zuhilfenahme von aktuellen Laborparametern in gängige Klassifikationen bzw. Aktivitätsindices umgewandelt. In der *Montreal* - Klassifikation chronisch entzündlicher Darmerkrankungen werden die Verlaufsformen des Morbus Crohn nach Alter, Lokalisation und Verhalten eingeteilt (116). Hiernach gibt es die Ausbreitungsformen terminale Ileitis, Colitis, Ileocolitis und Befall des oberen GI-Traktes. Beim Morbus Crohn kann man einen strikturierenden oder penetrierend/fistulierenden Krankheitsverlauf unterscheiden. Beide Formen können auch zusammen auftreten. In dieser Klassifikation hervorgehoben wird die perianal penetrierende und die nicht-strikturierend/ nicht-penetrierende Erkrankung aufgrund ihrer eigenen prognostischen Bedeutung. Die Colitis ulcerosa wird anhand ihrer Ausdehnung von der Minimalform der Proctitis ulcerosa bis zur maximalen Pancolitis ulcerosa klassifiziert.

**Tabelle 2** zeigt die Montreal-Klassifikationen für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

<b>Montreal -Klassifikation für Morbus Crohn</b>		<b>Montreal-Klassifikation für Colitis ulcerosa</b>	
<u>A (Age, Alter)</u>		<u>E (Extent, Ausdehnung)</u>	
A1	< 16 Jahre bei Erstdiagnose	E1	Proktitis ulcerosa
A2	17-40 Jahre bei Erstdiagnose	E2	Linksseitenkolitis
A3	> 40 Jahre bei Erstdiagnose	E3	Pancolitis ulcerosa
<u>L (Localization, Lokalisation)</u>			
L1	terminales Ileum		
L2	Colon		
L3	Ileocolon		
L4	isoliert oberer GI-Trakt		
<u>B (Behaviour, Verhalten)</u>			
B1	nicht strikturierend, nicht penetrierend		
B2	strikturierend		
B3	intern penetrierend		
B3p	perianal penetrierend		

**Tabelle 2.** Montreal Klassifikation, modifiziert nach Silverberg MS et al 2005 (116).

Die Krankheitsaktivität lässt sich durch die Berechnung eines klinischen Aktivitätsindex, dem *Crohn's disease activity index* (CDAI), einschätzen, in den verschiedene subjektive und objektive Krankheitssymptome einfließen (117) (**Tabelle 3**). In der verkürzten Variante, dem *Harvey-Bradshaw-Index* (HBI) werden nur die Hauptbeschwerdekriterien erfasst (118) (**Tabelle 4**).

### Crohn's disease activity index (CDAI)

Parameter	Anrechnungsfaktor
1. Anzahl ungeformter Stühle in einer Woche	x 2
2. Bauchschmerzintensität (0 - 3) als Summe der letzten Woche	x 5
3. Allgemeinbefinden (0 – 4) als Summe der letzten Woche	x 7
4. Anwesenheit von Komplikationen*	x 20
5. Symptomatische Durchfallbehandlung in der letzten Woche	x 30
6. Abdominelle Resistenz (0=keine, 2=unsicher, 5=sicher)	x 10
7. Abweichung des Hämatokrits (♀ = 42, ♂ = 47)	x 6
8. Abweichung vom Standardgewicht in %	x 1
<hr/>	
Summe: < 150	klinische Remission
≥ 150	Schub/ aktiver Krankheitsverlauf

\* Arthritis/Arthralgie, Iritis/Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Mundaphten, Analfissur/-fistel/-abszess, neue Fistel, Abszesse, Fieber über 37,8°C

**Tabelle 3.** *Crohn's disease activity index (CDAI)* modifiziert nach Best et al 1976 (117).

### Harvey Bradshaw Index (HBI)

Parameter	
1. Generelles Wohlbefinden (0 – 4)	
2. Bauchschmerzintensität (0 - 3)	
3. Anzahl der flüssigen Stuhlgänge	
4. Abdominelle Resistenz (0= nein, 1=fraglich, 2=sicher, 3=sicher und schmerzhaft)	
5. Anwesenheit von Komplikationen*	
<hr/>	
Summe: < 5	klinische Remission
≥ 5	Schub/ aktiver Krankheitsverlauf

\* Arthritis/Arthralgie, Iritis/Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Mundaphten, Analfissur/-fistel/-abszess, neue Fistel, Abszesse

**Tabelle 4.** *Harvey-Bradshaw-Index (HBI)*, modifiziert nach Harvey und Bradshaw 1980 (118).

### 3.6 Statistische Analyse

Da bei den erhobenen Daten nicht von einer Normalverteilung ausgegangen wurde, erfolgte die statistische Analyse mithilfe nicht-parametrischer Tests für unabhängige Stichproben. Der verwendete statistische Test war der Mann-Whitney-U-Test. Die Gruppen wurden als nicht-abhängig erklärt, da es sich einerseits um verschiedene Krankheitsentitäten handelte und andererseits innerhalb einer Patientengruppe methodenbedingt nicht immer bei Fettgewebe und Mukosa eines Patienten alle Färbungen durchgeführt werden konnten.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Korrelationsanalyse der ermittelten relativen Häufigkeiten von T-Zell-Subpopulationen im Fettgewebe mit klinischen Patientendaten erfolgte mithilfe der Spearman-Rangkorrelation, welche es ermöglicht signifikante Zusammenhänge zwischen zwei nicht-parametrischen Variablen zu testen. Hierbei wurden gezielt klinische Parameter ausgewählt, von denen ein Einfluss auf die Fettgewebsinflammation vermutet werden konnte (BMI, Erkrankungsdauer, Krankheitsaktivitätsindices).

Da in dieser Studie mehrere Patientengruppen hinsichtlich verschiedener Parameter verglichen wurden, musste das Problem des multiplen Testens bedacht werden. In dieser Arbeit geschah die statistische Untersuchung der Untergruppen jedoch nicht auf eine zufälligen Art (wobei alle Gruppen jeweils gegeneinander getestet werden) sondern es wurden vorab Hypothesen erstellt, die durch den statistischen Vergleich einzelner Untergruppen getestet wurden. Es wurden nur Gruppen statistisch miteinander verglichen, die entweder in Krankheitsentität übereinstimmten (Beispiel: mesenteriales Fettgewebe versus Mukosa bei CED-Patienten) oder bei denen es sich um einen hinsichtlich der Lokalisation vergleichbaren Gewebetyp handelte (Beispiel: viszerales Fettgewebe von Patienten mit Adipositas *per magna* versus mesenteriales Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn). So wurde beispielsweise das subkutane Fettgewebe von Patienten mit Adipositas *per magna* nur mit dem viszeralen Fettgewebe derselben Patientengruppe verglichen.

Zudem handelte es sich bei den untersuchten Zell-Subpopulationen nicht um unabhängige Testgrößen, da beispielsweise bei einem signifikanten Unterschied des

Anteils von CD4<sup>+</sup> Zellen zwischen zwei Gruppen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des CD8<sup>+</sup> Anteils ebenfalls wahrscheinlich ist.

Eine globale Anpassung des Signifikanzniveaus, beispielsweise im Rahmen einer Bonferroni-Korrektur, wurde daher nicht durchgeführt, um falsch negative Ergebnisse durch zu strenge Korrektur zu vermeiden (119).

Es bleibt anzumerken, dass aufgrund der Größe der Patientengruppen weitere Studien nötig sind, um die in dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen weitergehend zu bestätigen.

Die statistische Auswertung sowie die graphischen Darstellungen wurden angefertigt mit GraphPad Prism, Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. Die Korrelationsanalyse sowie die dazugehörigen Abbildungen wurden mittels IBM®SPSS® erstellt (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

Es konnten 24 Patientinnen und Patienten mit Morbus Crohn (MC), darunter 15 mit aktuellem Befall des Ileums (iMC) und 9 mit aktuellem Befall des Colons (cMC), sowie 10 Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und 13 Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi) in die vorliegende Arbeit eingeschlossen werden. Aufgrund geringer Probengröße oder Zellausbeute konnten nicht alle Versuche mit jeder Patientenprobe durchgeführt werden, sodass die Anzahl der Patienten N sich zwischen den einzelnen Versuchen unterscheidet. In **Tabelle 5** sind grundlegende Patientencharakteristika dargestellt. Die Altersverteilung war insbesondere unter den CED-Patienten vergleichbar, wobei die Adipositas-Patienten im Durchschnitt ein etwas höheres Alter aufwiesen. Die Geschlechterverteilung war bei den Patienten mit MC ausgeglichen, während in den CU- und Adipositas-Gruppen weibliche Patientinnen überwogen. Die Patienten mit iMC zeigten einen niedrigen bis normalen BMI, während bei cMC- und CU-Patienten ein etwas höherer BMI beobachtet werden konnte. Der BMI bei Adipositas-Patienten reichte von 41 bis 64 kg/m<sup>2</sup>. Die Erkrankungsdauer war in den einzelnen CED-Gruppen sehr variabel und reichte von kürzlich diagnostizierten Patienten hin zu Patienten mit langjährigem Krankheitsverlauf. Den längsten Krankheitsverlauf hatte im Durchschnitt die Gruppe von cMC-Patienten, wohingegen die CU-Gruppe den durchschnittlich kürzesten Krankheitsverlauf aufwies. Beide MC-Aktivitätsindices (CDAI und HBI) zeigten vergleichbare Krankheitsaktivität zwischen den Gruppen iMC und cMC.

In **Tabelle 6** sind häufige Begleiterkrankungen der Patientengruppe mit Adipositas *per magna* dargestellt. Metabolische Erkrankungen (insbesondere Typ II Diabetes) stellten die wichtigsten Indikationen für die durchgeführten bariatrischen Eingriffe dar.

In **Tabelle 7** sind Erkrankungsausbreitung und -verhalten in den einzelnen Patientengruppen mit CED aufgetragen. Bei Patienten mit ilealem Morbus Crohn war am häufigsten ein Befall des terminalen Ileums zu beobachten, vier Patienten zeigten eine Ileocolitis. Von den Patienten mit Morbus Crohn des Colons zeigten 5 einen reinen Befall des Colons und 4 eine Ileocolitis. Das Krankheitsverhalten in der Ileum-Gruppe war vorwiegend strikturierend, in der Colon-Gruppe vor allem strikturierend oder perianal fistulierend. In der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa litt der Großteil der Patienten an einer Pankolitis, nur zwei Patienten an einer Linksseitenkolitis.

	<b>iMC</b>	<b>cMC</b>	<b>CU</b>	<b>Adi</b>
N	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>13</b>
Alter	<b>45,1 ± 17,7</b>	<b>39,4 ± 11,3</b>	<b>42,90 ± 20,0</b>	<b>50,2 ± 8,9</b>
Geschlecht (% w)	<b>53,3</b>	<b>44,4</b>	<b>70,0</b>	<b>69,2</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>21,9 ± 3,8</b>	<b>23,7 ± 1,8</b>	<b>23,3 ± 4,8</b>	<b>49,0 ± 8,3</b>
Erkrankungsdauer (Jahre)	<b>12,4 ± 15,0</b>	<b>18,4 ± 13,2</b>	<b>9,3 ± 6,8</b>	-
CDAI	<b>187,3 ± 115,7</b>	<b>159,8 ± 119,7</b>	-	-
HBI	<b>5,2 ± 3,1</b>	<b>5,1 ± 3,3</b>	<b>13,1 ± 6,5</b>	-

**Tabelle 5. Patientencharakteristika.** Dargestellt sind die Patientengruppen Morbus Crohn mit Befall des Ileums (iMC), des Colons (cMC), Colitis ulcerosa (CU) und Adipositas *per magna* (Adi). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen sind fettgedruckt dargestellt. **Abkürzungen:** *body-mass-index* (BMI), *Crohn´s disease activity index* (CDAI), *Harvey-Bradshaw-Index* (HBI).

Begleiterkrankungen	<b>Adipositas</b>
Insulinresistenz / Typ II Diabetes	<b>61,5 (8/13)</b>
Arterielle Hypertonie	<b>69,2 (9/13)</b>
Steatosis hepatis / Nicht-alkoholische Steatohepatitis	<b>53,8 (7/13)</b>

**Tabelle 6. Metabolische Begleiterkrankungen von Patienten mit Adipositas *per magna*.** Der relative Anteil der Patienten mit Begleiterkrankungen an der Gesamtanzahl in Prozent ist fettgedruckt dargestellt, in Klammern sind die absoluten Patientenzahlen angegeben.

Montreal-Klassifikation	iMC	cMC	Montreal Klassifikation	CU
L1 Ileum	73,3 (11/15)	-	E1 Ulcerative Proktitis	-
L2 Colon	-	55,6 (5/9)	E2 Linksseitencolitis	20,0 (2/10)
L3 Ileocolon	26,7 (4/15)	44,4 (4/9)	E3 Pancolitis	80,0 (8/10)
L4 Oberer GIT	-	-		
B1 Nicht-strikturierend, nicht-penetrierend	13,3 (2/15)	11,1 (1/9)		
B2 Strikturierend	73,3 (11/15)	33,3 (3/9)		
B3 Penetrierend	13,3 (2/15)	11,1 (1/9)		
B3p Perianale Beteiligung	-	44,4 (4/9)		

**Tabelle 7.** Montreal-Klassifikation der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dargestellt sind die Patientengruppen Morbus Crohn des Ileums (iMC) und des Colons (cMC) sowie Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) mit dem jeweiligen relativen Anteil der zutreffenden Erkrankungsausbreitung und des Krankheitsverhaltens nach Montreal-Klassifikation (siehe **Tabelle 2**) an der Gesamtgruppe in Prozent (fettgedruckt). In Klammern sind die absoluten Patientenzahlen dargestellt.

iMC		cMC		CU	
<b>Aktuelle Therapie:</b>		<b>Aktuelle Therapie:</b>		<b>Aktuelle Therapie:</b>	
Sulfa-/Mesalazin:	3/15	Sulfa-/Mesalazin:	0/9	Sulfa-/Mesalazin:	2/10
6-Mercaptopurin:	0/15	6-Mercaptopurin:	1/9	6-Mercaptopurin:	0/10
Azathioprin:	4/15	Azathioprin:	3/9	Azathioprin:	1/10
Prednisolon:	7/15	Prednisolon:	5/9	Prednisolon:	8/10
Budesonid:	2/15	Budesonid:	0/9	Budesonid:	0/10
Infliximab:	2/15	Infliximab:	2/9	Infliximab:	1/10
Golimumab:	0/15	Golimumab:	0/9	Golimumab:	1/10
Adalimumab:	2/15	Adalimumab:	1/9	Adalimumab:	0/10
Vedolizumab:	2/15	Vedolizumab:	1/9	Vedolizumab:	0/10
Keine Medikation:	2/15	Keine Medikation:	0/9	Keine Medikation:	1/10
<b>Frühere Therapie:</b>		<b>Frühere Therapie:</b>		<b>Frühere Therapie:</b>	
Infliximab:	3/15	Infliximab:	3/9	Infliximab:	6/10
Adalimumab:	4/15	Adalimumab:	4/9	Adalimumab:	2/10
Vedolizumab:	0/15	Vedolizumab:	4/9	Vedolizumab:	4/10

**Tabelle 8.** Liste der aktuellen und früheren Therapien der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Aufgelistet sind die Patientengruppen Morbus Crohn mit Befall des Ileums (iMC), des Colons (cMC) sowie Patienten mit Colitis ulcerosa (CU). Dargestellt ist die Anzahl der Patienten (erste Zahl) von der Gesamtgruppe (zweite Zahl), die mit dem jeweiligen Wirkstoff behandelt wurden. Die aktuelle Medikation bezeichnet die zum Befragungszeitpunkt (1-2 Tage präoperativ) eingenommene Dauermedikation (bei den Biologika Infliximab, Adalimumab und Vedolizumab zählt aufgrund der Halbwertszeit eine Verabreichung bis 6 Wochen vor Operationsdatum als aktuelle Medikation). Eine Vortherapie mit Biologika vor mehr als 6 Wochen ist in der Rubrik **frühere Therapie** aufgeführt.

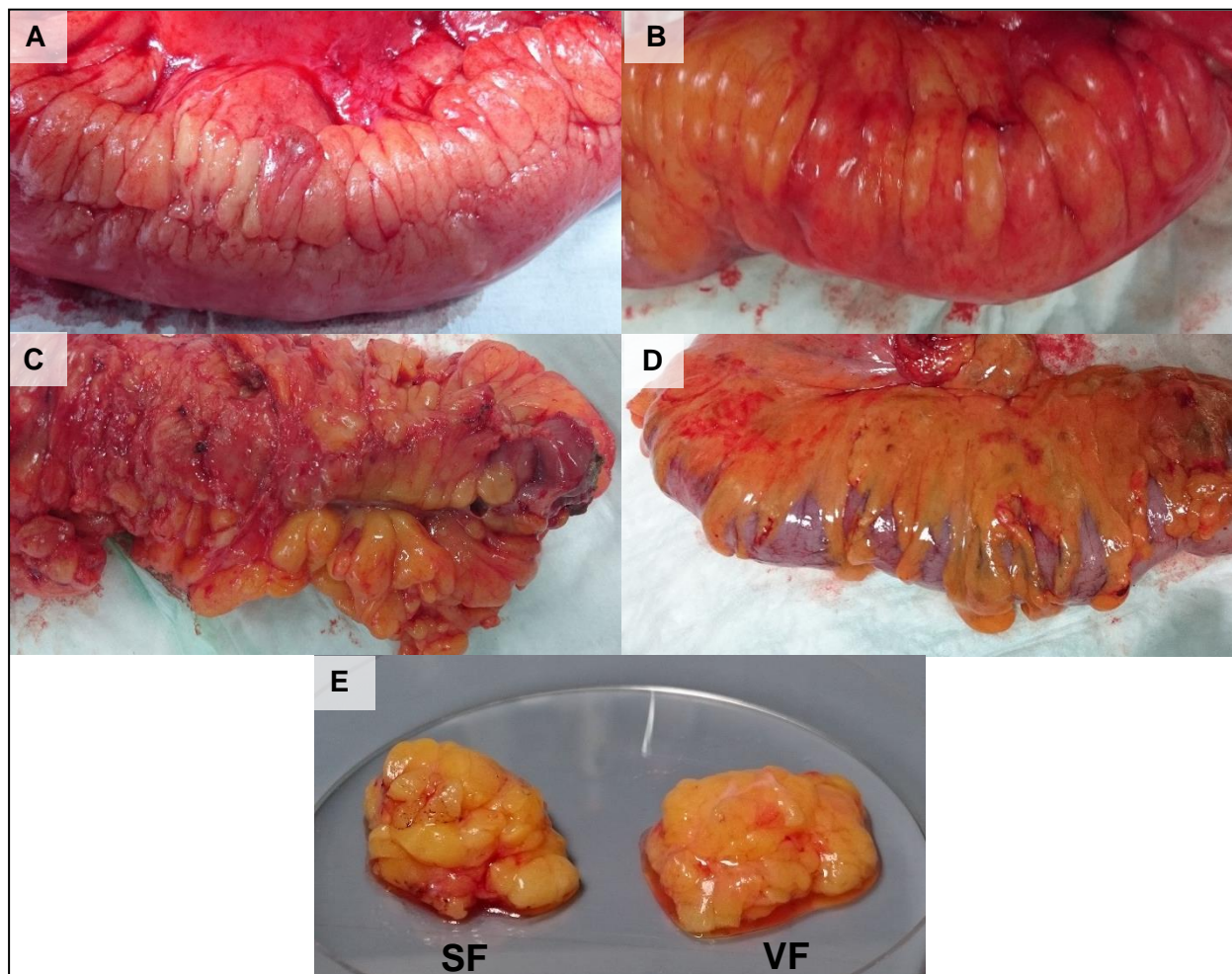
**Tabelle 8** listet sowohl die aktuelle medikamentöse Therapie als auch die vorhergehende Therapie mit Biologika der eingeschlossenen CED-Patienten auf. Aufgrund der Halbwertszeit der Biologika (Adalimumab 14 Tage (120), Infliximab 8 - 9,5 Tage (121), Vedolizumab 25 Tage (122)) wurde bei Verabreichung bis zu 6 Wochen vor Probeentnahme bei diesen Medikamenten als aktuelle Medikation gewertet. Unter der früheren Therapie werden hier nur Biologika aufgeführt, da auf die Listung anderer früherer Therapien aufgrund des teilweise jahrelangen Krankheitsverlaufs aus Übersichtsgründen verzichtet wurde. Insgesamt erhielten bis auf 2 Patienten mit iMC und einen Patienten mit CU alle eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Operation eine antiinflammatorische Therapie. Im Vergleich zwischen Patienten mit iMC und Patienten mit Colitis (cMC, CU) fiel auf, dass bei letzteren häufiger eine Eskalation auf Biologika in der früheren Therapie stattgefunden hatte, während in der iMC-Gruppe verhältnismäßig weniger Patienten mit Biologika vorbehandelt waren. Der Anteil der Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation unter Behandlung mit Biologika standen, war insgesamt gering, darunter am höchsten bei den Patienten mit iMC und cMC.



## 4.2 Makroskopie

Bereits makroskopisch unterschieden sich die Fettgewebe zwischen den verschiedenen Erkrankungsgruppen und den unterschiedlichen Lokalisationen. In **Abbildung 5** sind repräsentative Präparate der einzelnen Patientengruppen dargestellt.

Bei allen Patienten mit Morbus Crohn und ilealer Entzündung (iMC) umgab das mesenteriale Fettgewebe deutlich mehr als 50%, teilweise sogar die gesamte Zirkumferenz des Darmes (**Abb. 5A/B**). Das mesenteriale Fettgewebe war hier fest mit der Serosa des Darms verwachsen und tendenziell eher im Bereich von Stenosen ausgeprägt. Die Konsistenz des *creeping fat* ähnelte fibrotischem Gewebe.



**Abbildung 5.** Repräsentative Operationspräparate makroskopisch. **A,B:** Resektate von Patienten mit Morbus Crohn und ilealem Befall, **C:** Morbus Crohn, Colitis. **D:** Colitis ulcerosa. **E:** Gewebeproben eines adipösen Patienten, links: subkutanes Fettgewebe (SF), rechts: viszerale Fettgewebe (VF).

Bei Patienten mit akutem Befall des Colons (cMC) zeigte sich kein einheitliches Bild. Das Fettgewebe im Bereich der entzündeten Darmabschnitte war vermehrt, jedoch weniger adhärent als beim ilealen Befall, des Weiteren waren deutlich vergrößerte Fettanhängsel, sogenannte *Appendices epiploicae*, zu beobachten. Bei einigen dieser Patienten trat auch eine komplette Ummantelung des Colons auf, jedoch war auch hier das Gewebe weniger fest mit der Serosa verbunden (**Abb. 5C**).

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war die Serosaoberfläche des Colons frei von anhaftendem Fettgewebe. Gelegentlich zeigten sich vergrößerte *Appendices epiploicae*, die dem Darm nur locker auflagen und keinen vermehrten Kontakt mit der Serosa aufwiesen (**Abb. 5D**).

