Aus der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nachweis und Quantifizierung Defensin-positiver Zellen im subepithelialen Ileum von Morbus Crohn-Patienten unter immunsuppressiver Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Maja Vorwerk
aus Altdöbern

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A.J. Kroesen

2. Prof. Dr. med. J.D. Schulzke

3. Prof. Dr. med. A. Stallmach

Datum der Promotion: 19. März 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Die intestinale Mukosa 1

1.1.1 Aufbau und Funktion der intestinalen Mukosa 1

1.1.2 Immunkompetente Zellen im Darm 2

1.2 Defensine 3

1.2.1 Alpha-Defensin 5 und 6 4

1.2.2 Beta-Defensin 2 5

1.3 Morbus Crohn 6

1.3.1 Definition, Epidemiologie, Klinik 6

1.3.2 Ätiologie, Pathogenese 7

1.3.3 Therapie 10

2 Fragestellung **13**

3 Material und Methoden **14**

3.1 Material 14

3.1.1 Arbeitsplatz 14

3.1.2 Software 15

3.1.3 Verbrauchsmaterialien 15

3.1.4 Reagenzien und Chemikalien 17

3.1.5 Gewebe 18

3.1.6 Antikörper 19

3.2 Methodik 20

3.2.1 Patienteneinteilung 20

3.2.2 Gewebevorbereitung 22

3.2.3 Färbeverfahren 23
3.2.4 Mikroskopie 27
3.2.5 Bildbearbeitung und Zielzellauszählung 31
3.2.6 Erfassung der Blutparameter 32
3.2.7 Statistik 33

4 Ergebnisse **34**
4.1 Histologischer Entzündungsgrad 34
4.2 Immunzellen im subepithelialen Ileum 37
4.3 Defensin-positive Zellen im subepithelialen Ileum 38
4.4 Unterschiede im Verteilungsmuster Defensin-positiver Zellen 44
4.4.1 Vergleich zwischen entzündetem und nicht entzündetem Darmgewebe 44
4.4.2 Vergleich zwischen akuter und chronischer Darmentzündung 46
4.4.3 Vergleich von Morbus Crohn-Patienten unter verschiedenen medikamentösen Therapien 46
4.5 Defensin-positive Immunzellen 47
4.6 Zusammenhänge der untersuchten Zellen im Ileum mit verschiedenen Blutwerten 49

5 Diskussion **53**
5.1 Defensinvorkommen im subepithelialen Ileum 53
5.1.1 Defensin-positive Zellen unter entzündlichen Bedingungen 54
5.1.2 Defensin-positive Zellen bei Morbus Crohn unter verschiedenen medikamentösen Therapien 57
5.2 Defensin-positive Immunzellen im subepithelialen Ileum 61
5.3 Korrelation zwischen Defensin-positiven Zellen der ilealen Lamina propria und Blutleukozyten 62
5.4 Fehlerbetrachtung und Ausblick 63

6 Zusammenfassung **66**

Literaturverzeichnis **68**

A Anhang **79**
A.1 Protokoll der Gewebeasservation 79

A.2 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung 80
A.3 Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung 81

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP-1	Activator protein 1
apTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Aqua dest.	Aqua destillata
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
AZA	Azathioprin
BSA	Bovines Serum-Albumin
c	Konzentration
CARD15	Caspase recruitment domain 15
CBF	Campus Benjamin Franklin
CD	Cluster of differentiation (Antigenbezeichnungs-System)
CD4+ Zellen	T-Helferzellen
CD8+ Zellen	Zytotoxische T-Zellen
CD68+ Zellen	Makrophagen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
Cy™2	Carbocyanin
Cy™3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DZ	Dendritische Zellen
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid

Fc	Constant fragment
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
HBD1/β1	Human beta defensin 1
HBD2/β2	Human beta defensin 2
HDA5/α5	Human defensin alpha 5
HDA6/α6	Human defensin alpha 6
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNP1-4	Human neutrophil defensin 1-4
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
λ	Wellenlänge
LTA	Lipoteichonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MAP-Kinase	Mitogen-activated-protein-Kinase
MC	Morbus Crohn
MEK	Methylethylketon
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$.	Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

NFκB	Nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
p.a.	Polymeren-angereichert
PAk	Primärantikörper
PBS	Phosphate buffered saline
POD	Peroxidase
PRR	Pattern-recognition Rezeptor
PS	Pferdeserum
ρ	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAk	Sekundärantikörper
Tcf	Transkriptionsfaktor
TGF-β	Transforming-growth Faktor β
Th1-Zellen	Typ-1-T-Helferzellen
Th2-Zellen	Typ-2-T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
z	Median
ZS	Ziegenserum