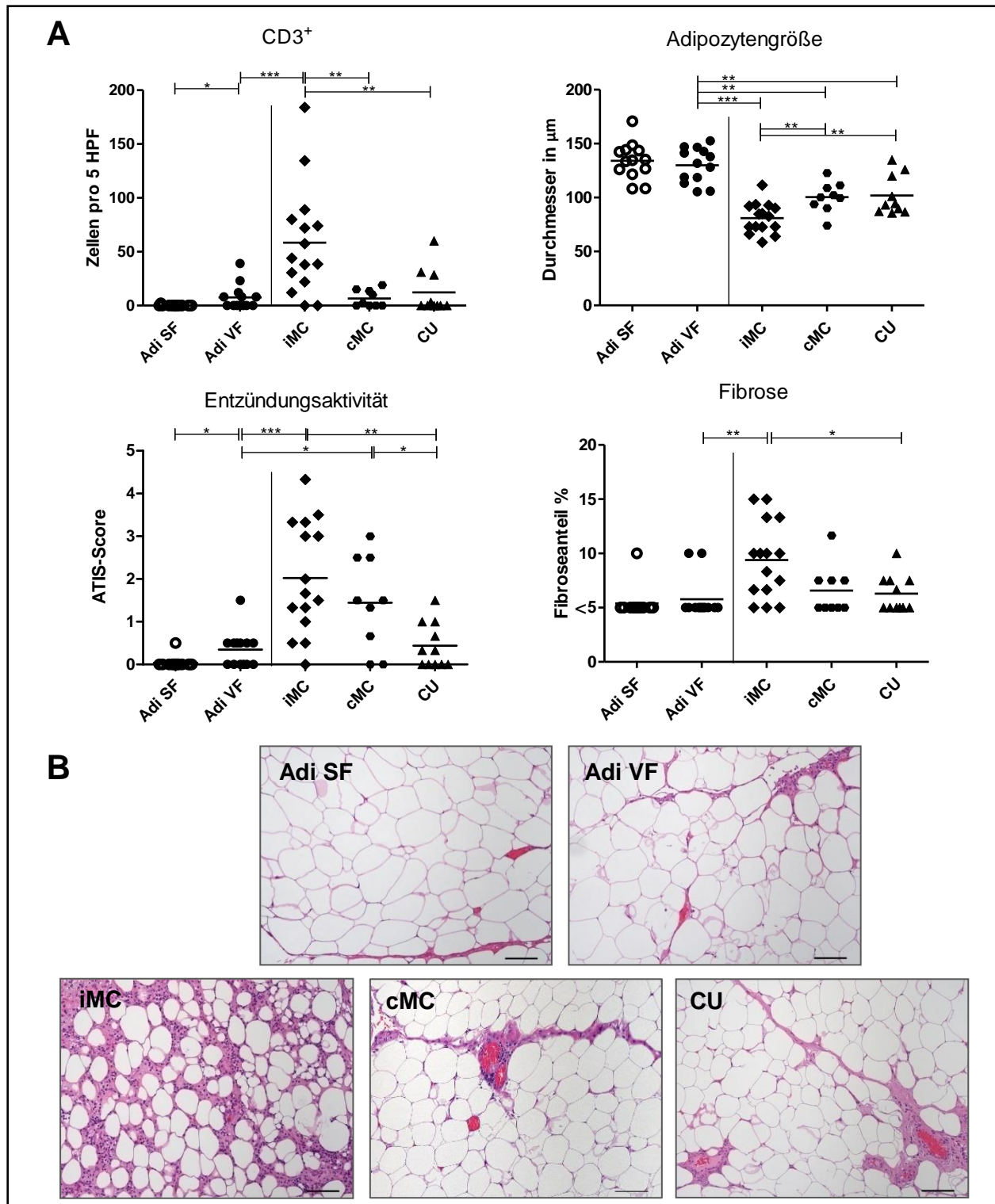
Zwischen subkutanem und viszeralem Fettgewebe von adipösen Patienten zeigte sich makroskopisch nur ein geringer Unterschied. Zu beobachten war in einigen Fällen eine leicht vermehrte Kapillarisation des viszeralen Fettgewebes (**Abb. 5E**).

#### 4.3 Histopathologie

In **Abbildung 6** sind Charakteristika der verschiedenen Fettgewebe, wie die Adipozytengröße, der Fibrosierungsgrad und die Immunzellinfiltration nach Patientengruppen und Gewebelokalisation dargestellt. Zudem sind repräsentative Ausschnitte einer CD3-Färbung der Fettgewebe gezeigt.

In allen untersuchten Fettgeweben konnten CD3-positive Lymphozyten in unterschiedlicher absoluter Anzahl nachgewiesen werden. In der Adipositas-Gruppe zeigte das viszerale Fettgewebe eine zahlenmäßig stärkere Infiltration mit T-Zellen als das subkutane Fettgewebe. Auch im Infiltrationsscore (ATIS), der die allgemeine Entzündung des Fettgewebes berücksichtigt, erreichte das viszerale Fettgewebe einen höheren Wert. Hinsichtlich der Adipozytengröße und dem Fibroseanteil zeigte sich kein Unterschied zwischen dem viszeralen und subkutanen Kompartiment bei Patienten mit Adipositas *per magna*.

Im Vergleich mit den viszeralen Kompartimenten bei Patienten mit CED zeigte das hypertrophierte VF bei Adipositas signifikant größere Adipozyten, wobei insbesondere das ileale CF eine stärkere T-Zell-Infiltration und eine ausgeprägtere Fibrosierung aufwies.



**Abbildung 6. Histologische Charakteristika der Fettgewebe.** Verglichen wurden die Kompartimente viszerales Fettgewebe (VF) und subkutanes Fettgewebe (SF) bei Adipositas, mesenteriales Fettgewebe bei Morbus Crohn mit ilealem oder Colon-Befall (iMC, cMC) und Colitis ulcerosa (CU). **A** Ausgezählte Infiltration mit CD3<sup>+</sup> Zellen, Adipozytendurchmesser, Entzündungsaktivität im Immunzell-Infiltrations-Score (ATIS) und Fibroseanteil in jeweils 5 repräsentativen *high power fields* (HPF, Hauptgesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung). ATIS Score: 1 minimal & fokal 2 minimal & multifokal 3 mild 4 moderat 5 schwer. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ). **B** Repräsentative histologische Ausschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 100-facher Vergrößerung.

Beim Vergleich der mesenterialen/mesocolischen Fettgewebekompartimente in den CED-Gruppen zeigten sich ausgeprägte Unterschiede (siehe **Abbildung 6**). Die größte absolute Infiltration mit T-Zellen wies hierbei das ileale CF bei Patienten mit Morbus Crohn auf. Es konnten hier signifikant mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen gefunden werden als im mesocolische Fettgewebe bei cMC und CU. Die Adipozyten im ilealen CF waren zudem signifikant kleiner als im mesocolischen Fettgewebe bei MC und CU. Die Entzündungsaktivität anhand des Immunzell-Infiltrationsscores war am höchsten im CF bei iMC und signifikant geringer im mesocolischen Fettgewebe bei CU, wobei das mesocolische Fettgewebe bei cMC hinsichtlich der Entzündungsaktivität zwischen iMC und CU lag. Das CF von Patienten mit iMC zeigte eine ausgeprägtere Fibrosierung als das colonnahe Fettgewebe bei Patienten mit CU.

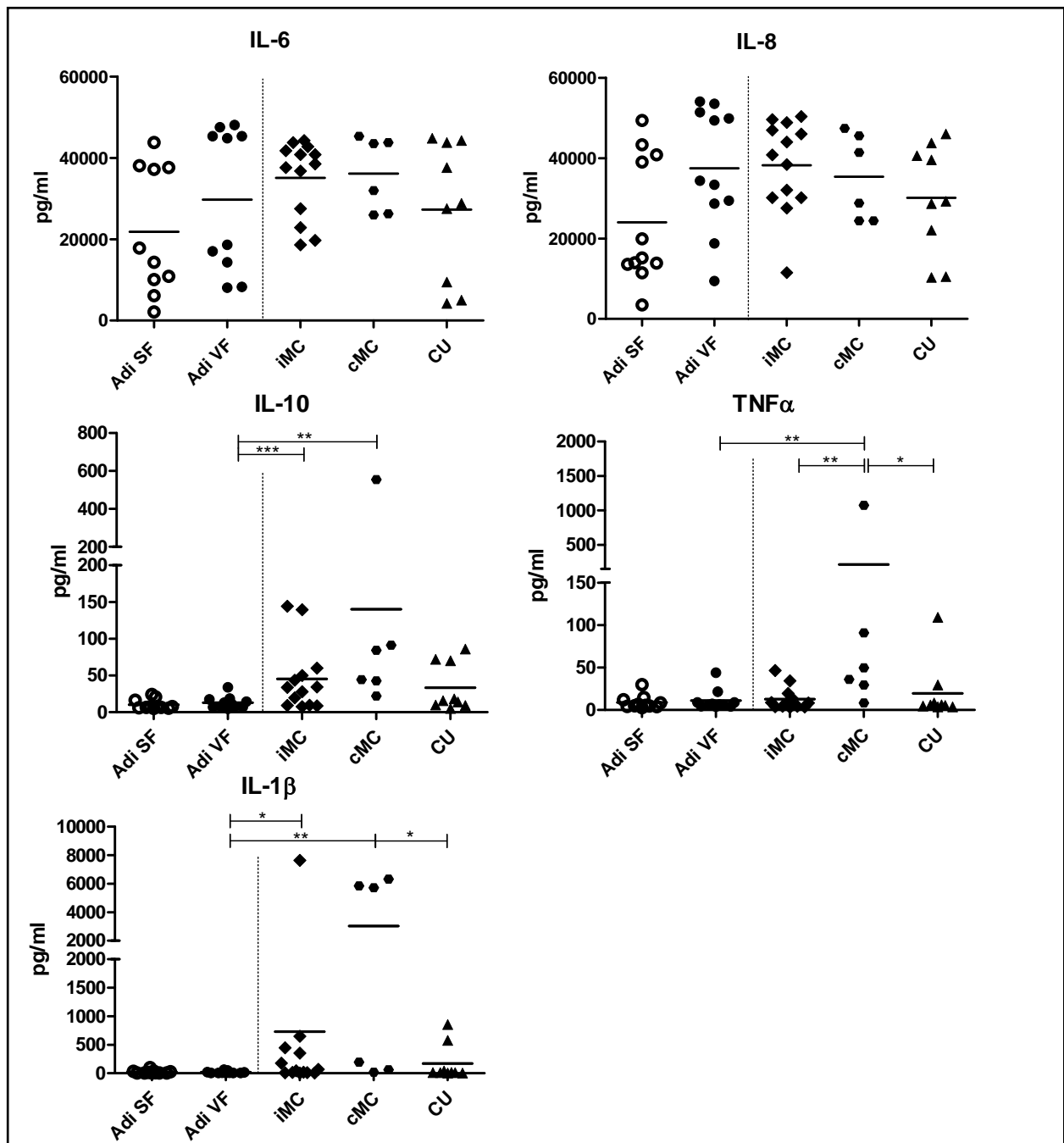
#### **4.4 Zytokinproduktion im Fettgewebe**

Um erste Informationen über das sezernierte Zytokinmuster in den verschiedenen Fettgeweben zu erhalten, wurden nach Lagerung der Gewebeproben über Nacht (vor der Zellisolation) die Kulturüberstände gesammelt und pro- und anti-inflammatorische Zytokine mittels *cytometric bead array* in Fettkulturüberständen bestimmt. Die gemessenen Zytokine sind dabei nicht auf eine einzelne Zellgruppe zurückzuführen sondern spiegeln das allgemeine Milieu innerhalb der Fettgewebe ohne Stimulation wieder. **Abbildung 7** zeigt die gemessenen Zytokinkonzentrationen in den verschiedenen Fettgeweben.

Das VF und SF adipöser Patienten sezernierte insbesondere IL-6 und IL-8, während nur eine geringe Menge von IL-10, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den Überständen zu finden waren. Dabei unterschieden sich VF und SF nicht voneinander.

Im Vergleich zum VF waren im Überstand mesenterialen Fettgewebes von MC-Patienten höhere Konzentrationen von IL-10 und IL-1 $\beta$  nachweisbar.

In allen Überständen mesenterialen/mesocolischen Fettgewebes von CED-Patienten fiel eine hohe Konzentration von IL-6 und IL-8 auf. Bei den Gewebeproben von Patienten mit cMC zeigte sich eine große Streubreite, hier waren jedoch Unterschiede zu Patienten mit CU hinsichtlich einer höheren IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Sekretion erkennbar. Patienten mit iMC und cMC unterschieden sich nur in einer höheren TNF $\alpha$ -Expression in den Überständen vom colonnahen Fettgewebe.



**Abbildung 7.** Mithilfe eines *Cytometric bead array* bestimmte Konzentrationen der Interleukine (IL) 6, 8, 10, 1 $\beta$  sowie des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in Fettgewebsüberständen. Vergleich zwischen viszeralem (VF) und subkutanem Fettgewebe (SF) von Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi), sowie mesenterialem Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC), des Colons (cMC) sowie mit Colitis ulcerosa (CU). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.5 T-Zell-Subpopulationen im Fettgewebe bei Patienten mit Adipositas

Zur Untersuchung der T-Zell-Verteilung in der Patientenstichprobe dieser Studie wurde der Anteil der T-Zell-Subpopulationen CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (inklusive T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>), T<sub>reg</sub>, Subgruppen der T-Gedächtniszellen, TCR<sub>γδ</sub> und NKT-Zellen an den CD3<sup>+</sup> T-Zellen aus dem stroma-vaskulären Kompartiment des Fettgewebes durchflusszytometrisch ermittelt. Nachfolgend werden die relativen Häufigkeiten der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zwischen viszeralem Fettgewebe (VF) und subkutanem Fettgewebe (SF) von Patienten mit Adipositas *per magna* verglichen.

Der Anteil von CD4<sup>+</sup>- Zellen an allen CD3<sup>+</sup>-T-Zellen war bei Patienten mit Adipositas *per magna* im SF signifikant höher als im VF (p= 0,0337). Hingegen fanden sich im VF anteilmäßig signifikant mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen (p= 0,0062) (siehe **Abbildung 8**).

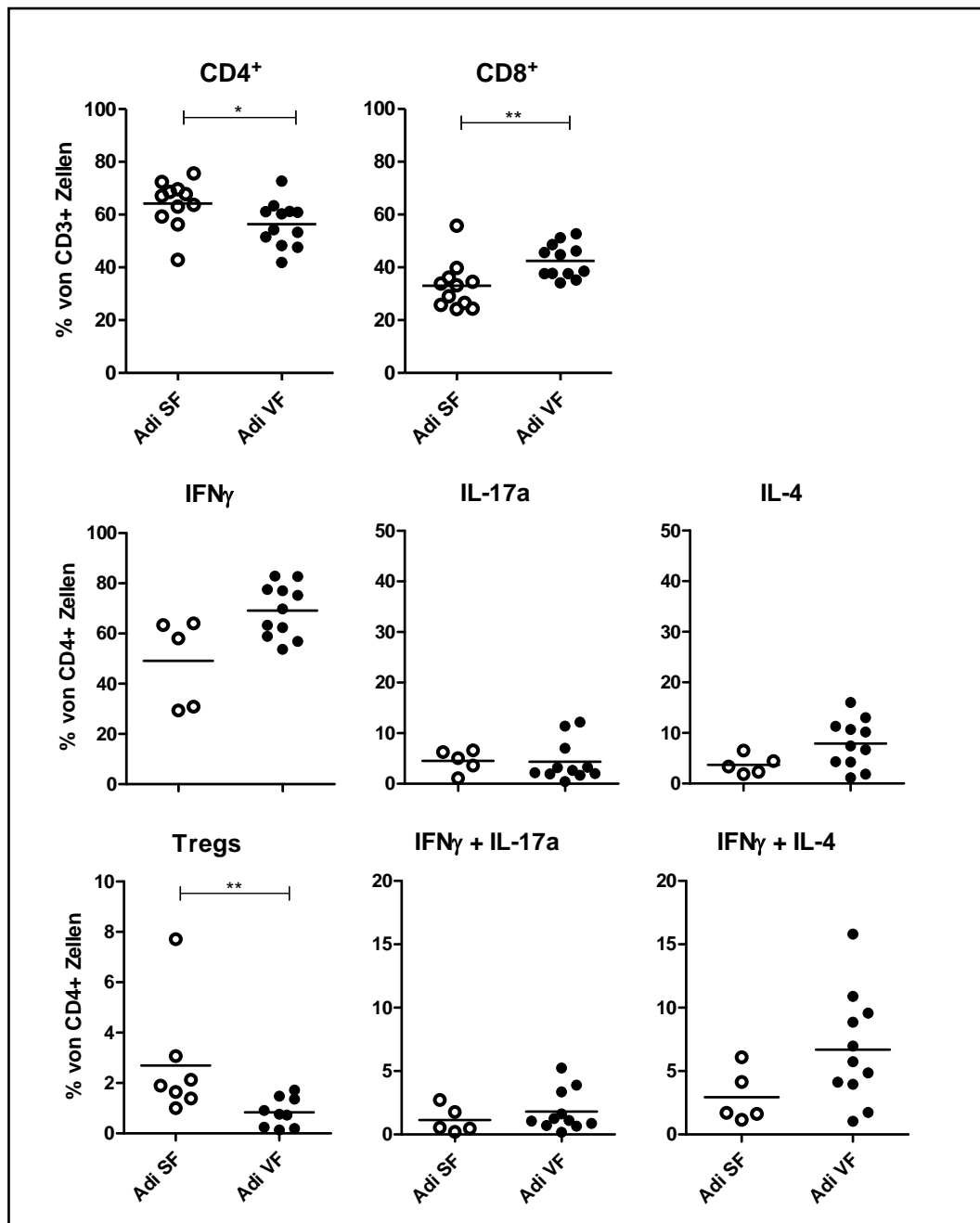
Der Anteil IFN<sub>γ</sub>-produzierender T<sub>H1</sub>-Helferzellen war im VF mit 69,1% aller T-Helferzellen tendenziell höher als im SF mit 49,1%. Hinsichtlich der IL-17-produzierenden T<sub>H17</sub>-Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen VF und SF. Der Anteil der IL-4 exprimierenden T<sub>H2</sub>-Zellen lag gering höher im VF als im SF. Ebenso fand sich im VF einiger Patienten eine Population an IL-4/IFN<sub>γ</sub>-koproduzierenden T-Zellen.

Der Anteil regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>) an allen CD4<sup>+</sup> Zellen war im SF adipöser Patienten mit durchschnittlich 2,7% signifikant höher als im VF, wo kaum T<sub>reg</sub> nachweisbar waren (0,8%) (siehe **Abbildung 8**).

Die Zusammensetzung des Gedächtniszell-Kompartiments ist in **Abbildung 9** für CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen getrennt dargestellt. Während im hypertrophierten VF hinsichtlich der T-Gedächtniszellen *effector memory* Zellen (T<sub>EM</sub>) gegenüber den *central memory* Zellen (T<sub>CM</sub>) überwogen, war ihr Verhältnis im SF zugunsten der T<sub>CM</sub>-Zellen verschoben. Der Anteil der T<sub>EM</sub> an sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Zellen war im SF signifikant geringer als im VF (p=0,0279 für CD8<sup>+</sup>; p= 0,0076 für CD4<sup>+</sup>), der Anteil der T<sub>CM</sub> dafür signifikant höher im SF als im VF (p= 0,0435 für CD8<sup>+</sup>; p=0,0101 für CD4<sup>+</sup>).

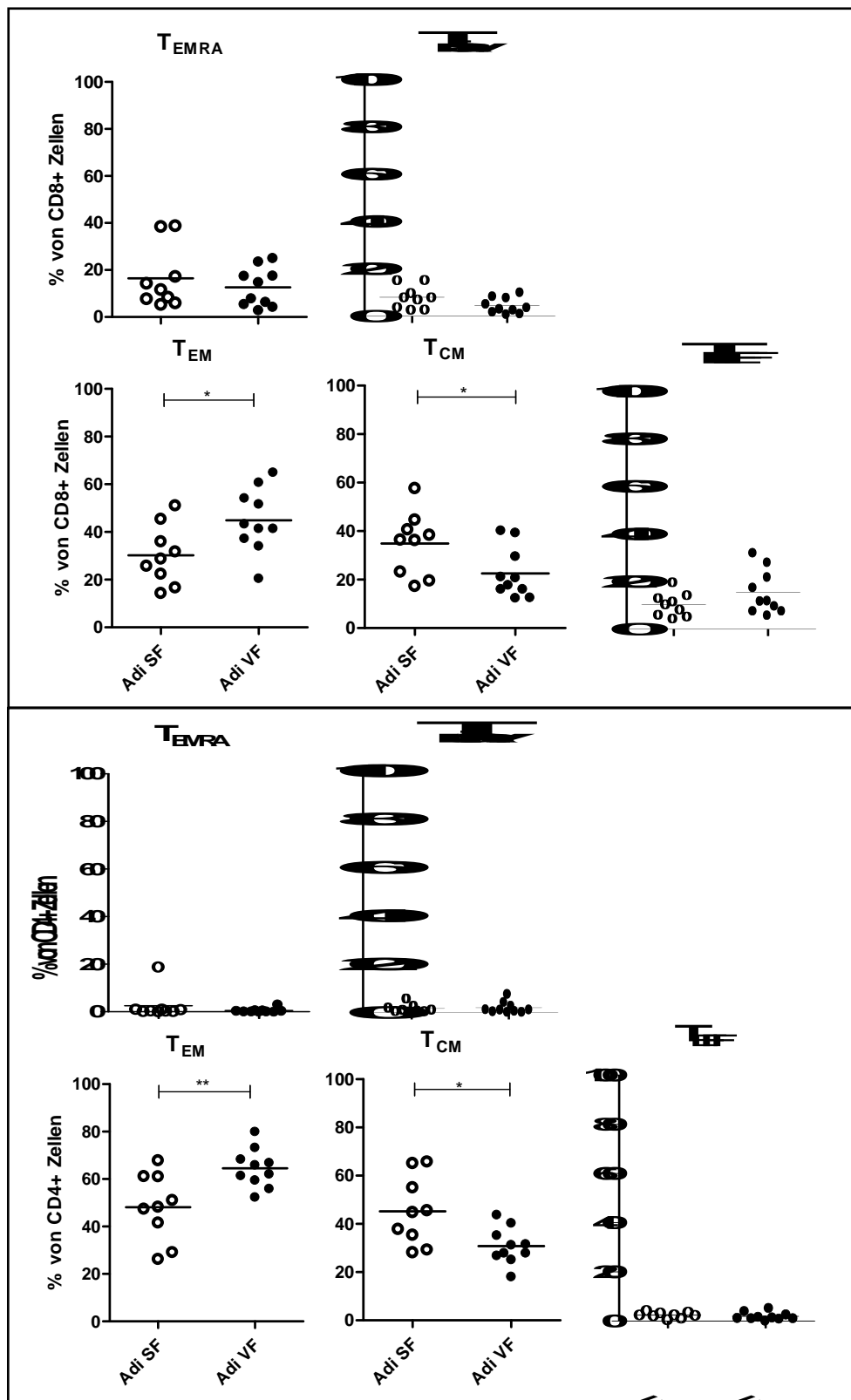
Beim Anteil von CD8<sup>+</sup> naiven T-Zellen deutete sich ein Unterschied an, wobei im SF tendenziell etwas mehr CD8<sup>+</sup> naive und etwas weniger CD8<sup>+</sup> Effektorzellen zu finden waren als im VF. Der Anteil von T<sub>EMRA</sub>-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> naiven und Effektorzellen unterschied sich nicht zwischen VF und SF.

**Abbildung 10** zeigt den Anteil von TCR $\gamma\delta$ -Zellen im hypertrophierten Fettgewebe bei Patienten mit Adipositas *per magna*. Der prozentuale Anteil an TCR $\gamma\delta$ -Zellen war im VF adipöser Patienten tendenziell höher als im SF, jedoch nicht statistisch signifikant. NKT-Zellen fanden sich im SF und VF im Durchschnitt mit einem Anteil von knapp unter 10% der im Fettgewebe ansässigen T-Zellen.

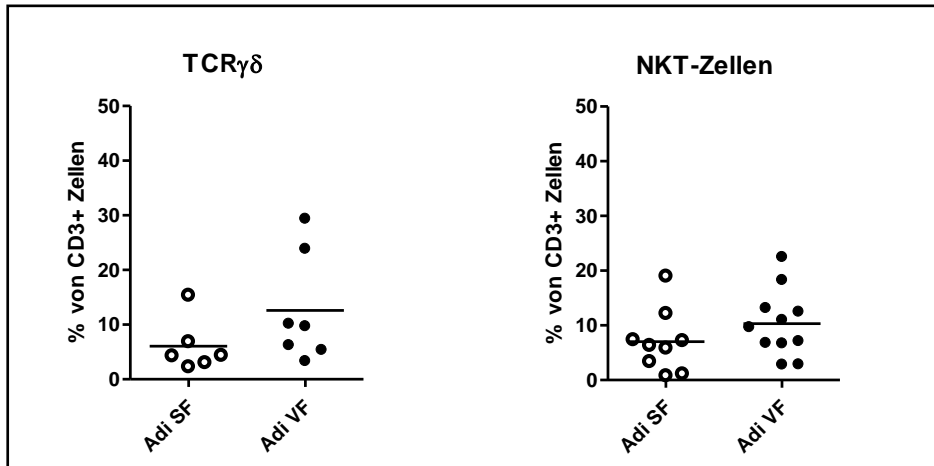


**Abbildung 8:** Anteil von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen, T-Helferzell-Subgruppen und regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) im Fettgewebe bei Adipositas *per magna*. Vergleich von Gewebeproben aus dem subkutanen (SF) und viszeralen Fettgewebe (VF) von Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi). Die intrazelluläre Zytokinfärbung erfolgte nach antigenunspezifischer Stimulation. **Abkürzungen:** Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Interleukin (IL). T<sub>reg</sub> sind definiert als CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>high</sup> - Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau p<0,05 (\* p<0,05 \*\* p< 0,01).





**Abbildung 9.** Anteil von Memory-T-Zellen an  $CD8^+$  Zellen im Fettgewebe bei Adipositas *per magna* (Adi). **Oben:**  $CD8^+$ -Zellen, **Unten:**  $CD4^+$ -Zellen. Vergleich zwischen subkutanem (SF) und viszeralem Fettgewebe (VF). **Abkürzungen:**  $T_{EMRA}$  (effector memory T-Zellen mit  $CD45RA$ -Expression, definiert als  $CCR7^+CD45RA^+$ ),  $T_{EM}$  (effector memory T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RO^+$ ),  $T_{naiv}$  (naive T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RA^+$ ),  $T_{CM}$  (central memory T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RA^+$ ),  $T_{EFF}$  (Effektor-T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RA^+CD45RO^+$ ). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

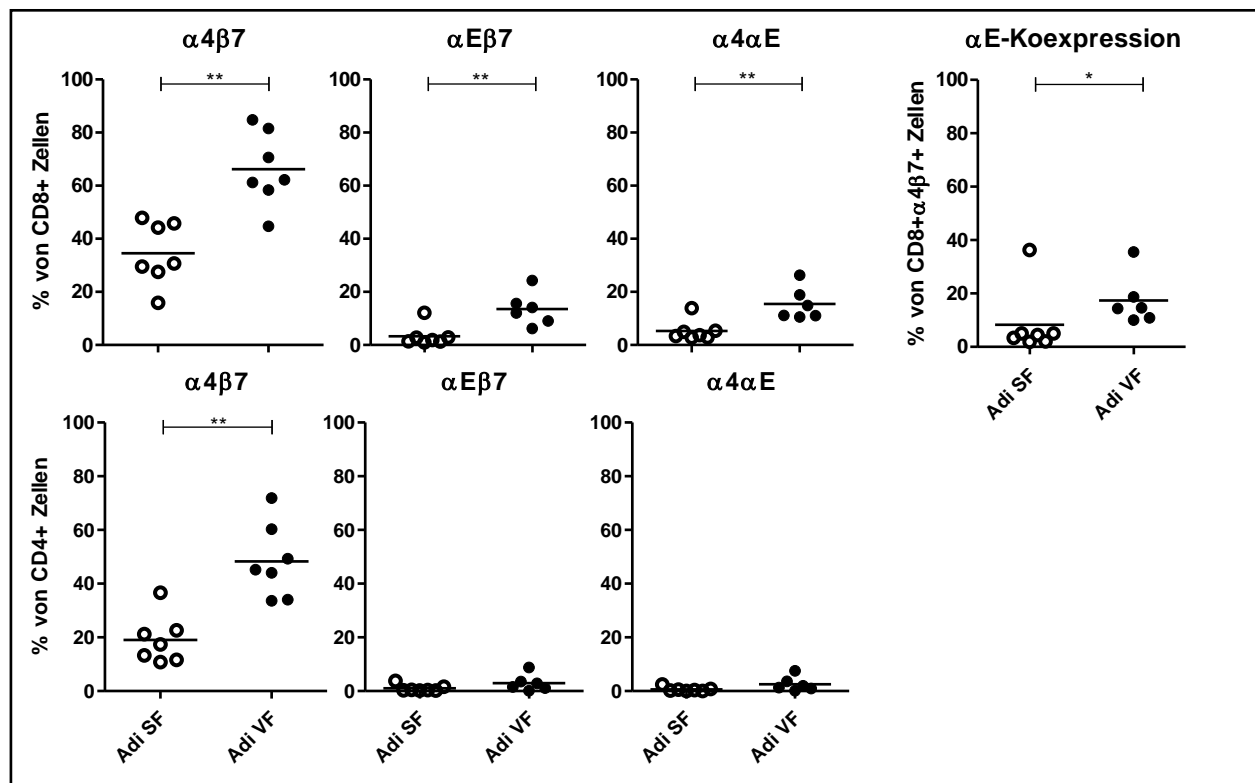


**Abbildung 10.** Anteil von TCR $\gamma\delta$  Zellen und natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) im Fettgewebe bei Adipositas *per magna*. Vergleich von Gewebeproben aus dem subkutanen (SF) und viszeralen Fettgewebe (VF) von Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi). NKT sind definiert als CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.5.1 Expression von Darm-spezifischen *homing*-Rezeptoren

Das darmspezifische *homing*-Integrin  $\alpha 4\beta 7$  konnte im hypertrophierten Fettgewebe bei Patienten mit Adipositas *per magna* insbesondere auf einem Großteil der  $CD8^+$  Zellen nachgewiesen werden. Den höchsten Anteil  $\alpha 4\beta 7$ -exprimierender Zellen zeigte das VF mit durchschnittlich 66,2% aller  $CD8^+$  Zellen, ganz im Gegensatz zum SF, wo der Anteil signifikant kleiner war ( $p= 0,0023$ ). Auch bei den  $CD4^+$  Zellen zeigte sich dieser Unterschied zwischen subkutanem und viszeralem Fettgewebe (**Abbildung 11**).

Auch das Integrin  $\alpha E\beta 7$  konnte auf einem Teil der im VF vorhandenen T-Zellen nachgewiesen werden, allerdings war dies auf einem deutlich geringeren Anteil der Zellen präsent und fast ausschließlich auf  $CD8^+$  Zellen. Zudem zeigte sich bei mehr  $CD8^+ \alpha E\beta 7^+$  Zellen im VF eine Koexpression von  $\alpha E$  als im SF adipöser Patienten.



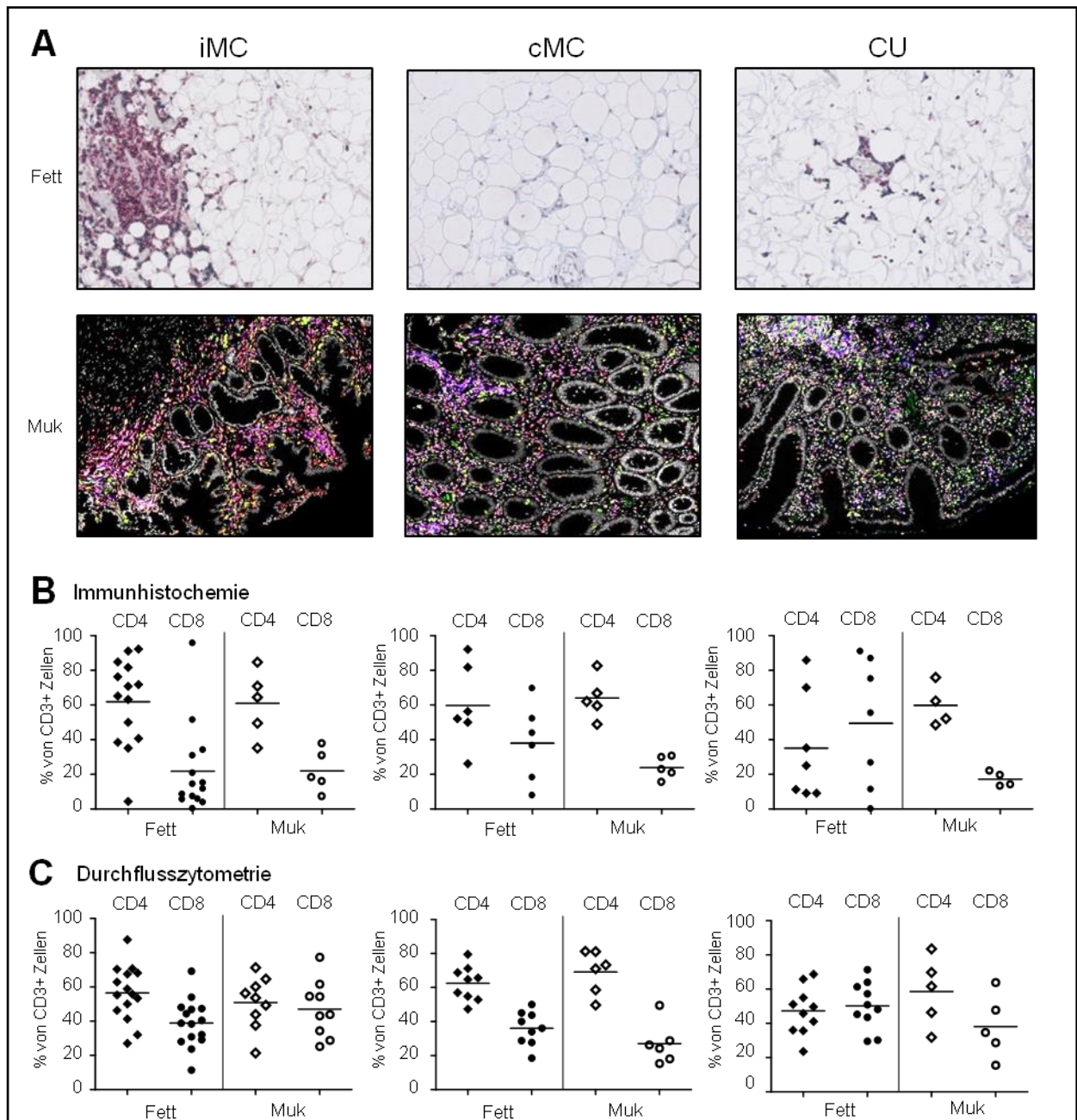
**Abbildung 11.** Anteil von Integrin-exprimierenden Zellen an  $CD8^+$  und  $CD4^+$  Zellen im Fettgewebe bei Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi). **Oben:**  $CD8^+$ -Zellen. **Unten:**  $CD4^+$ -Zellen. Vergleich von subkutanem (SF) und viszeralem Fettgewebe (VF). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.6 T-Zell-Subpopulationen in Mukosa und mesenterialem Fettgewebe bei CED

Um Unterschiede hinsichtlich der Krankheitsentitäten MC und CU einerseits und hinsichtlich verschiedener Entzündungslokalisationen bei MC andererseits zu untersuchen, erfolgte die Gruppeneinteilung in Patienten mit Morbus Crohn und akuter Entzündung des Ileums (iMC), Morbus Crohn mit akuter Entzündung des Colons (cMC) und Colitis ulcerosa (CU). Dabei erfolgte zusätzlich der Vergleich von darmnahem Fettgewebe mit dazugehöriger Mukosa.

Um einen Vergleich für die relativen Daten der durchflusszytometrischen Analyse von isolierten T-Zellen zu erhalten wurden  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen immunhistologisch quantifiziert und ebenfalls als relative Anteile an  $CD3^+$  Zellen dargestellt (**Abbildung 12**). Immunhistologie und Durchflusszytometrie ergaben eine vergleichbare Verteilung von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen in Mukosa und mesenterialem Fettgewebe in den verschiedenen CED-Gruppen.

Die Daten der durchflusszytometrischen Analyse von  $CD8^+$  und  $CD4^+$  Zellen sowie das Expressionsmuster von  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen einschließlich  $T_{regs}$  sind in **Abbildung 13** vergleichend für Mukosa und mesenteriales/mesocolisches Fettgewebe der CED-Gruppen dargestellt. Zwischen den verschiedenen darmnahen Fettgeweben bei Patienten mit CED zeigte sich ein Trend hinsichtlich eines höheren Anteils von  $CD4^+$ -Zellen und geringeren Anteils von  $CD8^+$ -Zellen bei Patienten mit MC gegenüber Patienten mit CU, insbesondere im Colon-nahen Fettgewebe ( $p= 0,025$  für  $CD8^+$ ,  $p= 0,022$  für  $CD4^+$ ). Zwischen Mukosa und angrenzendem Fettgewebe ergab sich in allen Patientengruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen  $CD4/CD8$ -Infiltration.



**Abbildung 12.** Anteil von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ermittelt durch Immunhistologie und Durchflusszytometrie. **A)** Obere Reihe (Fett): Absolute Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in immunhistologischer Dreifach-Färbung für CD3 (braun), CD 4 (rot) und CD8 (blau) in 100-facher Vergrößerung. Untere Reihe (Muk): Immunfluoreszenz-Visualisierung von mukosalen T-Zellen für CD3 (rot), CD4 (blau) und CD8 (grün) in 100-facher Vergrößerung. **B)** Anteil von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen, ermittelt durch Immunhistologie. **C)** Anteil von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen, ermittelt durch Durchflusszytometrie. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte. Abkürzungen: Morbus Crohn des Ileums (iMC), Morbus Crohn des Colons (cMC), Colitis ulcerosa (CU).

Mit durchschnittlich 59,6% war der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Helferzellen am höchsten im mesocolischen Fettgewebe bei Patienten mit CU. In den einzelnen CED-Patientengruppen zeigte sich ein jeweils signifikant höherer Anteil IFN $\gamma$ -positiver Zellen im darmnahen Fettgewebe im Vergleich zur angrenzenden Mukosa. Dabei lagen die Anteile IFN $\gamma$ -produzierender T<sub>H</sub>-Zellen in Fettgewebe und Mukosa jedoch in der ilealen Lokalisation näher beieinander als im Colon, wobei sich bei CU ein größerer Unterschied fand.

Der größte Anteil IL-17-produzierender T-Zellen fand sich im Vergleich aller untersuchten Gewebe von CED-Patienten in der Mukosa von Patienten mit iMC. Der Anteil der IL-17<sup>+</sup> Zellen war im Durchschnitt 10% höher als im angrenzenden Fettgewebe (16,8% vs. 6,7%). In der entzündeten Mukosa bei iMC-Patienten zeigte sich zudem eine Population IFN $\gamma$ - und IL-17-koproduzierender Zellen, die durchschnittlich 5,2% der Helferzellen ausmachte. Im mesocolischen Fettgewebe bei cMC/CU lag der Anteil der IL-17-produzierenden Zellen im Mittel unter 10%.

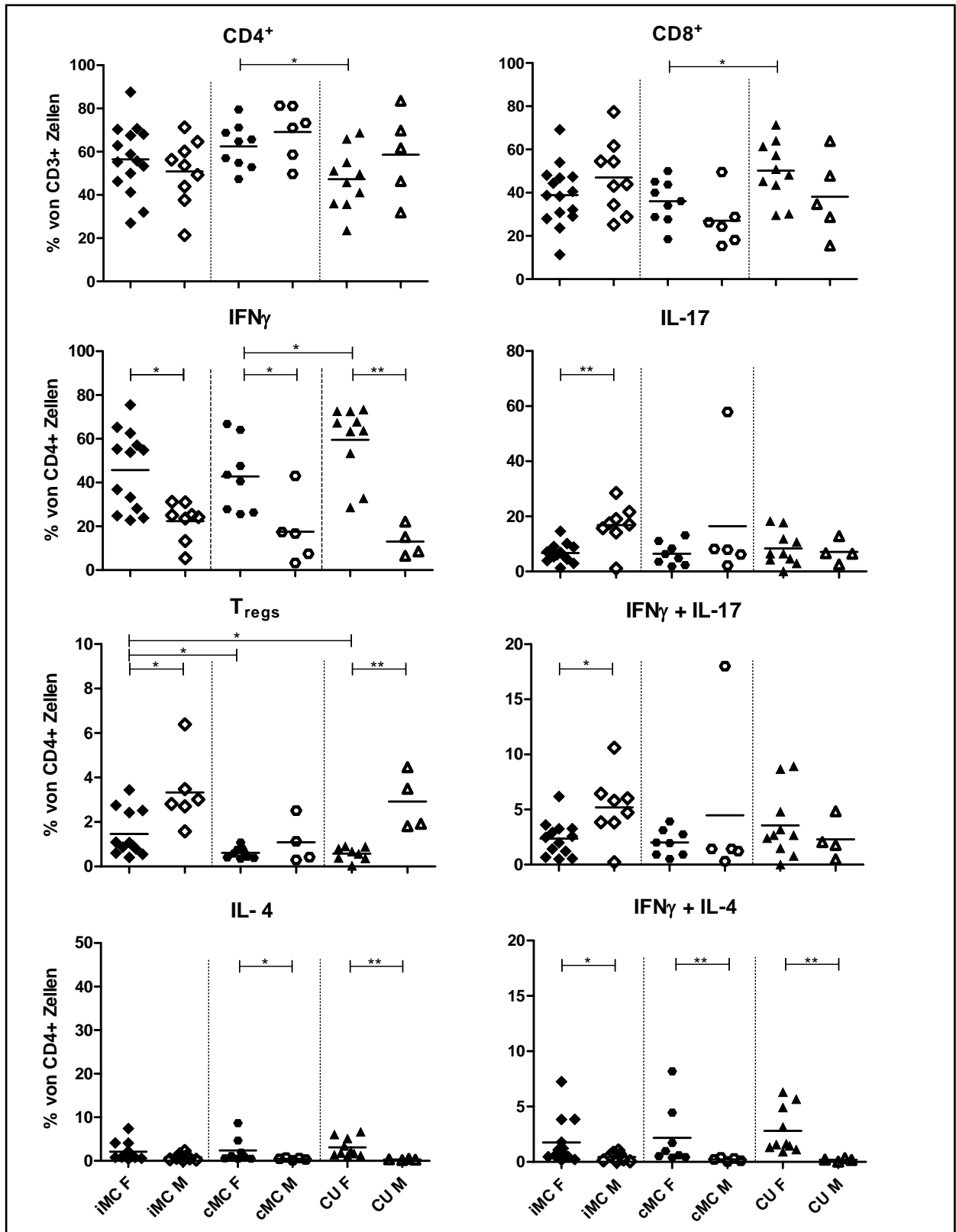
Bei den CED-Patientengruppen konnte der allgemeine Trend beobachtet werden, dass sich IL-4- und IFN $\gamma$ /IL-4-koproduzierende Helferzellen in geringem Umfang im mesenterialen Fettgewebe fanden und kaum in der Mukosa.

In der entzündeten Mukosa von iMC-Patienten fand sich eine deutliche T<sub>reg</sub>-Population, die durchschnittlich 3,33% der CD4<sup>+</sup> Zellen ausmachte, ihr Anteil im dazugehörigen CF war signifikant kleiner ( $p=0,01$ ). Im Vergleich zu den anderen getesteten darmnahen Fettgeweben bei CED war der Anteil der T<sub>regs</sub> im CF des Ileums jedoch signifikant höher ( $p=0,0209$  für cMC,  $p=0,0279$  für CU). Der Unterschied zwischen darmnahen Fettgewebe und Mukosa war am stärksten ausgeprägt bei Patienten mit CU.

Die T-Gedächtnispopulationen sind in **Abbildung 14** dargestellt. Im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit iMC konnten im Vergleich zu den anderen untersuchten Fettgeweben sowohl vermehrt CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>-Zellen gefunden werden. Im Colon-nahen Fettgewebe bei Patienten mit cMC und CU war die relative Häufigkeit von T<sub>CM</sub>-Zellen deutlich geringer, hingegen waren hier tendenziell mehr Effektorzellen und *effector memory* Zellen zu finden. Im Vergleich zwischen Mukosa und mesenterialem Fettgewebe von Patienten mit iMC zeigte sich insbesondere eine inverse Infiltration mit T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> Zellen, wobei im Fettgewebe vor allem die CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> Zellen überwogen.