Abbildungsverzeichnis

1.1 Schema einer klassischen Entzündungsreaktion 2
1.2 Molekülstruktur von α5-, α6- und β2-Defensin 4

3.1 Altersverteilung sowie Erkrankungsdauer der Studienpatienten 21
3.2 Übersicht zur Immunfluoreszenzfärbung 24
3.3 Schema einer feuchten Kammer zur Antikörperinkubation. 25
3.4 Strahlengang in einem Lichtmikroskop 27
3.5 Prinzip eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops 29
3.6 Prinzip eines Konfokalmikroskops 30
3.7 Zielzellauszählung 32

4.1 Verteilung der Entzündungsstufen über die Gruppen. 35
4.2 HE-Färbung zur Entzündungsgrad-Bestimmung 36
4.3 Boxplots zur Immunzellmenge; Streudiagramme Immunzellen gegen Histoscore 39
4.4 POD-Färbung 41
4.5 Fluoreszenzfärbung 42
4.6 Boxplots zur Menge Defensin-positiver Zellen; Streudiagramme Defensin-positive Zellen gegen Histoscore 43
4.7 Überlagerungsbilder 48
4.8 Boxplots zu präoperativen Blutwerten 51
4.9 Streudiagramme Blutleukozyten gegen Defensin-positive Zellen und Immunzellen 52

Tabellenverzeichnis

3.5 Patienteninformationen differenziert nach den untersuchten Gruppen. 22
3.6 Testfärbereihen zur Qualitätssicherung der Färbemethodik. 26

4.1 Verteilung der Entzündungsstufen über die Gruppen 34
4.2 Immunzellmenge im subepithelialen Ileum 37
4.3 Korrelation zwischen Immunzellen und histologischem Entzündungsgrad; Signifikanztest Darmentzündung versus Kontrolle 38
4.4 Menge Defensin-positiver Zellen im subepithelialen Ileum 40
4.5 Korrelation zwischen Defensin-positiven Zellen und histologischem Entzündungsgrad 44
4.6 Korrelationen zwischen den untersuchten Zellen untereinander 45
4.7 Signifikanztests: Darmentzündung versus Kontrolle und akute versus chronische Darmentzündung 46
4.8 Präoperative Blutwerte 49
4.9 Korrelation zwischen Blutleukozyten und histologischem Entzündungsgrad, Defensin-positiven Zellen und Immunzellen 50

1 Einleitung

1.1 Die intestinale Mukosa

1.1.1 Aufbau und Funktion der intestinalen Mukosa

Der menschliche Dünndarm als Teil des Verdauungstraktes erstreckt sich vom Magenausgang (Pylorus) bis zur Einmündung in den Dickdarm und gliedert sich in die Teile Duodenum, Jejunum und Ileum. Makro- sowie mikroskopisch zeichnet sich die Dünndarmoberfläche durch die groben Kerckring-Falten (Plicae circulares), die fingerförmigen Zotten (Villi intestinales) sowie durch zahlreiche epitheliale Ausstülpungen (Mikrovilli) aus, was die Gesamtoberfläche der Dünndarmschleimhaut (Mukosa) und somit ihre Resorptionsfläche um ein Vielfaches vergrößert.

Der Wandaufbau der intestinalen Mukosa ist dreischichtig und unterteilt sich von apikal nach basal in die Lamina epithelialis mucosae, die Lamina propria mucosae und die Lamina muscularis mucosae. Die Lamina epithelialis ist aus Enterozyten, Becherzellen, Panethzellen sowie enteroendokrinen Zellen zusammengesetzt und hält direkten Kontakt zu unserer Umwelt. Die Lamina propria enthält vorrangig retikuläres Bindegewebe und ist von zahlreichen immunkompetenten Zellen durchsetzt. Größere Ansammlungen von Lymphozyten bilden dabei einen Sekundärfollikel, mehrere zusammenhängende Sekundärfollikel wiederum einen Peyer-Plaque, welcher einen Teil des sogenannten MALT[1] ausmacht. Die Lamina muscularis besteht aus mehreren Lagen glatter Muskelzellen und bestimmt die Schleimhautmotorik. Sie stellt außerdem die Grenzschicht zur Tela submucosa dar [1].