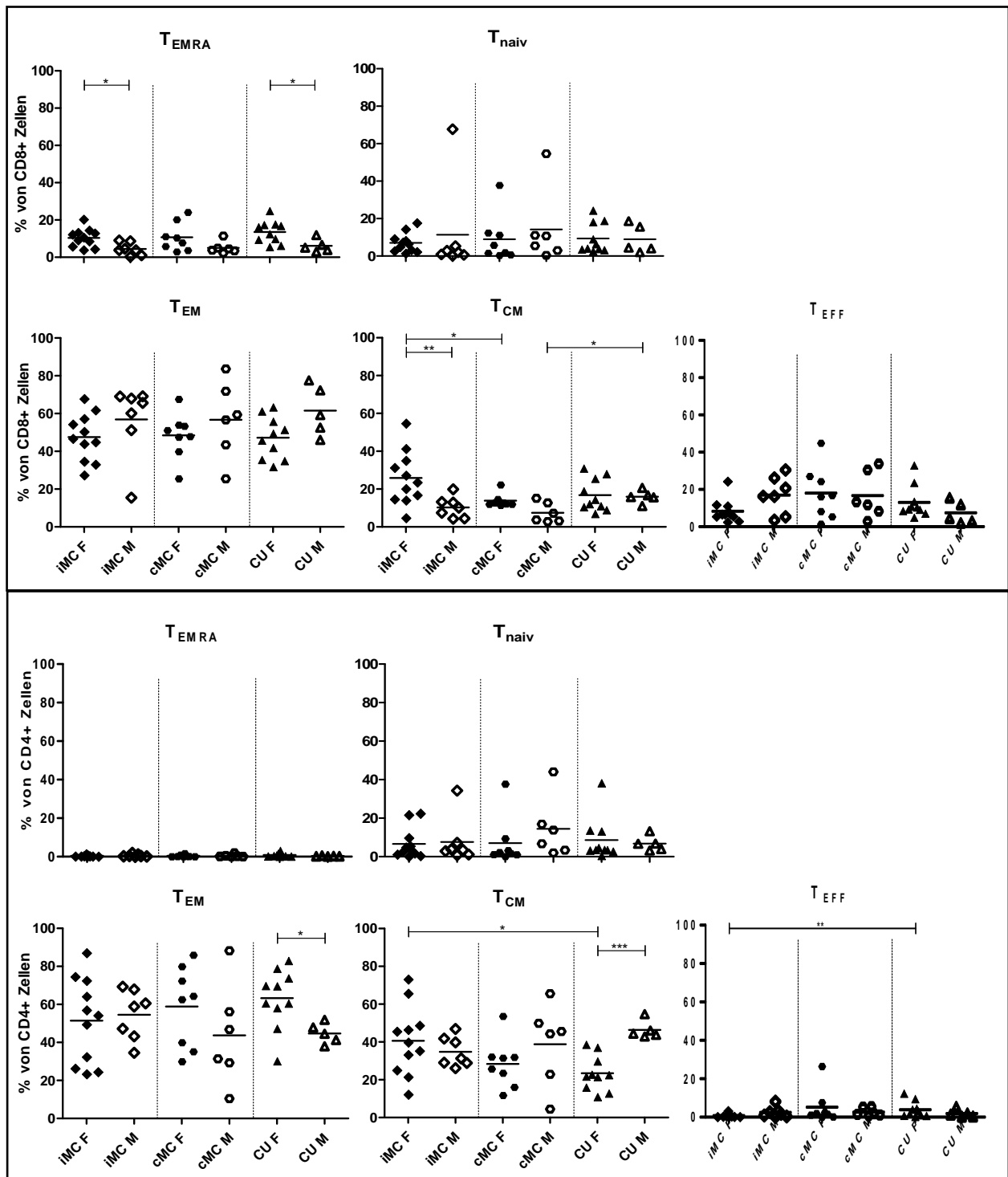
CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub>-Zellen waren in allen Gruppen vermehrt im darmnahen Fettgewebe im Vergleich zur Mukosa zu finden (p=0,0185 für iMC, p= 0,0193 für CU).

**Abbildung 15** zeigt den Anteil von TCR $\gamma\delta$ -Zellen und NKT-Zellen in Fettgewebe und Mukosa der CED-Patienten. Mit einem Anteil von 8,2% an allen T-Zellen machten TCR $\gamma\delta$ -Zellen in der ilealen Mukosa einen größeren Anteil aus als im mesenterialen *CF* bei iMC (3,8%). Auch bei Patienten mit cMC zeigte sich ein Trend zu mehr TCR $\gamma\delta$ -Zellen im darmnahen Fettgewebe. Zwischen den einzelnen Fettgeweben und zwischen Fettgewebe und Mukosa bei Patienten mit CU zeigten sich keine relevanten Unterschiede. Hinsichtlich der relativen Häufigkeit von NKT-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Krankheitsentitäten und Gewebelokalisationen. Während sich der Anteil in den Fettgeweben ähnelte, zeigte sich in der Mukosa eine größere Variation unter den einzelnen Patienten.

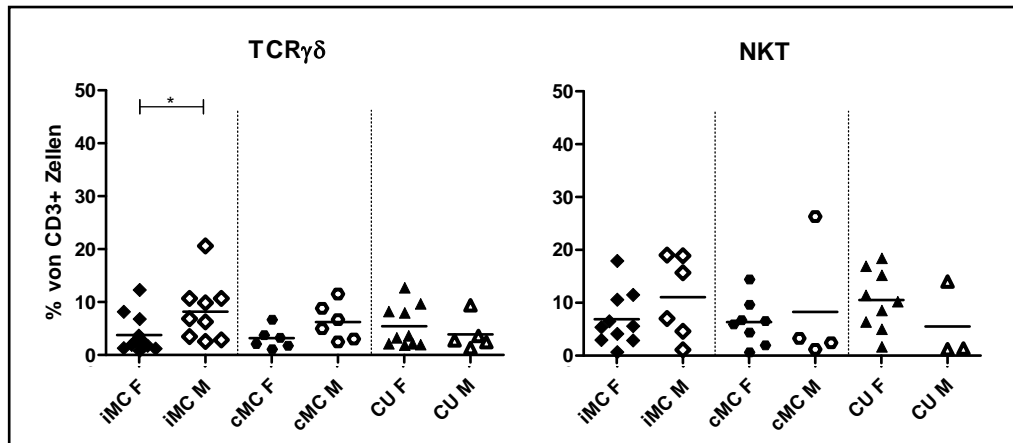


**Abbildung 13.** Anteil von T-Helferzellen und regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) in mesenterialem Fettgewebe (F) und Mukosa (M) bei Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC), des Colons (cMC) und Colitis ulcerosa (CU). **Abkürzungen:** Interferon (IFN), Interleukin (IL).  $T_{reg}$  sind definiert als  $CCR4^{+}CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^{high}$ -Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).





**Abbildung 14.** Anteil von  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  Subgruppen von T-Gedächtniszellen im Vergleich von mesenterialem Fettgewebe (F) und Mukosa (M) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. **Oben:**  $CD8^+$ -Zellen, **Unten:**  $CD4^+$ -Zellen. Vergleich zwischen Gewebe von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC), des Colons (cMC) und Colitis ulcerosa (CU). **Abkürzungen:**  $T_{EMRA}$  (effector memory T-Zellen mit  $CD45RA$ -Expression, definiert als  $CCR7^+CD45RA^+$ ),  $T_{EM}$  (effector memory T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RO^+$ ),  $T_{naiv}$  (naive T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RA^+$ ),  $T_{CM}$  (central memory T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RA^-$ ),  $T_{EFF}$  (Effektor-T-Zellen, definiert als  $CCR7^+CD45RA^-CD45RO^-$ ). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 15.** Anteil von TCR $\gamma\delta$ -Zellen und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) in mesenterialem Fettgewebe und Mukosa bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Vergleich zwischen Gewebe von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC), des Colons (cMC) und Colitis ulcerosa (CU). NKT sind definiert als CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

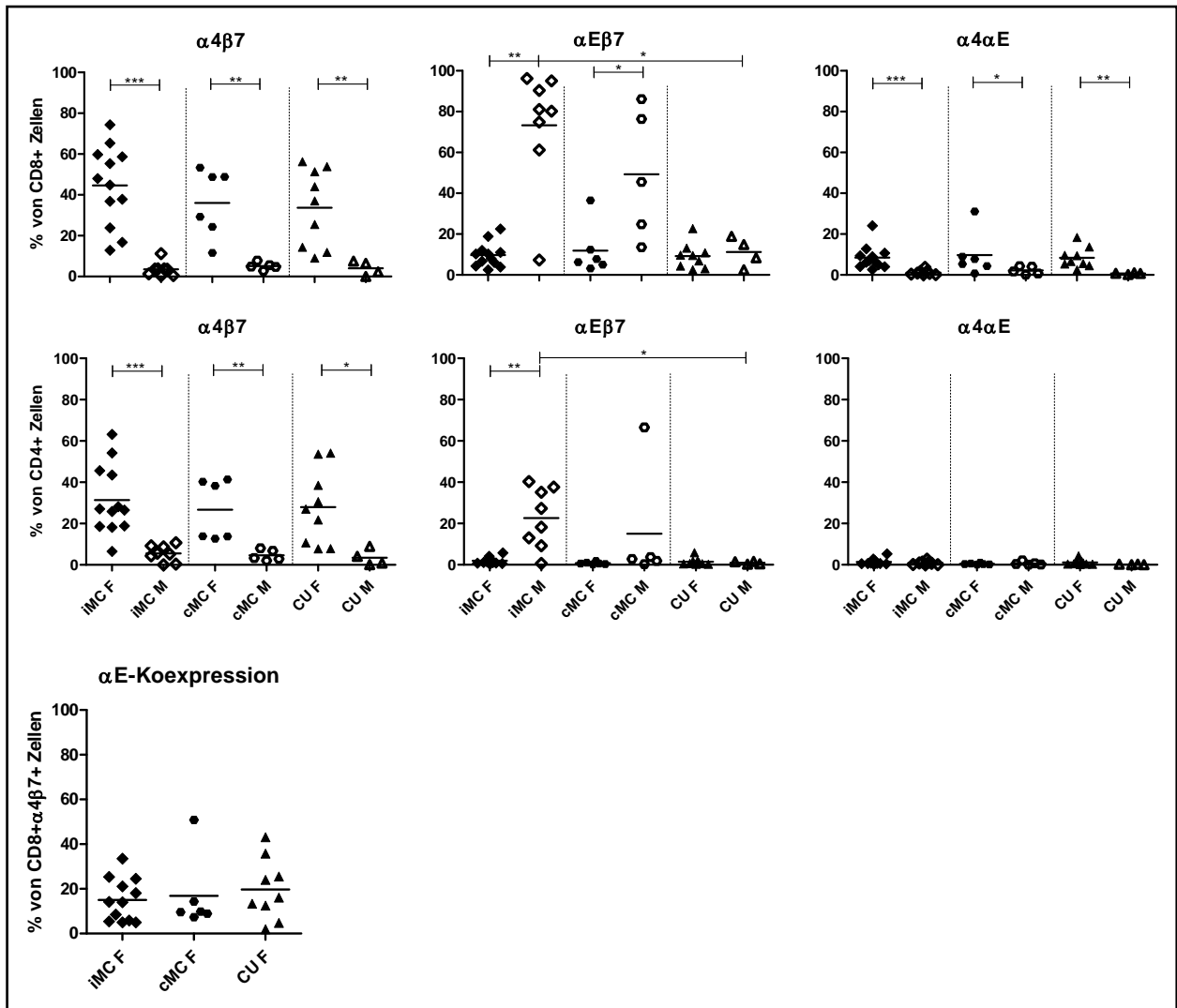
#### 4.6.1 Expression von Darm-spezifischen *homing*-Rezeptoren

Die Expression des Darm-spezifischen *homing* Integrins  $\alpha 4\beta 7$  sowie des Residenz-Markers  $\alpha E\beta 7$  auf T-Zellen im darmnahen Fett und in der Mukosa bei CED-Patienten sind in **Abbildung 16** dargestellt.

Im *CF* bei iMC waren tendenziell mehr  $\alpha 4\beta 7$ -positive CD8<sup>+</sup> Zellen lokalisiert als im Colon-nahen Fett bei cMC und CU. Die aus der Dünndarmmukosa von iMC-Patienten isolierten Zellen zeigten eine nur geringe Expression von  $\alpha 4\beta 7$  (CD8: 3,5%; CD4: 5,5%), jedoch exprimierte der überwiegende Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen das Integrin  $\alpha E\beta 7$  (73,3%), bei CD4<sup>+</sup>-Zellen waren es 22,7%. Ein ähnlicher Trend war auch für die Mukosa von cMC-Patienten zu beobachten.

$\alpha 4\alpha E$  doppelt-positive Zellen waren nur im Fettgewebe, nicht aber in der Mukosa in allen drei Patientengruppen zu finden. Dies ergibt, dass in der Mukosa die Zellen entweder  $\alpha 4$  oder  $\alpha E$  exprimieren, während im Fettgewebe nahezu alle  $\alpha E$ -positiven Zellen auch  $\alpha 4$  trugen.

Im mesenterialem Fettgewebe bei CED-Patienten war der Anteil von  $\alpha E$ -koexprimierenden  $\alpha 4\beta 7$ <sup>+</sup> Zellen ähnlich wie im VF bei adipösen Patienten und unterschied sich nicht signifikant zwischen Ileum und Colon oder MC und CU.



**Abbildung 16.** Anteil Integrin-exprimierender Zellen an CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>-Zellen in Mukosa (M) und mesenterialem Fettgewebe (F) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Vergleich zwischen Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC), des Colons (cCD) und Colitis ulcerosa (CU). **Oben:** CD8<sup>+</sup>-Zellen. **Mitte:** CD4<sup>+</sup>-Zellen **Unten:** Koexpression von Integrin  $\alpha E$  durch CD8<sup>+</sup> $\alpha 4\beta 7$ <sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau p < 0,05 (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001).

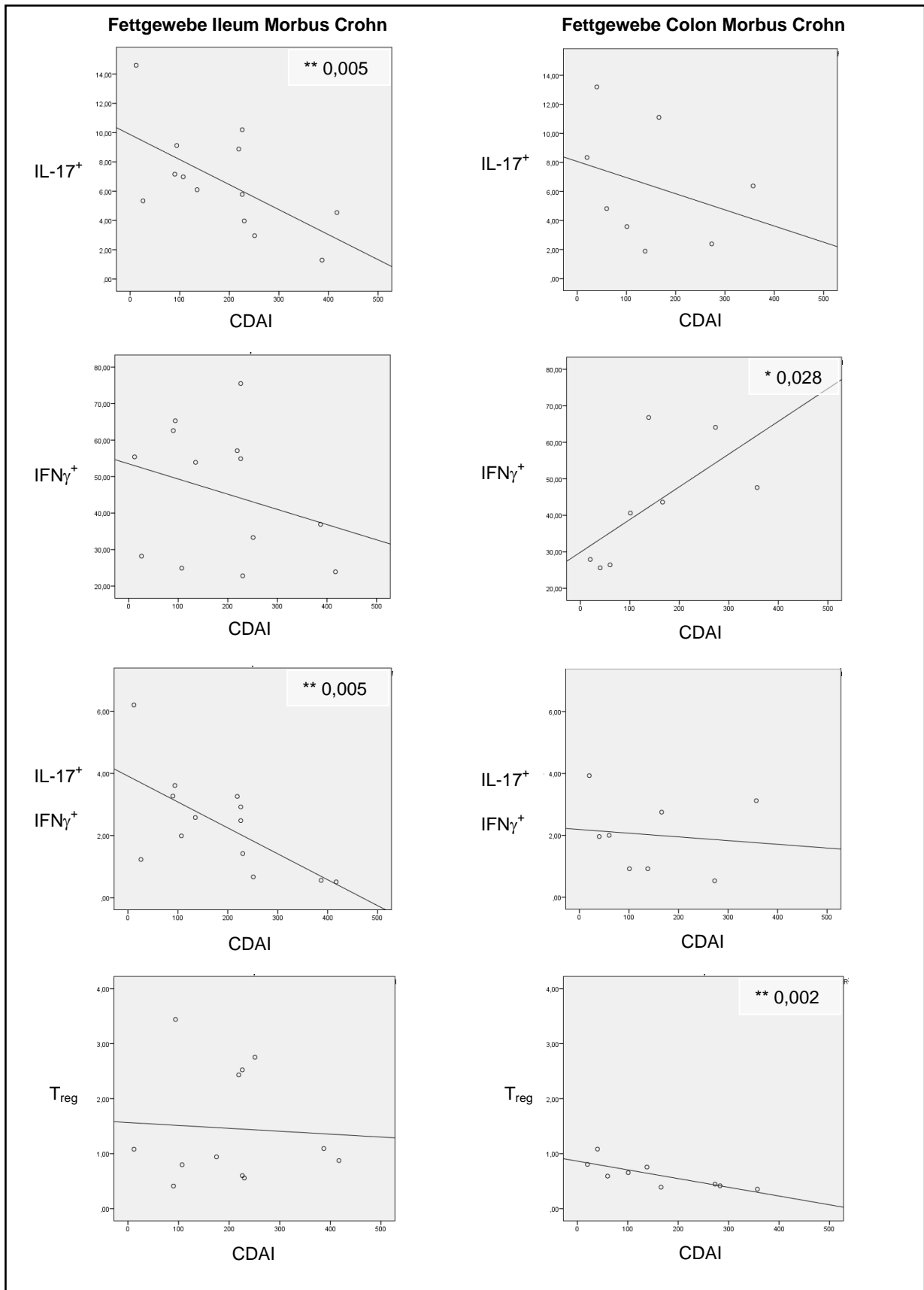
#### 4.6.2 Korrelationsanalyse der T-Zell-Subpopulationen mit klinischen Parametern

Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen dem Anteil  $\text{IFN}\gamma^+$ ,  $\text{IL-17}^+$ ,  $\text{IFN}\gamma^+\text{IL-17}^+$ -produzierender T-Zellen und  $T_{\text{reg}}$  mit dem BMI, der Erkrankungsdauer und dem Krankheitsaktivitätsindex (CDAI) der Patienten mit Morbus Crohn.

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem BMI und dem Anteil der verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen. Ebenso konnte keine Korrelation der Dauer der Erkrankung mit dem Vorkommen spezifischer T-Zellsubpopulationen festgestellt werden.

Bei der Korrelation mit dem CDAI (iMC, cMC) zeigte sich, dass mit zunehmender Krankheitsaktivität der Anteil IL-17-produzierender sowie IL-17- $\text{IFN}\gamma$ -koproduzierender T-Helferzellen im CF bei iMC signifikant abnahm (siehe **Abbildung 17**).

Im Gegensatz hierzu nahm der Anteil  $\text{IFN}\gamma$ -produzierender T-Helferzellen im mesocolischen Fettgewebe bei cMC mit der Krankheitsaktivität signifikant zu. Zudem zeigte sich eine Abnahme des  $T_{\text{reg}}$ -Anteils bei steigendem CDAI bei Patienten mit cMC, welcher bei Betrachtung des CF bei iMC nicht beobachtet werden konnte.



**Abbildung 17.** Korrelation von *Crohn's disease activity index* (CDAI) und T-Helferzell/T<sub>reg</sub>-Häufigkeit im *creeping fat* des Ileums und des Colons bei Patienten mit Morbus Crohn. Darstellung der Datenpunkte als Streudiagramm mit Ausgleichsgerade zur linearen Approximation. **Abkürzungen:** Interleukin (IL), Interferon (IFN), regulatorische T-Zelle (T<sub>reg</sub>). Verwendete statistische Methode: Spearman-Rangkorrelation. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

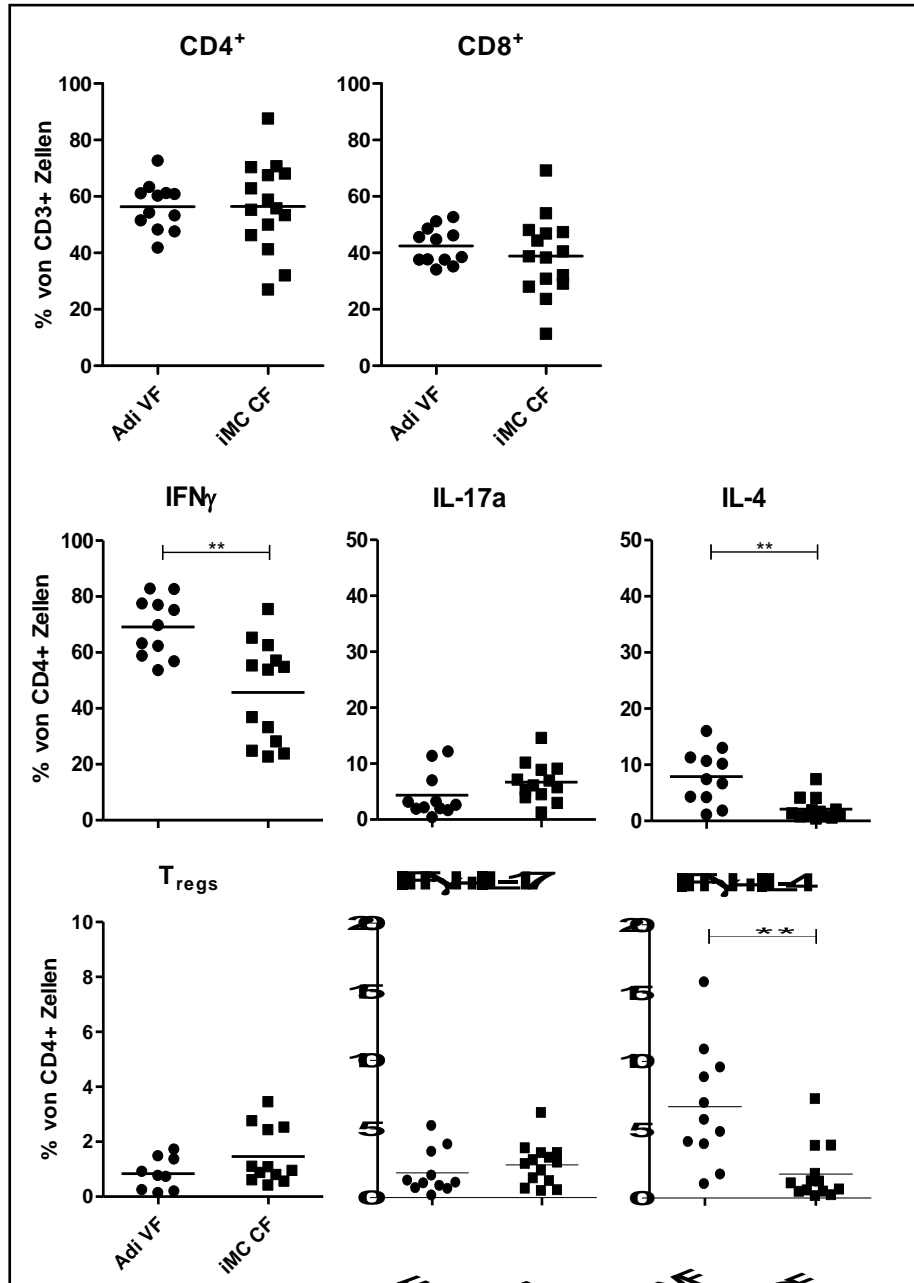
#### 4.7 *Creeping Fat* – Vergleich mit viszeralem Fettgewebe bei Adipositas

Hypertrophiertes viszerales Fettgewebe bei Adipositas *per magna* und das sogenannte *creeping fat* bei Patienten mit Morbus Crohn stellen zwei der wichtigsten Beispiele des Phänomens der Fettgewebsinflammation, also der zellulären Infiltration des Fettgewebes, dar. Hier werden diese beiden Kompartimente hinsichtlich der Verteilung ihrer jeweiligen T-Zell-Subpopulationen und somit ihres Entzündungsmilieus miteinander verglichen. Da sich die Fettgewebskompartimente bei Morbus Crohn als heterogen darstellten, wobei nur das ileale Fettgewebe die klassischen Charakteristika des *creeping fat* zeigte, erfolgt der Vergleich zum Fettgewebe des Ileums.

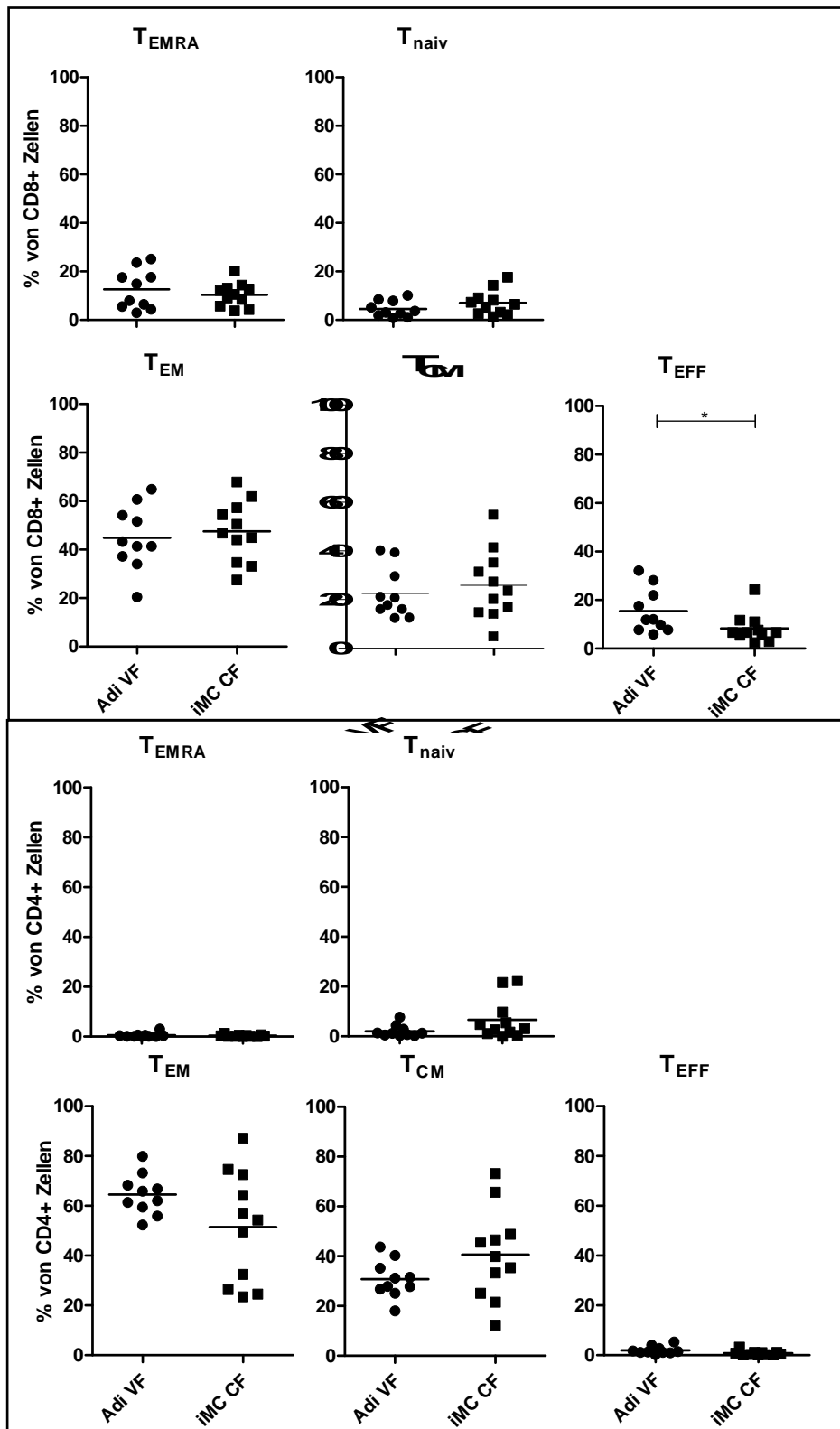
Im Vergleich zwischen VF bei adipösen Patienten und CF bei Patienten mit MC ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Anteils von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen (siehe **Abbildung 18**). Auffällig waren hingegen Unterschiede hinsichtlich der Zytokinexpression der aus dem Fett isolierten T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Hierbei produzierten Zellen aus dem VF zu einem signifikant höheren Anteil IFN $\gamma$  als CD4<sup>+</sup> Zellen aus dem CF von Patienten mit MC (p= 0,0038). Ebenfalls zeigte sich ein signifikant höherer Anteil IL-4<sup>+</sup> und IL-4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im VF bei Adipositas *per magna* (p= 0,0012 für IL-4<sup>+</sup>; p= 0,0014 für IL-4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>). Bei der Expression von IL-17 ergaben sich keine relevanten Unterschiede. Die Infiltration mit T<sub>regs</sub> schien etwas höher im ilealen CF zu sein, unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen VF und CF.

Die T-Gedächtniszell-Subpopulationen sind in **Abbildung 19** dargestellt. Im Vergleich zwischen VF von Patienten mit Adipositas *per magna* und mesenterialem Fettgewebe von Patienten mit MC zeigte sich ein signifikant höherer Anteil von Effektorzellen unter den CD8<sup>+</sup> Zellen.

Interessanterweise zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Vergleich zwischen VF und mesenterialem Fettgewebe von MC-Patienten bezüglich des Anteils von TCR $\gamma\delta$ -Zellen, wobei deren Anteil im VF signifikant höher war (p= 0,0065) (siehe **Abbildung 20**). Der Anteil von NKT-Zellen unterschied sich nicht zwischen den beiden Patientengruppen.

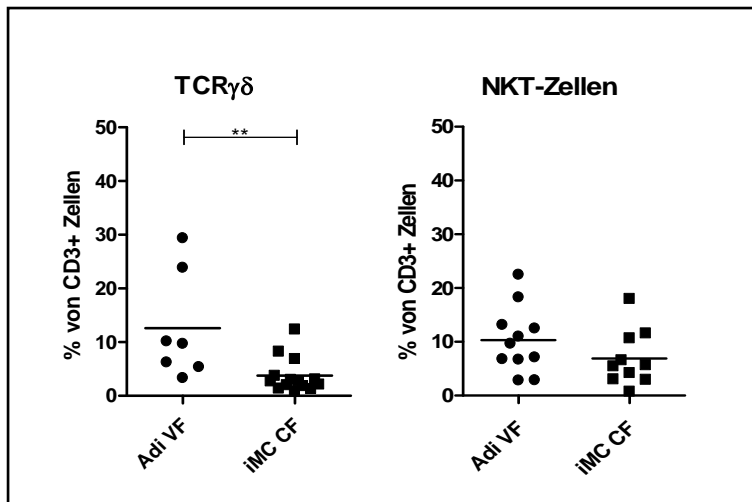


**Abbildung 18.** Anteil von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen, T-Helferzell-Subgruppen und regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) im Fettgewebe im Vergleich zwischen viszeralem Fettgewebe adipöser Patienten (Adi VF) und *creeping fat* von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC CF). **Abkürzungen:** Interferon  $\gamma$  (IFN), Interleukin (IL). Treg sind definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>high</sup>-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau p < 0,05 (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001).



**Abbildung 19.** Anteil von Memory-T-Zellen an CD8<sup>+</sup> Zellen im viszeralen Fettgewebe von Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi VF) und im *creeping fat* von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC CF). **Oben:** CD8<sup>+</sup>-Zellen, **Unten:** CD4<sup>+</sup>-Zellen. **Abkürzungen:** T<sub>EMRA</sub> (effector memory T-Zellen mit CD45RA-Expression, definiert als CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (effector memory T-Zellen, definiert als CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), T<sub>naiv</sub> (naive T-Zellen, definiert als CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), T<sub>CM</sub> (central memory T-Zellen, definiert als CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), T<sub>EFF</sub> (Effektor-T-Zellen, definiert als CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau p<0,05.



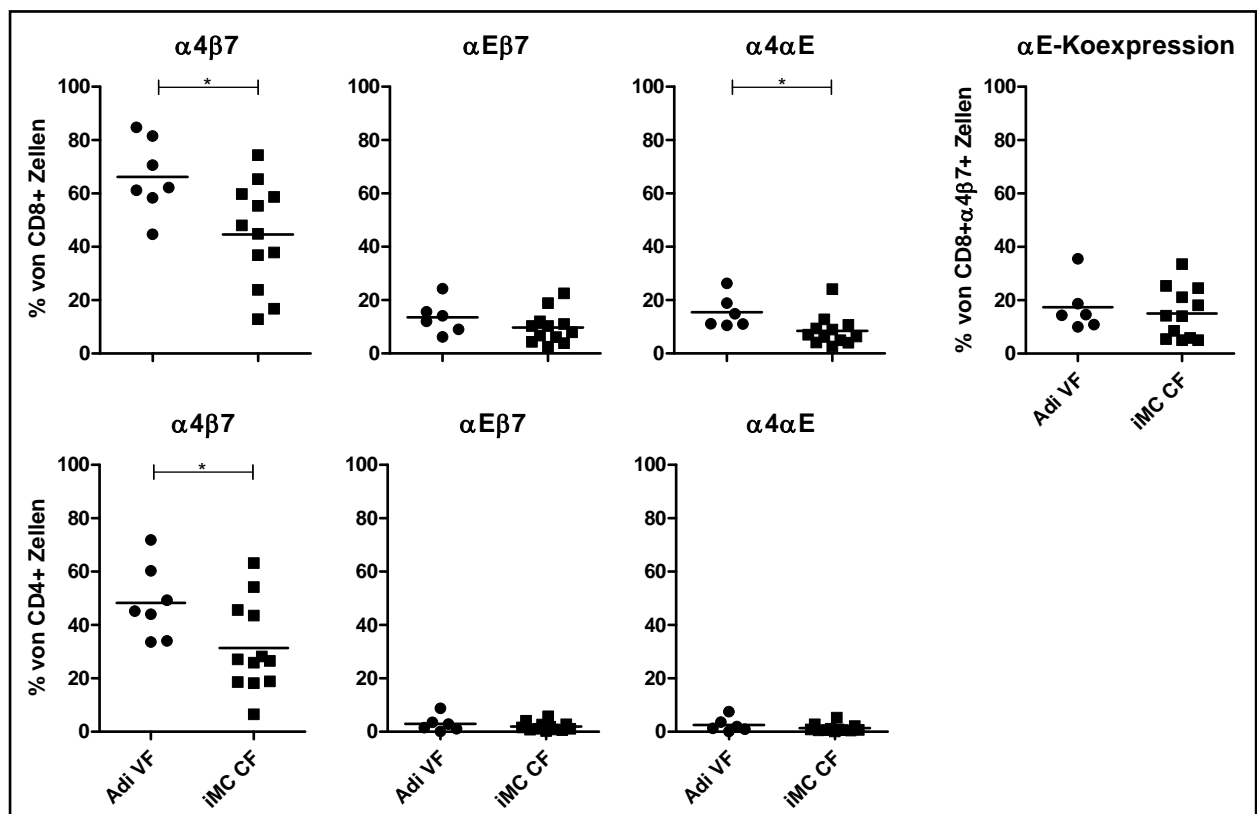


**Abbildung 20.** Anteil von TCR $\gamma\delta$  Zellen und natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) im viszeralem Fettgewebe von Patienten mit Adipositas *per magna* (Adi VF) und im *creeping fat* von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC CF). NKT sind definiert als CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau p<0,05 (\* p<0,05, \*\* p< 0,01).

#### 4.7.1 Expression von Darm-spezifischen *homing*-Rezeptoren

Trotz der größeren räumlichen Entfernung des VF zum Darm, war der Anteil  $\alpha 4\beta 7$ -exprimierender  $CD8^+$  Zellen bei adipösen Patienten im VF signifikant höher als bei MC-Patienten im CF ( $p=0,0312$ ) (**Abbildung 21**). Auch bei  $CD4^+$  Zellen zeigte sich dieser Unterschied, wenn auch der Anteil der  $\alpha 4\beta 7^+$ -Zellen hier insgesamt geringer war ( $p=0,0384$ ). Die  $\alpha E\beta 7$ -Expression unterschied sich nicht zwischen VF bei Adipositas und CF bei iMC. Eine Koexpression von  $\alpha 4$  und  $\alpha E$  zeigte sich im VF häufiger als im CF, insbesondere bei  $CD8^+$  Zellen ( $p=0,0131$ ). Beim Vergleich mit dem Anteil  $\alpha E\beta 7$ -tragender Zellen fiel dabei auf, dass der Wert im VF annähernd gleich war, was bedeutet, dass annähernd alle  $\alpha E$ -exprimierenden Zellen in diesem Gewebe auch  $\alpha 4$ -exprimierten.

Hingegen war der Anteil der  $\alpha E$ -koexprimierenden Zellen an allen  $\alpha 4\beta 7^+CD8^+$ -Zellen in den beiden Fettgewebekompartimenten vergleichbar.



**Abbildung 21.** Anteil von Integrin-exprimierenden Zellen an  $CD8^+$  und  $CD4^+$  Zellen im Vergleich zwischen viszeralem Fettgewebe adipöser Patienten (Adi VF) und *creeping fat* von Patienten mit Morbus Crohn des Ileums (iMC CF). **Oben:**  $CD8^+$ -Zellen. **Unten:**  $CD4^+$ -Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte. Verwendeter statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

## 5 Diskussion

### Allgemeines und Limitationen

Die komplexen immunologischen und endokrinen Funktionen des viszeralen/mesenterialen Fettgewebes und ihre Rolle im Rahmen verschiedenster Erkrankungen sind in den letzten Jahren Schwerpunkt zahlreicher Studien gewesen. In Zusammenschau der Erkenntnisse verschiedener Fachrichtungen wurde kürzlich eine Diskussion angeregt, das Mesenterium aufgrund seiner besonderen anatomischen und physiologischen Eigenschaften sowie seiner pathophysiologischen Rolle in verschiedenen Krankheitsprozessen als eigenes Organ zu betrachten (123). Hiermit wird die Bedeutung des mesenterialen Fettgewebes in Form einer Sonderstellung über die Energiespeicherfunktionen von Fettgewebe hinaus unterstrichen. Über die genauen Funktionen des mesenterialen Fettgewebes, insbesondere im Zusammenspiel mit intestinaler Entzündung, ist bisher nur wenig bekannt.

Dies ist nach aktuellem Stand die erste Arbeit, welche die T-Zell-Infiltration in verschiedenen krankheitsbedingten Ausprägungsformen von viszeralem/mesenterialem Fettgewebe vergleichend analysiert. Limitierend ist in diesem Zusammenhang die begrenzte Größe der Studienpopulation zu nennen, sowie die Tatsache, dass die Bearbeitung der Proben konsekutiv und nicht gesammelt erfolgte. Dies war jedoch nötig um eine möglichst realitätsnahe Abbildung der gewebsansässigen T-Zellen zu erhalten und einen hohen Anteil vitaler Zellen für die Stimulationsansätze zu gewährleisten. In den CED-Gruppen war der überwiegende Anteil der Patienten unter immunsuppressiver Therapie oder medikamentös vorbehandelt. Dies ist eine häufige Situation in der CED-Forschung, da es aufgrund der verfügbaren Medikamente nur sehr selten unbehandelte Patienten mit CED gibt und insbesondere Patienten mit Operationsindikation, wie es Voraussetzung für diese Studie war, meist unter dem Einfluss von Immunsuppressiva und Biologika stehen oder gestanden haben. Somit bildet diese Arbeit in Hinsicht auf die medikamentöse Vorbehandlung der eingeschlossenen Patienten keine Ausnahme im wissenschaftlichen Vergleich.

## **Adipositas – subkutanes und viszerales Fettgewebe**

Die Untersuchung des viszeralen und subkutanen Fettgewebes von Patienten mit Adipositas *per magna* stellt einerseits einen eigenen Schwerpunkt der Fragestellung dieser Arbeit dar, zum anderen diente sie als Grundlage als Vergleich mit dem *creeping fat* bei Morbus Crohn, da im viszeralen Fettgewebe ein typisches Beispiel von Fettgewebsinflammation vorbeschrieben ist (6, 124). Die eingewanderten Makrophagen im hypertrophierten Fettgewebe wurden als vorwiegend pro-inflammatorisch beschrieben während im Fettgewebe normalgewichtiger Individuen ein von sogenannten M2-Makrophagen dominiertes Milieu mit eher anti-inflammatorischer Funktion identifiziert wurde (6).

Bereits histologisch zeigte sich im vorliegenden Patientenkollektiv eine stärkere Immunzellinfiltration des viszeralen im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe, auch bezüglich der T-Zell-Infiltration. Adipozytengröße und Fibrosierungsgrad unterschieden sich nicht voneinander (**Abbildung 6**). Verboven et al. untersuchten kürzlich die Adipozytengröße im subkutanen und viszeralen Fettgewebe adipöser Männer mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich mit normalgewichtigen Männern, wobei auch hier kein Unterschied in der Adipozytengröße im Vergleich der beiden Lokalisationen festgestellt werden konnte (125).

Die aus Fettgewebsüberständen ermittelte spontane Zytokinexpression ergab einzig eine hohe messbare IL-6 und IL-8 Expression bei sehr starken Schwankungen zwischen den Probanden (**Abbildung 7**). Interessanterweise lag sowohl im VF als auch im SF nur eine geringe Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1- $\beta$  vor, ebenso wie eine geringe Expression des anti-inflammatorischen IL-10. Eine Erklärung könnte die Messung der Spontansekretion bei fehlender externer Stimulation sein. In einer aktuellen Studie von Rakotoarivelo et al. aus Kanada wurden Zytokine aus dem VF und SF bariatrischer Patienten mit und ohne Diabetes extrahiert und auch hier zeigte sich eine kaum messbare Menge von sezerniertem TNF $\alpha$  und IL-1- $\beta$  (126). Lediglich IL-6 war im VF adipöser Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht und im SF signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Genetische Untersuchungen ergaben eine große Variabilität zwischen einzelnen Patienten, womit diese Studie insgesamt die Komplexität der Zytokinexpression im adipösen Fettgewebe unterstreicht und betont, dass bisher kein bekanntes Zytokin gut mit der Inflammation im viszeralen Fettgewebe und der Entwicklung von Typ 2 Diabetes korreliert. (126)

Um einen Einblick in das zelluläre Milieu des VF und SF adipöser Patienten zu erhalten, wurden T-Zell-Subpopulationen im Fettgewebe mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dabei sollte die in der Histologie gezeigte, absolut höhere Infiltration des VF im Vergleich zum SF im Hinblick auf die relativen Daten der Durchflusszytometrie bedacht werden.

Bei der Charakterisierung der T-Zellen im VF im Vergleich mit dem SF fiel eine entgegengesetzte CD4/CD8-Zell-Verteilung auf, wobei im VF mehr CD8<sup>+</sup> und weniger CD4<sup>+</sup> Zellen unter der T-Zellpopulation zu finden waren als im SF. Hinsichtlich der Zytokinproduktion nach Stimulation zeigte sich ein Trend zu mehr IFN $\gamma$ -Expression und mehr IL-4-Expression im VF, wobei dies vermutlich ein Gleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Antwort darstellt (**Abbildung 8**).

Auffällig war der Unterschied im Anteil von T<sub>regs</sub> in diesen beiden Lokalisationen mit einem signifikant höheren Anteil im SF im Vergleich zum VF. Diese Erkenntnisse unterstützen Daten aus vorherigen Studien, in denen sowohl im Mausmodell als auch in humanem viszeralem Fettgewebe eine Verringerung des Anteils regulatorischer T-Zellen bei steigendem Gewicht identifiziert wurde (5, 89).

Bei Betrachtung des Gedächtnis-Status fiel insbesondere eine Verlagerung des *effector*- und *central memory* – Verhältnisses auf, wobei dieses im VF zugunsten der T<sub>EM</sub> und im SF zugunsten der T<sub>CM</sub> Zellen verschoben war. Dies zeigte sich sowohl in der CD4<sup>+</sup> als auch in der CD8<sup>+</sup>-Population (**Abbildung 9**). Obwohl bezüglich des *Memory*-Status fettgewebsansässiger T-Zellen bisher keine Vordaten existieren, passen diese Daten zur bereits zahlreich validierten Hypothese einer aktiven Beteiligung der T-Zellen an pro-inflammatorischen Prozessen im viszeralem Fettgewebe, da *effector memory* T-Zellen im Gegensatz zu *central memory* T-Zellen in entzündeten Geweben Effektorfunktionen ausüben können (83).

McLaughlin et al. untersuchten 2014 einzelne T-Zell-Subpopulationen im viszeralem und subkutanen Fettgewebe bariatrischer Patienten (91). Hierbei wurden ausdrücklich Patienten ohne manifesten Diabetes Typ II ausgewählt, wobei jedoch ein Großteil der Patienten eine Insulinresistenz aufwies. Der Durchschnitts-BMI lag mit  $45,3 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$  leicht unter dem in der vorliegenden Arbeit ( $49,0 \pm 8.3 \text{ kg/m}^2$ ), die Gruppengröße war mit einer Anzahl von n= 10 vergleichbar. In dieser Studie konnte ein signifikant höherer Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen an allen T-Zellen im SF gegenüber dem VF, bei überwiegender

T<sub>H</sub>1-Antwort im VF (definiert als IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) festgestellt werden, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Zusätzlich fiel in der beschriebenen Studie ein höherer Anteil an T<sub>H</sub>17-Zellen (definiert als IL-17<sup>+</sup>), sowie mehr IFN $\gamma$ -exprimierende CD8<sup>+</sup>-Zellen im VF auf. Allerdings fand sich in dieser Stichprobe kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des T<sub>reg</sub>-Anteils an den CD4<sup>+</sup>-Zellen (definiert als FoxP3<sup>+</sup>), tatsächlich überwog dabei die T<sub>reg</sub>-Population im VF tendenziell die der im SF (91).

Dies steht im Gegensatz zur Beobachtung der vorliegenden Arbeit, in welcher ein signifikant höherer Anteil von CCR4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>high</sup>- T-Zellen an CD4<sup>+</sup>-Zellen im SF adipöser Patienten zu finden war. Gründe dafür könnten die unterschiedlich gewählten Definitionen dieser Subgruppe sein, ebenso wie die Abweichung in der Zusammensetzung der Stichprobe, die in der vorliegenden Arbeit aus Individuen mit einem etwas höheren BMI und insbesondere einem hohen Anteil von Patienten mit manifestem Typ II Diabetes bestand. Die Identifikation von Patienten mit einem MHO-Status, d.h. ohne relevante metabolische Komplikationen trotz Adipositas (17), zeigt, dass die Adipositas ein sehr heterogenes Krankheitsbild ist, wobei bisher noch nicht vollständig verstanden ist, welche Mechanismen zu den verschiedenen Ausprägungsformen führen. Das Patientenkollektiv in der vorliegenden Arbeit bestand zum größten Teil aus Patienten mit metabolischen Begleiterkrankungen (siehe **Tabelle 6**). Dies liegt insbesondere an der Entnahmeform des Gewebes im Rahmen eines bariatrischen Eingriffs, da schwere metabolische Komorbiditäten eine wesentliche Indikation für die operativen Eingriffe darstellten. Es bleibt anzumerken, dass beim Vergleich von Studien an viszeralem Fettgewebe von Patienten mit Adipositas die Zusammenstellung von Patientenkollektiven kritisch zu hinterfragen ist, da vermutlich eine heterogene individuelle Stoffwechsellage und damit auch Entzündungslage im viszeralen und subkutanen Fettgewebe besteht.