Durch ihre extrem große Oberfläche (circa 300 m^2) kommt die Dünndarmschleimhaut über die Nahrung täglich mit einer Vielzahl verschiedenster Noxen (Mikroorganismen, Toxine,

[1] Mucosa associated lymphoid tissue, englisch für Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe

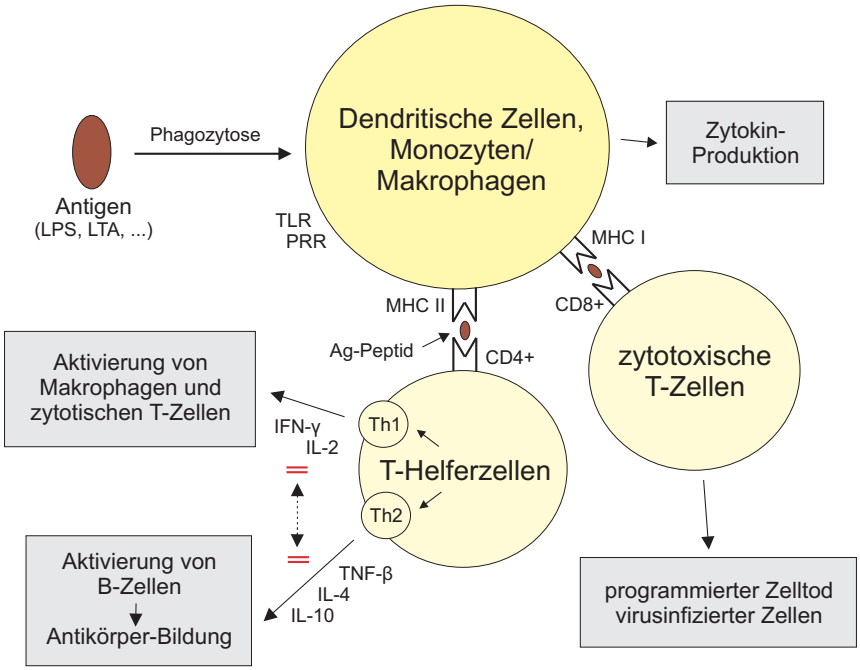

Abbildung 1.1: Schema einer klassischen Entzündungsreaktion

Enzyme, Allergene, physikalische Reize) in Kontakt. Um auf diese adäquat und kontrolliert reagieren zu können, verfügt sie über passive und aktive Abwehr- beziehungsweise Reparaturmechanismen, die einerseits eine Penetration der Noxe ins Schleimhautinnere erschweren oder sogar verhindern, andererseits aber auch eine kompetente Immunantwort auslösen können. Zur Aufrechterhaltung dieser Schutzfunktion ist das Vorhandensein eines komplexen Netzwerkes aus immunkompetenten Zellen und körpereigenen Abwehrstoffen sowie das geordnete Zusammenspielen dieser Faktoren von entscheidender Bedeutung [2].

1.1.2 Immunkompetente Zellen im Darm

Eine Entzündungsreaktion ist die charakteristische körpereigene Antwort auf eine auslösende Noxe. Man unterscheidet zwischen angeborener (*unspezifischer*) und erworbener (*spezifischer*) Immunabwehr, wobei sich in der Praxis keine wirkliche Trennung, sondern vielmehr ein Zusammenwirken beider Systeme zeigt. Trifft, wie in Abbildung 1.1 beispielhaft und stark vereinfacht dargestellt, ein mikrobielles Antigen (zum Beispiel in Form eines Lipopolysaccharids [LPS] oder einer Lipoteichonsäure [LTA]) auf eine antigenpräsentierende Zelle (zum Beispiel Makrophage oder dendritische Zelle), so ist diese durch spezifische Pattern-

recognition Rezeptoren [PRR] (zum Beispiel Toll-like Rezeptoren [TLR], Nucleotid-binding oligomerization domain [NOD]) in der Lage, das Antigen als körperfremd zu erkennen. Nach Phagozytose und Prozessierung des Antigens wird dieses über oberflächliche MHC-Moleküle spezialisierten T-Zellen präsentiert. Die T-Zellen wiederum erkennen die jeweiligen MHC-Moleküle über ihre Oberflächenrezeptoren und können nun eine gesteuerte Immunantwort auslösen. Der Oberflächenrezeptor CD4 charakterisiert hierbei T-Helferzellen, CD8 ist charakteristisch für zytotxische T-Zellen.
Bei der Immunantwort der T-Helferzellen können prinzipiell zwei Richtungen eingeschlagen werden, eine zellulär betonte über die Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) und eine humoral betonte über die Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen). Die Th1-Zellen aktivieren über die Ausschüttung der Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-γ (IFN-γ) Makrophagen und zytotoxische T-Zellen und hemmen gleichzeitig die Th2-Differenzierung. Th2-Zellen induzieren über die Ausschüttung der Zytokine Transforming-growth Faktor β (TGF-β), IL-4 und IL-10 eine Aktivierung der B-Lymphozyten und somit die Bildung spezifischer Antikörper. Gleichzeitig erfolgt wiederum eine Hemmung der Th1-Antwort. Zytotoxische T-Zellen spielen eine Rolle bei der Erkennung und Beseitigung viral infizierter Zellen. Über verschiedene Mechanismen sind sie in der Lage, diese in den programmierten Zelltod zu treiben.
Für die immunkompetenten Zellen ist es nicht nur wichtig, enteropathogene Erreger eliminieren zu können. Sie müssen auch in der Lage sein, Keime der endogenen kommensalen Mikroflora des Darmes zu tolerieren, da diese für die Stabilisierung der Darmbarriere lebenswichtig sind [2].