In dieser Arbeit wurde erstmalig auch die Expression von darmspezifischen *homing*-Integrinen auf T-Zellen im viszeralen und subkutanen Fettgewebe bei Adipositas untersucht. Ein Grund für die Fragestellung ist die noch immer anhaltende Diskussion, ob es spezifische *homing*-Rezeptoren für das Fettgewebe gibt und ob sich diese hinsichtlich verschiedener Fettgewebs-Lokalisationen unterscheiden. Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Studienpopulation eine signifikant höhere Expression des darmspezifischen *homing*-Integrins  $\alpha 4\beta 7$  im viszeralen Fettgewebe (**Abbildung 10**). Nach bisheriger Kenntnislage könnte Übergewicht neben

metabolischer Dysregulation auch mit einer Integritätsstörung der intestinalen Barriere assoziiert sein. Dies suggerieren beispielsweise Studien an adipösen Mäusen, die eine intestinale Entzündung aufwiesen (33). Auch eine Studie mit übergewichtigen Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) zeigt, dass diese im Vergleich zu normalgewichtigen Patienten erhöhte Plasmaspiegel des bakteriellen Antigens LPS im Blut aufweisen, was auf eine vermehrte Durchlässigkeit des Darmepithels hindeutet (32). Einen weiteren Hinweis auf eine Assoziation zwischen viszeralem Fettgewebe und Barrieredefekt lieferten 2011 Gummessen et al., welche zeigten, dass gesunde Frauen mit höherer intestinaler Permeabilität eine Vermehrung des viszeralen Fettgewebes aufwiesen (127). Ob hierbei das viszerale Fettgewebe den Barrieredefekt oder anders herum der Barrieredefekt die Akkumulation von viszeralem Fettgewebe begünstigte, wurde allerdings nicht geklärt. Es zeigte sich eine größere Assoziation von Hüftumfang und viszeraler Fettgewebsmenge mit Barriestörungen im Colon als im Ileum (127). Interessanterweise haben Studien zur Verteilung von  $\alpha 4\beta 7$ -Zellen gezeigt, dass diese schon bei gesunden Personen häufiger im Colon als im Ileum lokalisiert sind (128).

Zusammenfassend wurden, wie in Vorarbeiten schon teilweise beschrieben, auch in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der T-Zell-Populationen zwischen VF und SF von Patienten mit Adipositas *per magna* festgestellt, so in der CD4/CD8-Verteilung, dem Anteil regulatorischer T-Zellen und in der Zusammensetzung des Gedächtnis-T-Zell-Kompartiments. Insbesondere das Überwiegen der  $T_{regs}$  im subkutanen Fettgewebe bei Patienten in dieser Studie unterstreicht die unterschiedlichen Milieus die in den verschiedenen Fettgewebekompartimenten herrschen. Eine neue Erkenntnis in dieser Arbeit ist das im VF deutlich vermehrte Vorkommen  $\alpha 4\beta 7$ -positiver T-Zellen, welche aus dem pro-inflammatorischen Milieu dieses Gewebes heraus die Fähigkeit zum darmspezifischen *homing* haben und eine potentielle Verbindung zwischen viszeraler Fettgewebsinflammation und intestinaler Barriestörung aufweisen. Mögliche Bedeutungen für pathogene Mechanismen bei adipösen Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung werden an späterer Stelle diskutiert.

## **Morbus Crohn - Mukosa und Fettgewebe**

Die T-Zell-Infiltration in entzündeter Darmmukosa bei Patienten mit CED wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Dabei wurden initial  $T_H1$ -Zellen als zentrale Akteure in der chronischen Entzündung identifiziert (77). Allerdings zeigten sich bald  $T_H17$  sowie auch  $IFN\gamma$  und IL-17-koproduzierende T-Helferzellen als Zellgruppen, welche spezifisch in entzündeten Mukosaabschnitten akkumulieren (79). Die Auswirkungen der von ihnen produzierten Zytokine, unter anderem IL-17, werden kontrovers diskutiert. Obwohl IL-17 die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine fördert (129), führte die Blockade von IL-17 in verschiedenen Studien zu einer Verschlechterung der Colitis im Mausmodell (130), sowie auch zu einem ausbleibenden Effekt in klinischen Studien bei Patienten mit Morbus Crohn (131). IL-23 stellt einen wichtigen Faktor für die Expression von IL-17 und die Entwicklung von IL-17/ $IFN\gamma$ -koproduzierenden T-Zellen dar (129). Des Weiteren konnte eine hohe IL-23-Konzentration im terminalen Ileum nachgewiesen werden (132). Auch aufgrund dieser Beobachtung bei gleichzeitiger bevorzugter Krankheitslokalisation des Morbus Crohn im terminalen Ileum werden die IL-23-assoziierten Zytokin- und  $T_H17$ -Veränderungen als krankheitssteuernde Mechanismen angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das bereits vorbeschriebene Vorkommen von  $T_H17$ -Zellen und IL-17/ $IFN\gamma$ -koproduzierenden T-Zellen im entzündeten Ileum bestätigt. Sowohl in der Colonmukosa von Crohn-Patienten als auch CU-Patienten war diese Zellgruppe weniger stark ausgeprägt. Dafür zeigte sich auch ein höherer  $T_{reg}$ -Anteil in der ilealen Mukosa. Auch dies passt zu Vordaten, welche einen erhöhten Anteil von  $T_{reg}$  in entzündlich veränderter Mukosa bei Morbus Crohn feststellten (93). Zur Frage weshalb diese Zellen ihre regulatorische Funktion bei diesen Patienten nicht ausreichend ausüben können, stehen verschiedene Erklärungskonzepte im Raum, beispielsweise ein Defekt des IL-10-Rezeptors (96).

Die vergleichende Untersuchung von mesenterialem und mesocolischem Fettgewebe in dieser Arbeit stellt eine Neuerung dar, dementsprechend existieren bisher keine Daten zum Vergleich. Während die CD4 und CD8 Verteilung noch vergleichbar zwischen Mukosa und Fettgewebe war, zeigten sich auffällige Unterschiede insbesondere in Hinblick auf T-Helferzellen und Gedächtnis-T-Zellen.

Insbesondere bei Patienten mit ilealer Erkrankungslokalisation zeigten sich signifikante Unterschiede der T-Zellpopulationen zwischen mesenterialem Fettgewebe und Mukosa.



Dabei wurde eine Dominanz von  $T_{reg}$ ,  $T_H17$ -Zellen, IL-17/IFN $\gamma$ -koproduzierenden T-Zellen und TCR $\gamma\delta$ -Zellen in der Mukosa, jedoch mehr  $T_H1$ -Zellen,  $T_{CM}$ -Zellen,  $T_{EMRA}$ -Zellen im mesenterialen Fettgewebe festgestellt (**Abbildungen 13-15**). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die charakteristischen T-Zellpopulationen im mesenterialen Fettgewebe nicht in ähnlichem Maße vorhanden waren.

Diese Erkenntnisse liefern einen Hinweis darauf, dass, ähnlich wie im Makrophagenkompartiment, Fettgewebe und Mukosa unterschiedliche T-Zellkompartimente enthält. Selbstverständlich lässt sich noch keine Aussage über Ursprung und Migrationsweise der T-Zellen treffen. Allerdings bestärken die Ergebnisse die Hypothese, dass die fettgewebsansässigen T-Zellen eine eigenständige Funktion im Rahmen der intestinalen Entzündung ausüben.

Bei Patienten mit Morbus Crohn kann ein Befall des gesamten Gastrointestinaltraktes auftreten, wobei eine Beteiligung des Ileums und/ oder des Colons am häufigsten ist (133, 134). Mittlerweile verstärken sich die Hinweise auf eine interne Subgruppierung von Morbus Crohn des Ileums und des Colons als distinkte Erkrankungen: klinische Unterschiede, beispielsweise ein besseres Ansprechen von Patienten mit Morbus Crohn des Colons auf anti-TNF $\alpha$ -Therapie (135), sowie Veränderungen des Mikrobioms, welche charakteristisch für ilealen Morbus Crohn zu sein scheinen (136). Am deutlichsten zeigen sich Unterschiede bei Betrachtung von genetischen Assoziationen. So zeigen Patienten mit ilealem Morbus Crohn vorrangig eine Assoziation zu Genen der *NOD2*-Familie (137), während ein Befall des Colons vorwiegend mit Genen der *HLA-DRB1*-Gruppe assoziiert ist (138). Bei der Betrachtung von Genen, die mit Morbus Crohn beziehungsweise Colitis ulcerosa assoziiert sind, stellte sich heraus, dass sich diese Patienten genetisch intermediär zwischen Patienten mit ilealem Morbus Crohn und Colitis ulcerosa befinden (139). Diese Daten unterstützen eine weitere aktuelle Studie, die zeigt, dass das Mikrobiom bei Patienten mit Morbus Crohn des Colons eher dem von Patienten mit Colitis ulcerosa ähnelt als Patienten mit ilealem Morbus Crohn (140).

Hinsichtlich des *creeping fat* stellt sich die Frage: In welchem Zusammenhang kann man von *creeping fat* sprechen? In der bisherigen Literatur berücksichtigt der Begriff keinen spezifischen Abschnitt des Darms. Die originale Beschreibung der Erkrankung wie auch des Phänomens des *creeping fat* durch Burrill B. Crohn bezieht sich nur auf die ileale Erkrankung (Ileitis terminalis) (44). Frühere Studien zur Morphologie des

*creeping fat* bestätigen nur eine typischere, leichter identifizierbare Ausprägung des *creeping fat* im Dünndarm im Vergleich zum Dickdarm (60). Zur weiteren Differenzierung des *creeping fat* zwischen mesenterialem Fettgewebe des Ileums und des Colons liegen zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine Daten vor.

Bei der makroskopischen Betrachtung des mesenterialen Fettgewebes an Resektaten des Ileums und des Colons in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nur das ileale *creeping fat* die zirkumferenzielle Ummantelung des Darms bei allen Patienten aufwies (**Abbildung 5**). Aufgrund dieser Varianten ist in dieser Arbeit neben der Auswertung als *creeping fat* der Gesamtheit der Patienten mit Morbus Crohn auch eine Untergruppierung vorgenommen worden, die die morphologischen Varianten zwischen *creeping fat* des Ileums und des Colons berücksichtigt.

Bei der histologischen Untersuchung fielen bereits bei der Adipozytengröße Unterschiede zwischen den verschiedenen viszeralen Kompartimenten auf (**Abbildung 6**). Im Gegensatz zu den hypertrophierten Adipozyten im VF adipöser Patienten zeigten die Adipozyten bei Morbus Crohn des Colons und Colitis ulcerosa einen geringeren Durchmesser von circa 100µm. Für das *creeping fat* ist eine Hyperplasie von Adipozyten mit einem verkleinerten Durchmesser vorbeschrieben (9). Diese bei der typischen Fettgewebshyperplasie des *creeping fat* bekannte Verkleinerung des Adipozytendurchmessers zeigten in diesem Patientenkollektiv nur die Zellen im ilealen *creeping fat*. Ebenfalls war im mesenterialen Kompartiment bei iMC eine stärkere Infiltration des Gewebes mit CD3<sup>+</sup> Zellen, sowie ein erhöhter Anteil der fibrosierten Areale im Vergleich zu den cMC- und CU-Gruppen zu beobachten. Dabei zeigte sich, dass die beiden colonnahen Fettgewebskompartimente sich in der histologischen Struktur ähnlicher waren als die Gruppen mit Morbus Crohn des Ileums und des Colons. Hinsichtlich des Grades der Entzündung anhand des Immunzell-Infiltrations-Scores lag das Gewebe der cMC-Gruppe intermediär zwischen der iMC-Gruppe mit einer hohen und der CU-Gruppe mit einer geringen Immunzellinfiltration. Nach bisherigem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, in der histologische Charakteristika in mesocolischem Fettgewebe untersucht wurden.

Bei der Analyse des Zytokinmilieus in den verschiedenen Fettgewebskompartimenten zeigte sich eine hohe Expression von IL-6 und IL-8 in allen Gruppen (**Abbildung 7**). Die Menge an IL-1 $\beta$  sowie TNF $\alpha$  war interessanterweise in den Überständen aus ilealem Fettgewebe gering, wobei im mesocolischen Fettgewebe bei Morbus Crohn eine

höhere Expression vorlag. Die Menge an IL-10 war tendenziell auch höher im colonnahen Fettgewebe als im ilealen *creeping fat*. Insgesamt fiel eine hohe Variabilität der Zytokinexpression auf. Für weiterführende Studien könnte die Einbeziehung anderer Zytokine und auch Adipokine (Leptin/Adiponektin) interessant sein, wobei auch eine größere Studienpopulation zur Bestätigung der Ergebnisse nötig ist.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Identifizierung relevanter T-Zellpopulationen und ihrer Zytokinproduktion, welche den Fettgewebsüberständen und nicht einzelnen Zellen zuzuordnen ist. Daher erfolgte die Isolation, antikörpervermittelte Färbung und durchflusszytometrische Analyse von mononukleären Zellen im Fettgewebe. Dabei fielen distinkte Unterschiede zwischen der Zusammensetzung des T-Zell-Kompartiments zwischen MC und CU einerseits, sowie *creeping fat* des Ileums und des Colons andererseits auf, wobei der quantitative Unterschied in der histologischen T-Zell-Infiltration weiterhin berücksichtigt werden sollte.

Das ileale *creeping fat* zeichnete sich durch ein ausgeglichenes CD4/CD8-Verhältnis aus, wobei die CD4<sup>+</sup> Zellen insbesondere aus T<sub>H</sub>1-Zellen bestanden, jedoch auch T<sub>reg</sub> vorhanden waren (**Abbildung 13**). Im Vergleich zum colonnahen *creeping fat* fand sich im ilealen *creeping fat* ein höherer Anteil von T<sub>regs</sub> bei ansonsten ähnlicher T<sub>H</sub>-Zell-Differenzierung. Zudem waren im Colon-nahen CF eher mehr Effektorzellen ansässig, während im ilealen *creeping fat* ein höherer T<sub>CM</sub>-Anteil vorherrschte. Diese Unterschiede waren im mesocolische Fettgewebe bei CU-Patienten teilweise noch stärker ausgeprägt, wobei das mesocolische *creeping fat* von MC-Patienten hinsichtlich der T-Zellsubgruppen wieder zwischen ilealem *creeping fat* und mesocolischem Fettgewebe bei CU lag (**Abbildung 14**).

Im Vergleich zwischen der Mukosa und dem angrenzenden *creeping fat* fiel bereits auf, dass eine Reihe von Zellen, die typischerweise in entzündeten Mukosaabschnitten bei Morbus Crohn zu finden sind, nicht oder nur in geringer Form im angrenzenden Fettgewebe zu finden waren. Dazu gehörten T<sub>H</sub>17-Zellen, sowie IFN $\gamma$ -IL-17-koproduzierende Helferzellen, die bereits als spezifisch für entzündete Läsionen bei Morbus Crohn beschrieben sind (79) und auch in den hier getesteten Gewebeproben signifikant häufiger in der Mukosa als im Fettgewebe auftraten. Auch die Zusammensetzung der Gedächtnis-T-Zellen variierte stark zwischen Fettgewebe und Mukosa. Diese Ansammlung von distinkten T-Zell-Kompartimenten in den beiden Geweben lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass eine der T-Zellpopulationen aus

der anderen hervorgegangen ist, indem beispielsweise die Immunzellen aus dem Darm in das angrenzende mesenteriale Fettgewebe migrieren. Vielmehr lässt sie vermuten, dass diese T-Zellen auf bestimmte chemotaktische Reize hin aus dem Blut in dieses Gewebe eingewandert sind und allenfalls ein geringer Anteil von Zellen aus der Mukosa in das nahegelegene Fettgewebe übergetreten ist.

Eine Hypothese zu Entstehung und Funktion von *creeping fat* ist, dass es im Rahmen des Barrieredefekts in Läsionen bei MC zu einer bakteriellen Translokation in das mesenteriale Fettgewebe kommt (57). Hier könnte es wiederum zu einer Aktivierung von Adipozyten kommen, die mit der Ausschüttung von Adipokinen reagieren. Eine Infiltration mit Immunzellen wäre die Folge, wobei bisher nicht klar ist, ob zunächst Makrophagen oder T-Zellen das Fettgewebe infiltrieren. Die Daten dieser Studie könnten die Hypothese stützen, dass das *creeping fat* eine Art mechanische und immunologische Barriere bildet, die eine systemische Ausbreitung dieser Bakterien verhindert. Hierzu sind sowohl pro-inflammatorische Anteile zur aktiven Bekämpfung der Erreger vorhanden, als auch regulatorische Zellen, die möglicherweise die nahe gelegene intestinale Entzündung anti-inflammatorisch beeinflussen könnten.

Im *creeping fat* zeigte sich das darmassoziierte *homing*-Integrin  $\alpha 4\beta 7$  auf einem Großteil der T-Zellen, auch hier vorwiegend auf CD8<sup>+</sup>-Zellen (**Abbildung 16**). Hingegen dominierte der Residenz-Marker  $\alpha E\beta 7$  auf T-Zellen in der angrenzenden Mukosa. Man kann hier von einem Wechsel dieses Integrins bei Eintritt in den Darm von  $\alpha 4\beta 7$  zu  $\alpha E\beta 7$  ausgehen, der einen Verbleib dieser Zellen im Darm zur Folge hat (111). Die Expression von  $\alpha 4\beta 7$  auf T-Zellen im *creeping fat* zeigt, dass diese Zellen zur Einwanderung in den Darm in der Lage sind. Da das inflammatorische Milieu in diesem Gewebe eher ausgeglichen ist und T-Zellen mit pro-, als auch anti-inflammatorischem Phänotyp zu finden sind, ist es schwierig eine Hypothese über den Einfluss dieser Zellen auf die intestinale Entzündung bei Morbus Crohn aufzustellen. Es lässt sich die Vermutung bestärken, dass das *creeping fat* im Austausch mit dem angrenzenden intestinalen Gewebe steht und sowohl Vorgänge im Fett, wie auch Auswirkungen vom Fett auf den Darm eine aktive Beteiligung im Rahmen des Morbus Crohn haben könnten.

Die zwischen den Lokalisationen Ileum und Colon gefundenen Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und zellulären Zusammensetzung des *creeping fat* stehen in einer Reihe von lokalisationsbezogenen Abweichungen des Immunzellvorkommens

im Gastrointestinaltrakt. Bereits im Gastrointestinaltrakt gesunder Probanden konnten lokalisationsabhängige Unterschiede der Integrinexpression sowohl für Integrin  $\alpha 4\beta 7$  als auch für  $\alpha E\beta 7$  gezeigt werden. Dabei scheint physiologischerweise der Anteil der Integrin- $\alpha E\beta 7$ -exprimierenden Zellen in der Mukosa im Verlauf vom Ileum zum Colon descendens abzunehmen, wobei der Anteil der Integrin  $\alpha 4\beta 7$ -exprimierenden Zellen zunimmt (128, 141).

Letztendlich blieb die Frage, ob und inwiefern sich Unterschiede im Entzündungsverhalten des ilealen und colonischen Fettgewebes in der systemischen Krankheitsausprägung widerspiegeln. Hierzu wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität von Morbus Crohn-Patienten und im Fettgewebe vorkommender, für die Entzündungsreaktion bei Morbus Crohn typischer  $T_H$ -Zellen und  $T_{reg}$  untersucht. Ziel war es, mehr über den Zusammenhang des Vorkommens bestimmter Zellpopulationen mit der Krankheitsaktivität im Rahmen der intestinalen Entzündung bei Morbus Crohn zu erfahren. Dazu wurden die bei Morbus Crohn in der mukosalen Entzündung typischerweise vorkommenden  $T_H1$ -,  $T_H17$ - und  $IFN\gamma^+IL-17^+$  T-Zellen sowie  $T_{regs}$  zwischen *creeping fat* des Ileums und des Colons miteinander verglichen. Zu bedenken ist hierbei, dass es sich um relative Werte handelt, während in der histologischen Untersuchung auch ein großer quantitativer Unterschied in der T-Zell-Infiltration dieser Gruppen identifiziert wurde. Zudem handelt es sich um statistisch signifikante Korrelationen, was jedoch nicht ausschließt, dass ein dritter Faktor, wie zum Beispiel die Therapie von Patienten mit hoher/ geringer Krankheitsaktivität, beide untersuchten Parameter in eine Richtung verändert.

Systemisch schwer kranke Patienten zeigen eine andere Zusammensetzung des T-Helferzell-Kompartiments als klinisch in Remission befindliche Patienten (**Abbildung 17**). Überraschenderweise zeigte sich kein positiver Zusammenhang zwischen dem  $T_H17$ -Anteil und der Krankheitsaktivität sowohl bei Morbus Crohn des Ileums als auch des Colons. Im ilealen *creeping fat* war sogar eine signifikante negative Korrelation festzustellen. In einer Studie von Schmechler et al. wurde bereits der Zusammenhang zwischen systemischer Zytokinexpression und der Krankheitsaktivität untersucht, wobei sich im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ein klarer positiver Zusammenhang zwischen der Menge von IL-22, einem  $T_H17$ - Zytokin, und dem CDAI bei Morbus Crohn-Patienten zeigte (142).

Im colonnahen Fettgewebe korrelierte der Anteil der T<sub>H</sub>1-Zellen positiv mit dem CDAI, sodass Patienten mit höherer Krankheitsaktivität auch einen höheren Anteil pro-inflammatorischer T<sub>H</sub>-Zellen im Fettgewebe aufwiesen. Im *creeping fat* des Ileums zeigte sich hingegen eher eine Tendenz zur negativen Korrelation. Insgesamt war im mesocolischen *creeping fat* von Patienten mit cMC bei höherer Krankheitsaktivität der Anteil pro-inflammatorischer T<sub>H</sub>1-Zellen erhöht, während der Anteil der T<sub>regs</sub> abnahm. Im *creeping fat* des Ileums war interessanterweise bei höherer Krankheitsaktivität der Anteil von T<sub>H</sub>17-Zellen und doppelt-positiven T<sub>H</sub>-Zellen vermindert und der Anteil der T<sub>regs</sub> blieb konstant.

Das *creeping fat* des Colons war somit bei Patienten mit höherer Krankheitsaktivität auch von einer eher pro-inflammatorischen T<sub>H</sub>-Population infiltriert, während der Anteil der T<sub>regs</sub> abnahm. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich im colonnahen Fettgewebe eher die intestinalen Entzündungsvorgänge widerspiegeln. Im CF des Ileums hingegen waren auch bei hoher Krankheitsaktivität regulatorische T-Zellen vorhanden und das T<sub>H</sub>-Kompartiment zeigte nur wenige Morbus Crohn-typische T<sub>H</sub>17 und IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>Zellen, sowie eine fehlende Zunahme des T<sub>H</sub>1-Anteils. Dies deutet darauf hin, dass die Infiltration mit T-Zellen im CF des Ileums insbesondere bei hoher Krankheitsaktivität von der für Morbus Crohn typischen T<sub>H</sub>-Zell-Zusammensetzung der Mukosa abweicht, eventuell sogar einen gegenregulatorisches Milieu aufweist.

Diese Arbeit deutet erstmals Unterschiede des histologischen Aufbaus, der zellulären Zusammensetzung sowie der Assoziation zur Krankheitsaktivität zwischen *creeping fat* des Ileums und des Colons an. Ursachen hierfür könnten insbesondere Unterschiede in der Pathogenese von Morbus Crohn des Ileums und des Colons stehen, die zum Teil auf genetischen Unterschieden bei diesen Patienten beruhen. Der Rezeptor *NOD2* ist insbesondere bei Patienten mit ilealer Beteiligung in seiner Funktion eingeschränkt (139), was mit einer intestinalen Barrierestörung assoziiert ist (143). Alle Faktoren zusammengenommen, wie die verschiedene mikrobiologische Besiedlung in Ileum und Colon bei Morbus Crohn (136) und Unterschiede in Defensinproduktion und Barrierefunktion (144) könnten erklären, dass bakterielle Stimuli und lokale Faktoren anders für das mesenteriale Fettgewebe am Ileum bei Morbus Crohn sind als für das am Colon.

Dies unterstreicht die derzeitig stattfindende Diskussion zur Betrachtung von Morbus Crohn des Ileums und des Colons als separate Erkrankungen, da sich das

pathognomonische *creeping fat* offensichtlich in seiner typischen Ausprägung nur am Ileum zeigt, was auch Implikationen für die Funktion dieses Gewebes auf das Krankheitsverhalten haben könnte.

### ***Creeping Fat* – Besonderheiten im Vergleich zu Adipositas**

Die Bedeutung des hyperplasierten, entzündlich veränderten *creeping fat* bei Patienten mit Morbus Crohn ist bisher nicht hinreichend geklärt. Sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen dieses besonderen Gewebes im Hinblick auf die Adipokin- und Zytokinproduktion (63) und den Phänotyp der Makrophagen (66) konnten identifiziert werden. Wenig ist jedoch bekannt über die Entstehung dieses Gewebes, da insbesondere eine Entwicklung von *creeping fat* im Mausmodell noch nicht erfolgreich gezeigt werden konnte. Dies könnte daran liegen, dass bei Patienten mit Morbus Crohn der chronische Krankheitsverlauf mit einem Abwechseln von aktiver und inaktiver Entzündung an der Entstehung des *creeping fat* beteiligt ist. Hingegen ist es schwierig, an Mäusen mit akut induzierter, chemischer Colitis die Entwicklung dieses Gewebes zu beobachten. Einen erfolgreichen Versuch präsentierten Olivier et al. (145), welche durch intrarektale punktuelle Applikation von Dinitrobenzol-sulfonsäure nach drei Tagen eine Fettgewebsummantelung an den ulzerierten Colonarealen der behandelten Mäuse identifizierten und untersuchten. Allerdings ähnelte das *creeping fat* in ihrem Modell kaum normalem mesenterialem Fettgewebe, beispielsweise enthielt es kaum Adipozyten und Triglyzeride, sodass ein Vergleich mit humanem *creeping fat* schwierig ist. Dieser Umstand erschwert es, die Interaktion zwischen aktiver mukosaler Entzündung und der begleitenden Fettgewebsinflammation *in vivo* zu untersuchen.

Mehrfach wurde beschrieben, dass es in entzündeten Arealen zu einer bakteriellen Translokation kommt, und dass das mesenteriale Fettgewebe in einem Austausch mit der Darmwand steht. Ob die transmurale Entzündung sich ins Fettgewebe ausbreitet ist schwierig festzustellen. Es gibt Daten, die darauf hin deuten, dass Morbus Crohn durch eine primär mesenteriale Dysfunktion entsteht und somit die transmurale Ausbreitung der Entzündung in einer *outside-in* Pathophysiologie begründen (146). Ein weiteres Argument, was häufig genannt wird, ist das präferierte Vorkommen von *creeping fat* im Ileozökalbereich, wobei dort generell die größte Akkumulation von mesenterialem Fettgewebe beobachtet wird (146). Wiederum aufgrund des Fehlens eines adäquaten Tiermodells kann dies nicht *in vivo* bewiesen oder widerlegt werden.

Um genaueres über das Potential von *creeping fat* als Initiator oder Suppressor intestinaler Inflammation zu erfahren, wurden in zahlreichen Studien aus diesem Gewebe sezernierten Zytokine untersucht. Dabei konnte eine spezifisch im CF erhöhte Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  (64) und MCS-F (*macrophage colony-stimulating factor*) festgestellt werden, während eine erhöhte IL-6-Sekretion auch in anderen Fettgeweben im Rahmen einer unspezifischen Entzündung zu beobachten war (147). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Sekretion von IL-6 aus dem viszeralen/mesenterialen Fettgewebe sowohl bei Patienten mit Adipositas als auch bei CED-Patienten festgestellt werden.

Für die Einordnung des T-Zell-Infiltrates im *creeping fat* diene das viszerale Fettgewebe von Patienten mit Adipositas *per magna* als Vergleichsgewebe, da aus bisherigen Forschungsergebnissen hervorgeht, dass hier ebenfalls eine Fettgewebsinflammation vorliegt (21, 24).

Im viszeralen Fettgewebe von Patienten mit Adipositas zeigte sich ein höherer Anteil an  $\text{T}_{\text{H}1}$  und  $\text{T}_{\text{H}2}$  sowie  $\text{IFN}\gamma$  und IL-4 koproduzierenden Zellen als im ilealen *creeping fat*, ebenso fand sich ein höherer Effektorzellanteil unter den  $\text{CD8}^+$  (**Abbildung 18-19**). Der Anteil von  $\text{TCR}\gamma\delta$  Zellen waren ebenfalls im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas im Vergleich zum *creeping fat* signifikant erhöht (**Abbildung 20**). Trotz des direkten Kontaktes des *creeping fat* zur Darmserosa war der Anteil an  $\alpha 4\beta 7$ -positiven Zellen, insbesondere unter den zytotoxischen T-Zellen, signifikant niedriger als im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas (**Abbildung 21**). Zusammenfassend zeigt sich, dass das T-Zell-Infiltrat nicht nur quantitativ sondern auch in seiner Zusammensetzung stark zwischen Patienten mit Adipositas und Morbus Crohn variiert und ein höherer Anteil pro-inflammatorischer Zellen im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas zu finden ist. Für das ileale *creeping fat* wurde keine vorherrschende T-Zell-Population identifiziert, vielmehr zeigte sich ein stärker balanciertes Verhältnis aus pro- und anti-inflammatorischen Akteuren. Paradox erscheint der geringere Anteil  $\alpha 4\beta 7$ -positiven Zellen im ilealen *creeping fat*, allerdings kann hier von einem im Vergleich betrachtet erhöhten Anteil dieser Zellen im viszeralen Fettgewebe ausgegangen werden, da sich im Vergleich zwischen den anderen darmnahen Fettgeweben bei CED immer noch ein verhältnismäßig hoher  $\alpha 4\beta 7$ -Anteil im ilealen Fettgewebe zeigte. Die Möglichkeit zum *homing* dieser Zellen aus dem *creeping fat* in den angrenzenden Darm bleibt demnach



wahrscheinlich. Die Bedeutung  $\alpha 4\beta 7$ -positiver Zellen im Rahmen von Adipositas wird nachfolgend erörtert.

### **Integrinexpression auf T-Zellen im VF bei Adipositas – Bedeutung für adipöse Patienten mit Morbus Crohn**

Der klinische Krankheitsverlauf von adipösen Patienten mit CED deutet auf eine Assoziation mit Adipositas hin. Klinische Daten zeigen höhere Komplikationsraten bei übergewichtigen Patienten mit Morbus Crohn (148), wobei insbesondere das Risiko für perianale Komplikationen, für die Entwicklung eines aktiven Krankheitsverlaufs und für eine Hospitalisierung höher für übergewichtige Patienten ist (48).

Insgesamt konnte im Verlauf der letzten Jahrzehnte neben einem Anstieg der Adipositasinzidenz auch ein Anstieg in der Inzidenz des Morbus Crohn festgestellt werden (35). Eine Metaanalyse aus 40 randomisierten-kontrollierten klinischen Studien mit Morbus Crohn-Patienten zeigte, dass interessanterweise der durchschnittliche BMI von eingeschlossenen Patienten mit Morbus Crohn sowie auch die durchschnittliche Krankheitsaktivität (CDAI) von 1991 bis 2008 zunahm, wobei Patienten mit einem niedrigen CDAI ein geringeres Gewicht hatten als Patienten mit einem hohem CDAI (149). Diese Studie ist jedoch keinesfalls beweisend für einen klaren Zusammenhang zwischen Gewicht und Krankheitsaktivität, da andere Faktoren einen Einfluss auf diese Parameter haben könnten. Der Großteil der Patienten mit Morbus Crohn ist jedoch nicht übergewichtig und Adipositas konnte bisher nicht als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Morbus Crohn identifiziert werden.

Bei differenzierter Betrachtung finden sich Daten, nach denen die Vermehrung des viszeralen Fettgewebes (ermittelt durch Magnetresonanztomographie-Untersuchungen) bei Patienten mit Morbus Crohn mit einer erhöhten Krankheitsaktivität und vermehrter Fistelbildung in Verbindung gebracht werden (150). In dieser Studie wurde jedoch sämtliches viszerale Fettgewebe, auch das für den Morbus Crohn typische *creeping fat*, zusammengenommen betrachtet, obwohl dieses keine Vermehrung des viszeralen Fettgewebes im klassischen Sinne bei Adipositas darstellt und beim *creeping fat* durchaus eine Assoziation zu entzündeten Läsionen beschrieben ist, was das vermehrte Vorkommen in Fistelregionen mit begründen würde.

Kürzlich konnte in einem Mausmodell mit nahrungsinduzierter Adipositas und chemisch-induzierter Colitis gezeigt werden, dass adipöse Mäuse im Vergleich zu

normalgewichtigen Tieren eine veränderte Zusammensetzung des „mesenterialen Fettgewebes“ und einen schwereren Verlauf der Colitis zeigten, und dass körperliche Betätigung und Reduktion des Fettdepots vor Induktion der Colitis zu einer makroskopisch und mikroskopisch geringer ausgeprägten Colitis führten (151). Hierbei wurden insbesondere die Adipozytokinwirkungen (steigende Adiponektin- und sinkende Leptinkonzentration bei vorheriger körperlicher Betätigung) mit diesen Beobachtungen assoziiert. Das bei den adipösen Mäusen akkumulierende „mesenteriale Fettgewebe“ ist hierbei eher mit dem viszeralen Fettgewebe des Menschen zu vergleichen, da diese Mäuse kein *creeping fat* besitzen und das angesprochene Fettgewebe auf körperliche Betätigung hin abnimmt, was von *creeping fat* nicht zu erwarten wäre. Die genannten Studien zeigen, dass gerade bei Patienten mit Morbus Crohn hinsichtlich des viszeralen Fettgewebes eine differenzierte Auseinandersetzung mit den verschiedenen Formen der Fettgewebshypertrophie bzw. –hyperplasie unerlässlich ist.

Untersuchungen zu den Auswirkungen bariatrischer Chirurgie auf die chronische Entzündungssituation adipöser Patienten deuten darauf hin, dass ein rapides Absinken von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und TNF $\alpha$  im Blut nach bariatrischer Chirurgie stattfindet (152). Studien zur Sicherheit der Durchführung bariatrischer Chirurgie bei Patienten mit CED zeigen, dass keine vermehrten Entzündungsschübe auftreten, vielmehr in den meisten Fällen eine Gewichtsreduktion zu einer klinischen Remission und Reduktion der immunsuppressiven Therapie führte (153, 154). Im Blut zirkulierende Entzündungsmediatoren könnten daher eine Brücke zwischen Fettgewebsinflammation und intestinaler Inflammation darstellen.

Ein möglicher zellulärer Austausch zwischen viszeralem Fettgewebe und intestinaler Mukosa ist nach bisherigem Stand nicht untersucht worden. In dieser Arbeit wurden aus dem viszeralen und subkutanen Fettgewebe adipöser Patienten isolierte T-Zellen auf die Expression des darmspezifischen *homing*-Integrins  $\alpha 4\beta 7$  hin untersucht. Durch die Interaktion mit dem auf hochendothelialen Venulen der Lamina propria exprimierten MadCAM-1 können Integrin- $\alpha 4\beta 7$ -positive Zellen spezifisch in den Darm einwandern (110). Das intestinale MALT stellt eines der wichtigsten Immunzellreservoirs des Körpers dar. Ein Anteil von ca. 20% der im Blut zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert  $\alpha 4\beta 7$  (155).

Interessanterweise trugen im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas mehr als 60% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und etwas weniger als die Hälfte der CD4<sup>+</sup> Zellen das Integrin  $\alpha 4\beta 7$ ,

während der Anteil der Zellen im subkutanen Fettgewebe nur etwa halb so hoch war, vergleichbar mit dem in anderen Studien ermittelten Anteil der im Blut zirkulierenden  $\alpha 4\beta 7^+$  Zellen. Im Vergleich dazu zeigte sich im ilealen *creeping fat* bei Morbus Crohn ein signifikant niedrigerer Anteil dieser Zellpopulation.

Der Residenzmarker  $\alpha E\beta 7$  war im viszeralen Fettgewebe ebenfalls höher exprimiert als auf T-Zellen im subkutanen Fettgewebe. Auch hier war der Anteil insbesondere bei den  $CD8^+$  Zellen erhöht. Zusätzlich fiel auf, dass ein nicht unerheblicher Anteil der  $\alpha 4\beta 7^+$  Zellen zusätzlich  $\alpha E$  auf der Oberfläche trug. Über die Expression von  $\alpha E$  und seinem Bindungsmolekül E-Cadherin im Fettgewebe bestehen keine Daten, vielmehr ist  $\alpha E$  bisher vorwiegend auf  $CD8^+$  intraepithelialen T-Zellen der Darmmukosa (aber auch als Residenzmarker in anderen Geweben) identifiziert worden (156).

Das colitogene Potential von T-Zellen, also die Fähigkeit nach Zirkulation in den Darm eine intestinale Entzündung zu verursachen, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine Expression des Integrins  $\alpha 4\beta 7$  scheint dabei notwendig, aber nicht hinreichend zu sein (157). Beispielsweise zeigen Daten aus dem Mausmodell, dass die Anwesenheit des  $TCR\gamma\delta$ -Rezeptors eine wichtige Rolle zur Induktion colitogener  $CD4^+ T_H17^+$  T-Zellen spielt (158).

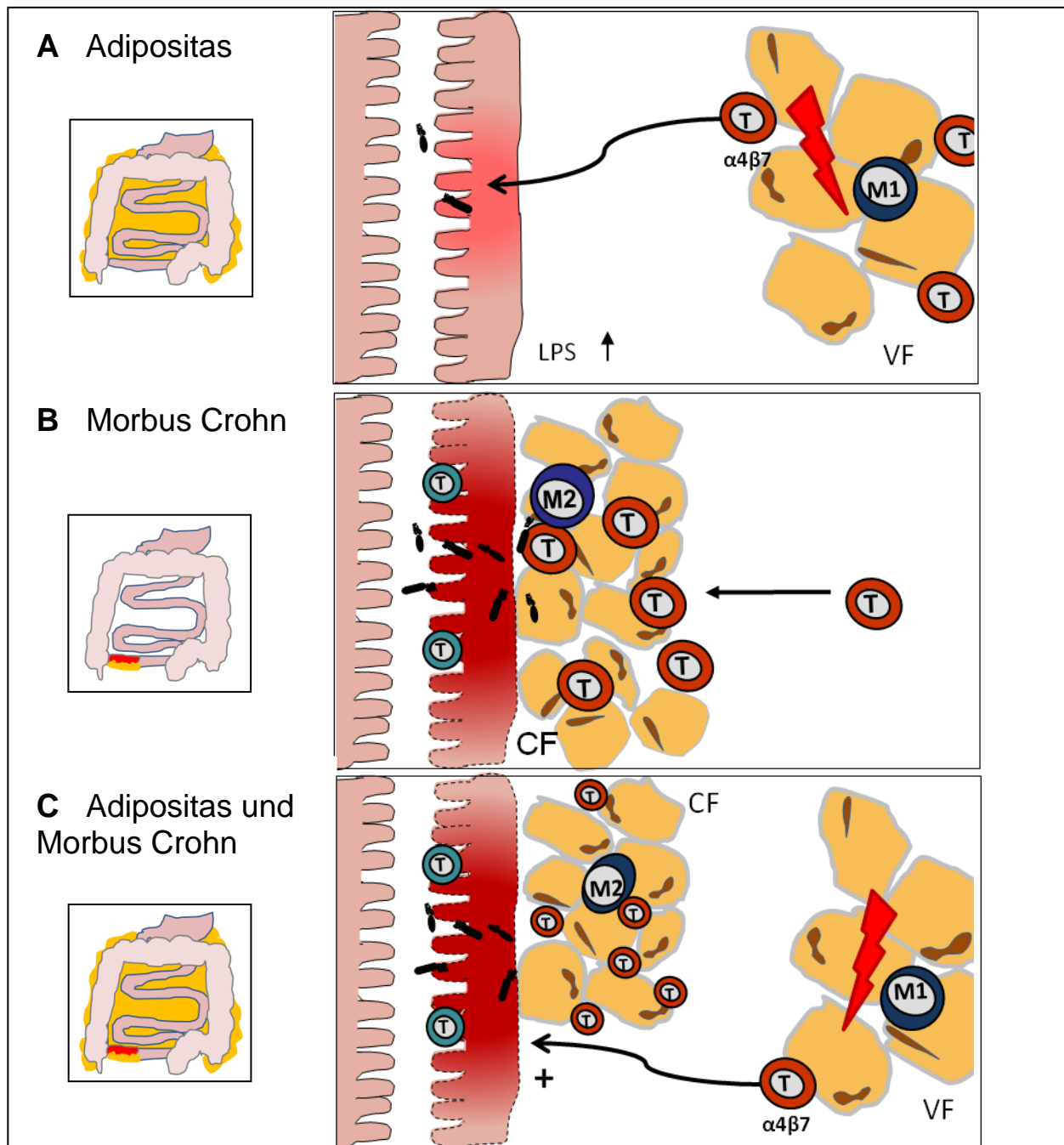
Die in der vorliegenden Studie identifizierten insbesondere  $CD8^+ \alpha 4\beta 7$ -positiven Zellen sind potentiell zu einem darmspezifischen *homing* in der Lage. Bei dem im hypertrophierten VF nachgewiesenen pro-inflammatorischen Milieu mit überwiegender  $T_H1$ -Antwort könnten diese Zellen mit pro-inflammatorischen Potential nach Rezirkulation in die Mukosa des Darms zu einer lokalen unspezifischen Entzündungsreaktion führen, oder eine vorhandene Barrierestörung, zum Beispiel im Rahmen von CED, aggravieren. Diese Zellpopulation könnte daher, neben der Zytokinsekretion des hypertrophierten Fettgewebes, ebenfalls ein Verbindungsglied zwischen Adipositas und verschlechterter intestinaler Entzündung bei Patienten mit Morbus Crohn darstellen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mehr über das spezifische Verhalten dieser Zellpopulation und ihre Wirkung auf die intestinale Barriere und das intestinale Immunsystem zu erfahren. Es wäre interessant zu erfahren, ob übergewichtige Patienten mit CED stärker von Integrin-blockierenden Therapien wie Vedolizumab profitieren, allerdings wurde dieses in bisherigen Studien nicht spezifisch adressiert.

## 6 Zusammenfassung

In **Abbildung 22** sind die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit bisherigen Forschungsergebnissen als hypothetische pathomechanistische Darstellung zusammengefasst. Die T-Zell-Infiltration im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas konnte im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe der gleichen Patienten und im Vergleich zum *creeping fat* von Patienten mit Morbus Crohn als vorwiegend proinflammatorisch ausgerichtet bestätigt werden, wobei insbesondere die Subgruppe der CD8<sup>+</sup> α4β7<sup>+</sup> Zellen einen interessanten neuen Blick auf die intestinale Barrierestörung bei diesen Patienten eröffnet. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Eigenschaften dieser Zellen im Hinblick auf ihr tatsächliches *homing*-Verhalten, ihre Zytokinexpression und ihren Einfluss auf Epithelien zu verstehen.

Hinsichtlich der Bedeutung des *creeping fat* deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass deutliche Unterschiede in der Ausprägung, histologischen Charakteristika, T-Zell-Infiltration und potentiell auch Funktion der mesenterialen/mesocolischen Fettgewebe bei Morbus Crohn des Ileums und des Colons bestehen. Nur das ileale Fettgewebe zeigte in dieser Patientenkohorte die erwarteten typischen Eigenschaften des *creeping fat* und hob sich vor allem in der absoluten T-Zell-Anzahl von den anderen Fettgewebekompartimenten bei CED ab. Weitere Studien mit größeren Patientenkohorten sind nötig, um mehr über die Voraussetzungen und lokalen Einflussfaktoren auf die Bildung von *creeping fat* zu erfahren und die Bedeutung der Entzündungslokalisation weiter zu evaluieren. Sollten sich spezifische Funktionen dieses Gewebes für abgrenzbare Patientengruppen identifizieren lassen, bestünde die Möglichkeit, gezielte Therapieverfahren zu entwickeln, die entzündungshemmende oder -fördernde Eigenschaften des *creeping fat* zu nutzen.

T-Zellen aus dem VF adipöser Patienten mit Morbus Crohn, die zum darmassoziierten *homing* in der Lage sind und die intestinale Entzündung verschlechtern könnten, stellen ebenfalls einen therapeutischen Angriffspunkt dar. Es wäre interessant zu erforschen, ob diese Patienten insbesondere von einer Integrin-Blockade mit Vedolizumab profitieren könnten.



**Abbildung 22.** Hypothesenmodelle zur Fettgewebsinflammation bei Patienten mit Adipositas, Morbus Crohn sowie Patienten mit einer Kombination aus beiden Erkrankungen. **A** Darstellung der intestinalen Barriestörung in Zusammenschau mit der niedriggradigen Inflammation des viszeralen Fettgewebes (VF). Ein Verbindungsfaktor könnten die aus dem pro-inflammatorischen Milieu beeinflussten  $\alpha 4\beta 7$ -positiven T-Zellen sein, welche durch die Sekretion von IFN $\gamma$  eine Barriestörung induzieren können. Diese bedingt eine vermehrte bakteriellen Translokation mit einem messbaren Anstieg bakterieller Antigene im Blutkreislauf (Lipopolysaccharid=LPS). **B** Pathogenetisches Modell des ilealen *creeping fat* (CF) bei Morbus Crohn. Die intestinale Barriestörung mit bakterieller Translokation ist der initiale Faktor der Immunaktivierung, Makrophagen sezernieren Chemokine, die zur T-Zellattraktion führen. Eine Einwanderung aus der Blutbahn ist wahrscheinlicher als ein Übertritt aus dem umgebenden Fettgewebe, da sich die Subgruppen von den typischen T-Zell-Subpopulationen in der Mukosa unterscheiden. Es handelt sich um ein dichtes T-Zell-Infiltrat mit pro- und anti-inflammatorischen Akteuren, wobei regulatorische T-Zellen und *central memory* T-Zellen in erhöhtem Maße vorkommen. **C** Bei adipösen Patienten mit Morbus Crohn kommt es wahrscheinlich zu einem Zusammentreffen beider Phänomene, wobei eine Aggravierung der intestinalen Entzündung durch die  $\alpha 4\beta 7$ -positiven T-Zellen begründet sein könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
2. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
3. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 1997;190(2):227-35.
4. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes care*. 1991;14(12):1132-43.
5. Feuerer M, Herrero L, Ciolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine*. 2009;15(8):930-9.
6. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):175-84.
7. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*. 2006;49(4):744-7.
8. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 2007;115(8):1029-38.
9. Peyrin-Biroulet L, Chamailard M, Gonzalez F, Beclin E, Decourcelle C, Antunes L, Gay J, Neut C, Colombel JF, Desreumaux P. Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? *Gut*. 2007;56(4):577-83.
10. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM, Bahalim AN, McIntire RK, Gutierrez HR, Cowan M, Paciorek CJ, Farzadfar F, Riley L, Ezzati M, Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating G. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Population health metrics*. 2012;10(1):22.
11. Prospective Studies C, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373(9669):1083-96.
12. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization technical report series. 2000;894:i-xii, 1-253.
13. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 1987;36(1):54-9.
14. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Internal medicine*. 1999;38(2):202-6.
15. Hinnouho GM, Czernichow S, Dugravot A, Batty GD, Kivimaki M, Singh-Manoux A. Metabolically healthy obesity and risk of mortality: does the definition of metabolic health matter? *Diabetes care*. 2013;36(8):2294-300.
16. Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Leonetti F. Prevalence of uncomplicated obesity in an Italian obese population. *Obesity research*. 2005;13(6):1116-22.
17. Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes & metabolism*. 2004;30(6):569-72.
18. Meigs JB, Wilson PW, Fox CS, Vasan RS, Nathan DM, Sullivan LM, D'Agostino RB. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(8):2906-12.
19. Aguilar-Salinas CA, Garcia EG, Robles L, Riano D, Ruiz-Gomez DG, Garcia-Ulloa AC, Melgarejo MA, Zamora M, Guillen-Pineda LE, Mehta R, Canizales-Quinteros S, Tusie Luna MT, Gomez-Perez FJ. High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(10):4075-9.

20. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(7):4145-50.
21. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1796-808.
22. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;257(1):79-83.
23. Xiao L, Yang X, Lin Y, Li S, Jiang J, Qian S, Tang Q, He R, Li X. Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4(+) T cells via upregulating MHCII in obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(1):112-20.
24. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine*. 2009;15(8):914-20.
25. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(7):1304-10.
26. Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(9):1347-55.
27. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
28. Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, Jo A, Park SB, Han W, Kim JB. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(10):1686-99.
29. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007;293(4):E1118-28.
30. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
31. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
32. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Konigsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *The Journal of nutrition*. 2008;138(8):1452-5.
33. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2007;292(2):G518-25.
34. Preiss JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignass A, Hauser W, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC, German Society of G. [Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2014;52(12):1431-84.

35. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54 e42; quiz e30.
36. Williams WJ. Histology of Crohn's Syndrome. *Gut*. 1964;5:510-6.
37. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
38. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, Theodossi A, Williams GT. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *Journal of clinical pathology*. 1997;50(2):93-105.
39. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*. 1991;100(2):350-8.
40. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
41. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-17.
42. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK. Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1979;77(4 Pt 2):898-906.
43. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2011;7(4):235-41.
44. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA*. 1932;99(16):1323-9.
45. Makowiec F, Jehle EC, Becker HD, Starlinger M. Perianal abscess in Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum*. 1997;40(4):443-50.
46. van Dongen LM, Lubbers EJ. Perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Archives of surgery*. 1986;121(10):1187-90.
47. Gomollon F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P, Ecco. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's & colitis*. 2017;11(1):3-25.
48. Blain A, Cattan S, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP, Cosnes J. Crohn's disease clinical course and severity in obese patients. *Clinical nutrition*. 2002;21(1):51-7.
49. Hass DJ, Brensinger CM, Lewis JD, Lichtenstein GR. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006;4(4):482-8.
50. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(7):968-76.
51. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Geary R, Glas J, Van Gossom A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panes J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, Parkes M. Genome-wide meta-



analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics*. 2010;42(12):1118-25.

52. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(4):563-73.

53. Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL, King AC, Cho JH. Smoking and inflammatory bowel disease: trends in familial and sporadic cohorts. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(5):573-9.

54. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60(5):631-7.

55. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127(2):412-21.

56. Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology*. 1994;107(3):643-9.

57. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, Decourcelle C, Saudemont A, Tachon M, Beclin E, Odou MF, Neut C, Colombel JF, Desreumaux P. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut*. 2012;61(1):78-85.

58. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.

59. Duchmann R, Neurath MF, Meyer zum Buschenfelde KH. Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Research in immunology*. 1997;148(8-9):589-94.

60. Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, Shepherd NA. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *The British journal of surgery*. 1992;79(9):955-8.

61. Borley NR, Mortensen NJ, Jewell DP, Warren BF. The relationship between inflammatory and serosal connective tissue changes in ileal Crohn's disease: evidence for a possible causative link. *The Journal of pathology*. 2000;190(2):196-202.

62. Barbier M, Vidal H, Desreumaux P, Dubuquoy L, Bourreille A, Colombel JF, Cherbut C, Galmiche JP. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterologie clinique et biologique*. 2003;27(11):987-91.

63. Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, Kihara S, Okamoto Y, Funahashi T, Ito T, Nezu R, Tsutsui S, Miyagawa JI, Tamura S, Matsuzawa Y, Shimomura I, Shinomura Y. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut*. 2005;54(6):789-96.

64. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, Gambiez L, Berrebi D, Muller-Alouf H, Hafraoui S, Emilie D, Ectors N, Peuchmaur M, Cortot A, Capron M, Auwerx J, Colombel JF. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117(1):73-81.

65. Goncalves P, Magro F, Martel F. Metabolic inflammation in inflammatory bowel disease: crosstalk between adipose tissue and bowel. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(2):453-67.

66. Kredel LI, Batra A, Stroh T, Kuhl AA, Zeitz M, Erben U, Siegmund B. Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease. *Gut*. 2013;62(6):852-62.

67. Zulian A, Canello R, Ruocco C, Gentilini D, Di Blasio AM, Danelli P, Micheletto G, Cesana E, Invitti C. Differences in visceral fat and fat bacterial colonization between ulcerative colitis and Crohn's disease. An in vivo and in vitro study. *PloS one*. 2013;8(10):e78495.

68. Kaufmann S. T-Zellen. *Basiswissen Immunologie*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2014. p. S. 64 ff.

69. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.
70. Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, de Vries J, Spits H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol.* 1988;141(3):849-55.
71. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(3):1910-4.
72. Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature immunology.* 2007;8(10):1086-94.
73. Troncone E, Marafini I, Pallone F, Monteleone G. Th17 cytokines in inflammatory bowel diseases: discerning the good from the bad. *International reviews of immunology.* 2013;32(5-6):526-33.
74. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine.* 2005;201(2):233-40.
75. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2012;23(8):407-15.
76. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, Andrade SM, Cua DJ, Kraemer FB, Butcher EC. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol.* 2010;185(11):6947-59.
77. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol.* 1996;157(3):1261-70.
78. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefijt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine.* 2009;206(3):525-34.
79. Globig AM, Hennecke N, Martin B, Seidl M, Ruf G, Hasselblatt P, Thimme R, Bengsch B. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN-gamma+IL-17+coproducing CD4+ T cells in active inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases.* 2014;20(12):2321-9.
80. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma1 function. *Nature.* 2008;453(7192):236-40.
81. Nancey S, Holvoet S, Graber I, Joubert G, Philippe D, Martin S, Nicolas JF, Desreumaux P, Flourie B, Kaiserlian D. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology.* 2006;131(2):485-96.
82. Thomas ML. The leukocyte common antigen family. *Annual review of immunology.* 1989;7:339-69.
83. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.
84. Willinger T, Freeman T, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MF. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol.* 2005;175(9):5895-903.
85. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR, Jr., Muller W, Rudensky AY. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity.* 2008;28(4):546-58.

86. Tai X, Van Laethem F, Pobeziński L, Guinter T, Sharrow SO, Adams A, Granger L, Kruhlak M, Lindsten T, Thompson CB, Feigenbaum L, Singer A. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood*. 2012;119(22):5155-63.
87. Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatric research*. 2009;65(5 Pt 2):26R-31R.
88. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003;4(4):330-6.
89. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature medicine*. 2009;15(8):921-9.
90. Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity*. 2011;19(4):743-8.
91. McLaughlin T, Liu LF, Lamendola C, Shen L, Morton J, Rivas H, Winer D, Tolentino L, Choi O, Zhang H, Hui Yen Chng M, Engleman E. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(12):2637-43.
92. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, Benoist C, Mathis D. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*. 2012;486(7404):549-53.
93. Lord JD, Valliant-Saunders K, Hahn H, Thirlby RC, Ziegler SF. Paradoxically increased FOXP3+ T cells in IBD do not preferentially express the isoform of FOXP3 lacking exon 2. *Digestive diseases and sciences*. 2012;57(11):2846-55.
94. Lord JD, Shows DM, Chen J, Thirlby RC. Human Blood and Mucosal Regulatory T Cells Express Activation Markers and Inhibitory Receptors in Inflammatory Bowel Disease. *PloS one*. 2015;10(8):e0136485.
95. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1849-61.
96. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England journal of medicine*. 2009;361(21):2033-45.
97. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(4):1277-94.
98. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip S, Rosen F, Krangel MS. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*. 1986;322(6075):145-9.
99. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes. *Nature*. 1989;341(6241):447-50.
100. Russano AM, Agea E, Corazzi L, Postle AD, De Libero G, Porcelli S, de Benedictis FM, Spinazzi F. Recognition of pollen-derived phosphatidyl-ethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(5):1178-84.
101. Kagnoff MF. Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of gamma delta T cells in the intestine. *The American journal of physiology*. 1998;274(3 Pt 1):G455-8.
102. Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology*. 2000;18:975-1026.

103. Mehta P, Nuotio-Antar AM, Smith CW. gammadelta T cells promote inflammation and insulin resistance during high fat diet-induced obesity in mice. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97(1):121-34.
104. McVay LD, Li B, Biancaniello R, Creighton MA, Bachwich D, Lichtenstein G, Rombeau JL, Carding SR. Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. *Mol Med*. 1997;3(3):183-203.
105. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(6):1330-8.
106. Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, Sidobre S, Stetson DB, Mohrs M, Locksley RM, Kronenberg M. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8395-400.
107. Schipper HS, Rakhshandehroo M, van de Graaf SF, Venken K, Koppen A, Stienstra R, Prop S, Meering J, Hamers N, Besra G, Boon L, Nieuwenhuis EE, Elewaut D, Prakken B, Kersten S, Boes M, Kalkhoven E. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(9):3343-54.
108. Lynch L, O'Shea D, Winter DC, Geoghegan J, Doherty DG, O'Farrelly C. Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *European journal of immunology*. 2009;39(7):1893-901.
109. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*. 1994;152(7):3282-93.
110. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. 1993;74(1):185-95.
111. Farstad IN, Halstensen TS, Lien B, Kilshaw PJ, Lazarovits AI, Brandtzaeg P. Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue. *Immunology*. 1996;89(2):227-37.
112. Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, McEvoy LM, Butcher EC, Kassam N, Mackay CR, Newman W, Ringler DJ. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *The American journal of pathology*. 1997;151(1):97-110.
113. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A, Group GS. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 2013;369(8):711-21.
114. Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T. Molecular events mediating T cell activation. *Advances in immunology*. 1990;48:227-360.
115. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol*. 1989;143(4):1283-9.
116. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, CN B. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19(Suppl A):5A-36A.
117. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70(3):439-44.
118. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
119. Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC medical research methodology*. 2002;2:8.
120. Fachinformation Humira® 40 mg/0 ml. AbbVie Ltd, Maidenhead, Vereinigtes Königreich Zulassungsnummer: EU/1/03/256/010. Stand: Dez. 2016 [zitiert am 18.04.2017].<https://www.fachinfo.de/pdf/010078>.

121. Fachinformation Remicade® 100 mg. . Janssen Biologics BV, Leiden, Niederlande  
Zulassungsnummer: EU/1/99/116/005. Stand: Jun. 2016 [zitiert am  
18.04.2017].<https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/remicade.pdf>.
122. Fachinformation Entyvio® 300 mg Takeda GmbH, Konstanz, Deutschland  
Zulassungsnummer: EU/1/14/923/001. Stand: Nov. 2015 [zitiert am  
18.04.2017]:<https://www.fachinfo.de/suche/fi/020200>.
123. Coffey JC, O'Leary DP. The mesentery: structure, function, and role in disease. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2016;1(3):238-47.
124. O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin, II, Jobe BA, Roberts CT, Jr., Slifka MK, Marks DL. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33(9):978-90.
125. Verboven K, Wouters K, Gaens K, Hansen D, Bijnen M, Wetzels S, Stehouwer CD, Goossens GH, Schalkwijk CG, Blaak EE, Jocken JW. Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Scientific reports*. 2018;8(1):4677.
126. Rakotoarivelo V, Lacraz G, Mayhue M, Brown C, Rottembourg D, Fradette J, Ilangumaran S, Menendez A, Langlois MF, Ramanathan S. Inflammatory Cytokine Profiles in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery Reveal Lack of Correlation With Obesity or Diabetes. *EBioMedicine*. 2018;30:237-47.
127. Gummesson A, Carlsson LM, Storlien LH, Backhed F, Lundin P, Lofgren L, Stenlof K, Lam YY, Fagerberg B, Carlsson B. Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women. *Obesity*. 2011;19(11):2280-2.
128. Elewaut D, Van Damme N, De Keyser F, Baeten D, De Paepe P, Van Vlierberghe H, Mielants H, Cuvelier C, Verbruggen G, Veys EM, De Vos M. Altered expression of alpha E beta 7 integrin on intra-epithelial and lamina propria lymphocytes in patients with Crohn's disease. *Acta gastro-enterologica Belgica*. 1998;61(3):288-94.
129. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2593-603.
130. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clinical immunology*. 2004;110(1):55-62.
131. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, Wehkamp J, Feagan BG, Yao MD, Karczewski M, Karczewski J, Pezous N, Bek S, Bruin G, Mellgard B, Berger C, Londei M, Bertolino AP, Tougas G, Travis SP, Secukinumab in Crohn's Disease Study G. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*. 2012;61(12):1693-700.
132. Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(5):693-706.
133. Freeman HJ. Application of the Montreal classification for Crohn's disease to a single clinician database of 1015 patients. *Can J Gastroenterol*. 2007;21(6):363-6.
134. Cheifetz AS. Management of active Crohn disease. *Jama*. 2013;309(20):2150-8.
135. Sandborn WJ, Schreiber S, Feagan BG, Rutgeerts P, Younes ZH, Bloomfield R, Coteur G, Guzman JP, D'Haens GR. Certolizumab pegol for active Crohn's disease: a placebo-controlled, randomized trial. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2011;9(8):670-8 e3.
136. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of

novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *The ISME journal*. 2007;1(5):403-18.

137. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):867-74.

138. Silverberg MS, Mirea L, Bull SB, Murphy JE, Steinhart AH, Greenberg GR, McLeod RS, Cohen Z, Wade JA, Siminovitch KA. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1\*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2003;9(1):1-9.

139. Cleyne I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, Andersen V, Andrews JM, Annesse V, Brand S, Brant SR, Cho JH, Daly MJ, Dubinsky M, Duerr RH, Ferguson LR, Franke A, Geary RB, Goyette P, Hakonarson H, Halfvarson J, Hov JR, Huang H, Kennedy NA, Kupcinskis L, Lawrance IC, Lee JC, Satsangi J, Schreiber S, Theatre E, van der Meulen-de Jong AE, Weersma RK, Wilson DC, International Inflammatory Bowel Disease Genetics C, Parkes M, Vermeire S, Rioux JD, Mansfield J, Silverberg MS, Radford-Smith G, McGovern DP, Barrett JC, Lees CW. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet*. 2016;387(10014):156-67.

140. Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, Fu J, Gevers D, Visschedijk MC, Spekhorst LM, Alberts R, Franke L, van Dullemen HM, Ter Steege RWF, Huttenhower C, Dijkstra G, Xavier RJ, Festen EAM, Wijmenga C, Zhernakova A, Weersma RK. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018;67(1):108-19.

141. Kirby JA, Bone M, Robertson H, Hudson M, Jones DE. The number of intraepithelial T cells decreases from ascending colon to rectum. *Journal of clinical pathology*. 2003;56(2):158.

142. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Goke B, Brand S. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(2):204-12.

143. Rogler G. The effects of NOD2/CARD15 mutations on the function of the intestinal barrier. *Journal of Crohn's & colitis*. 2007;1(2):53-60.

144. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Jr., Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18129-34.

145. Olivier I, Theodorou V, Valet P, Castan-Laurell I, Guillou H, Bertrand-Michel J, Cartier C, Bezirard V, Ducroc R, Segain JP, Portier G, Kirzin S, Moreau J, Duffas JP, Ferrier L, Eutamene H. Is Crohn's creeping fat an adipose tissue? *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(3):747-57.

146. Rivera ED, Coffey JC, Walsh D, Ehrenpreis ED. The Mesentery, Systemic Inflammation, and Crohn's Disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2018.

147. Paul G, Schaffler A, Neumeier M, Furst A, Bataille F, Buechler C, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Rogler G, Herfarth H. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(6):471-7.

148. Nascimento AT, Rocha R, Coqueiro FG, Santana GO, Lyra AC. Does obesity complicate inflammatory bowel diseases? *Journal of Crohn's & colitis*. 2012;6(10):1041.

149. Moran GW, Dubeau MF, Kaplan GG, Panaccione R, Ghosh S. The increasing weight of Crohn's disease subjects in clinical trials: a hypothesis-generating time-trend analysis. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(13):2949-56.

150. Buning C, von Kraft C, Hermsdorf M, Gentz E, Wirth EK, Valentini L, Haas V. Visceral Adipose Tissue in Patients with Crohn's Disease Correlates with Disease Activity, Inflammatory Markers, and Outcome. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(11):2590-7.

151. Mazur-Bialy AI, Bilski J, Wojcik D, Brzozowski B, Surmiak M, Hubalewska-Mazgaj M, Chmura A, Magierowski M, Magierowska K, Mach T, Brzozowski T. Beneficial Effect of

- Voluntary Exercise on Experimental Colitis in Mice Fed a High-Fat Diet: The Role of Irisin, Adiponectin and Proinflammatory Biomarkers. *Nutrients*. 2017;9(4).
152. Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obesity surgery*. 2004;14(5):589-600.
153. Aminian A, Andalib A, Ver MR, Corcelles R, Schauer PR, Brethauer SA. Outcomes of Bariatric Surgery in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Obesity surgery*. 2016;26(6):1186-90.
154. Colombo F, Rizzi A, Ferrari C, Frontali A, Casiraghi S, Corsi F, Sampietro GM, Foschi D. Bariatric surgery in patients with inflammatory bowel disease: an accessible path? Report of a case series and review of the literature. *Journal of Crohn's & colitis*. 2015;9(2):185-90.
155. Scala E, Paganelli R, Sampogna F, Abeni D, Colonna L, De Pita O, Puddu P, Russo G. Alpha4beta1 and alpha4beta7 CD4 T cell numbers increase and CLA CD4 T cell numbers decrease in systemic sclerosis. *Clinical and experimental immunology*. 2005;139(3):551-7.
156. Fu H, Ward EJ, Marelli-Berg FM. Mechanisms of T cell organotropism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(16):3009-33.
157. Do JS, Visperas A, Freeman ML, Iwakura Y, Oukka M, Min B. Colitogenic effector T cells: roles of gut-homing integrin, gut antigen specificity and gammadelta T cells. *Immunology and cell biology*. 2014;92(1):90-8.
158. Do JS, Visperas A, Dong C, Baldwin WM, 3rd, Min B. Cutting edge: Generation of colitogenic Th17 CD4 T cells is enhanced by IL-17+ gammadelta T cells. *J Immunol*. 2011;186(8):4546-50.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lisa Joanna Jödicke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „T-Zell-Subtypen im Fettgewebe – Die Beziehung zwischen Fettgewebsinflammation und intestinaler Inflammation bei Patienten mit Morbus Crohn und Adipositas *per magna*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift



## 9 Anteilserklärung an Publikationen

Lisa Joanna Jödicke hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Kredel LI\*; **Jödicke LJ\***; Scheffold, A; Gröne, J; Glauben, R; Erben, U; Kühl, AA; Siegmund, B: *T-cell Composition in Ileal and Colonic Creeping Fat – Separating Ileal from Colonic Crohn´s Disease*, J Crohns Colitis, 2019 Jan 1, 13 (1): 79-91.

*\*contributed equally*

Beitrag im Einzelnen:

Der Beitrag der Promovendin bestand in der Datenerhebung, Datenauswertung und Interpretation sowie statistischen Analyse unter Supervision, Erstellung der Abbildungen und Formulierung der ersten Manuskriptversion in Zusammenarbeit mit Dr. Lea-Isabell Kredel, Einreichung und Revision des Papers unter Anleitung.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift der Doktorandin

## 10 Publikationsliste

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen als Originalarbeit in folgendem internationalen Journal publiziert worden:

Kredel LI\*; **Jödicke LJ\***; Scheffold, A; Gröne, J; Glauben, R; Erben, U; Kühl, AA; Siegmund, B: *T-cell Composition in Ileal and Colonic Creeping Fat – Separating Ileal from Colonic Crohn´s Disease*, J Crohns Colitis, 2019 Jan 1, 13 (1): 79-91.

*\*contributed equally*

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen als Vortrag präsentiert und zum Teil als Abstract veröffentlicht worden:

**Jödicke LJ**, Kredel LI, Kühl AA, Freise I, Gröne J, Ordemann J, Siegmund B: Gut-homing adipose tissue T-cells might influence intestinal barrier function in Crohn´s disease and obesity. *11<sup>th</sup> Congress of the European Crohn´s and Colitis Organisation (ECCO), 16.-19.03.2016, Amsterdam*

**Jödicke LJ**, Kredel LI, Siegmund B: T-Zell-Subpopulationen im *Creeping Fat* bei Morbus Crohn - Vergleich mit viszeralem Fettgewebe bei Adipositas *per magna*. *Deutsche Arbeitsgemeinschaft für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (DACED), 19.-20.06.2015, Mainz*

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen als Poster präsentiert und als Abstract veröffentlicht worden:

Kredel LI, **Jödicke LJ**, Kühl AA, Freise I, Gröne J, Siegmund B: Creeping fat contains a unique T-cell compartment with potential impact on intestinal inflammation. *11<sup>th</sup> Congress of the European Crohn´s and Colitis Organisation (ECCO), 16.-19.03.2016, Amsterdam*

Kredel LI, **Jödicke LJ**, Kühl AA, Freise I, Gröne J, Siegmund B: Adipose tissue T-cells in *creeping fat* might impact intestinal inflammation. *Digestive Disease Week, 22.-24.5.2016, San Diego, CA, USA*

## **11 Lebenslauf**

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

## 12 Danksagung

Mein erster Dank geht an Frau Professor Britta Siegmund, für die Möglichkeit zur Promotion, die durchgängige Betreuung und das konstruktive Feedback in allen Phasen der Arbeit. Bei Frau Dr. Lea Kredel bedanke ich mich für die Betreuung, die produktiven Treffen und die Einführung in die Welt der wissenschaftlichen Präsentation und Publikation.

An Inka Freise und Herrn Dr. Rainer Glauben geht mein Dank für ihre Unterstützung und die geduldige Beantwortung aller labor- und gerätetechnischen Fragen. Frau Dr. Ulrike Erben möchte ich herzlich für ihre konstruktiven Ratschläge danken. Bei Frau PD Dr. Anja Kühl und Simone Spieckermann möchte ich mich für die großartige Hilfe bei der Planung der Immunhistologie, Anfertigung der Gewebeschnitte und Färbungen sowie der histologischen Zellauszählung bedanken. Franziska Schmidt, Jacqueline Keye, Marie Friedrich, Hao Wu und Carl Weidinger danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die schöne gemeinsame Laborzeit.

Mein Dank für die Kooperation, den Patienteneinschluss und die Unterstützung bei der Gewinnung von Gewebeproben geht an Herrn Professor Jürgen Ordemann, Herrn PD Dr. Christian Denecke und Herrn PD Dr. Jörn Gröne. Hiermit danke ich zudem herzlich allen Patienten, die bereit waren, an dieser Studie teilzunehmen.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und Tobi für ihre immer vorhandene Motivation und Unterstützung.