1.2 Defensine

Defensine sind körpereigene Peptide, die antimikrobielle Aktivität besitzen. Sie bestehen aus 28-44 Aminosäuren, sind 3-5 kDa groß und weisen eine Betafaltblattstruktur auf, welche durch drei intramolekulare Disulfidbrücken charakterisiert ist. Durch Lage und Abstand ihrer Disulfidbrücken werden sie in Alpha- und Beta-Defensine unterschieden (Struktur siehe Abbildung 1.2) [3, 4]. Ihr Genlokus befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 nahe der Telomerregion [5, 6].
Aufgrund ihrer kationischen Polarität sind Defensine in der Lage, an den negativ geladenen

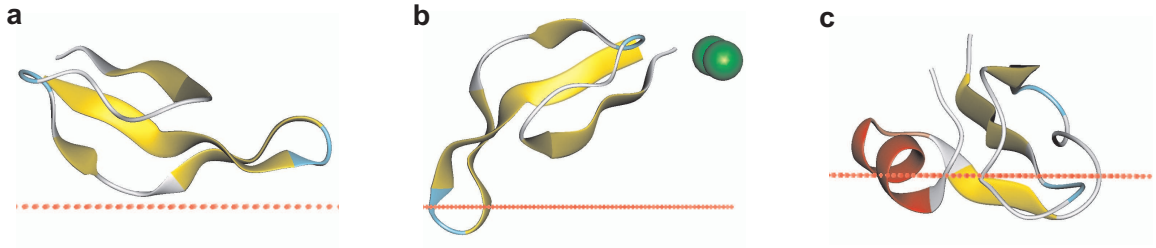

Abbildung 1.2: Molekülstruktur der humanen Defensine $\alpha 5$ (a), $\alpha 6$ (b) und $\beta 2$ (c). Gemeinsames Merkmal ist die Betafaltblattstruktur; die Unterscheidung in Alpha- und Beta-Defensine erfolgt aufgrund der Lage der intramolekularen Disulfidbrücken. (Quelle: [9])

Teil mikrobieller Membranen zu binden, diese zu spalten und somit den mikrobiellen Tod zu verursachen [7, 8]. Diese Wirkung wurde für grampositive und gramnegative Bakterien gezeigt, wie auch für Mykobakterien, Spirochäten, Pilze und umhüllte Viren [10]. Mit ansteigender Salzkonzentration des umgebenden Milieus verlieren sie jedoch zunehmend ihre Wirksamkeit [11].

Durch ihre Exprimierung auf Organoberflächen (z. B. Lunge, Darm, Haut, Augen) stellen Defensine als sogenannte „körpereigene Antibiotika“ einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems dar. Sie vermitteln jedoch nicht nur unspezifische Immunität, sondern regulieren auch spezifische Immunantworten in Form von Chemotaxis und Opsonierung [12].

1.2.1 Alpha-Defensin 5 und 6

Die humanen Alpha-Defensine werden unterteilt in die Humanen Neutrophilen Peptide (HNP1-4 bzw. $\alpha 1$-4) und die Panethzell-Defensine (HDA5 bzw. $\alpha 5$ und HDA6 bzw. $\alpha 6$). Ihre Expression erfolgt konstitutiv, bei $\alpha 1$-4 vorrangig durch zirkulierende Neutrophile Granulozyten, bei $\alpha 5$ und $\alpha 6$ hauptsächlich durch Panethzellen in der Basis der Lieberkühn-Krypten des Ileums sowie durch einige instestinale Epithelzellen und metaplastische Panethzellen im Kolon. $\alpha 5$ und $\alpha 6$ werden bis zur Ausschüttung als Propeptide in Vesikeln gespeichert und erlangen erst nach Prozessierung ihre aktive Form [13, 14]. Die Prozessierung in das reife Peptid erfolgt beim Menschen durch das Enzym Trypsin [16].

Durch ihre antimikrobielle Aktivität tragen $\alpha 5$ und $\alpha 6$ im Darm wesentlich zur Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosabarriere sowie zum physiologischen Schutz der epithelialen

Stammzellen vor verschiedenen pathogenen und kommensalen Darmkeimen bei [14, 15]. Als Antwort auf mikrobielle Stimuli wie LPS oder LTA kommt es zu einer vermehrten Defensinexpression sowie zu einer verstärkten Ausschüttung der Peptide in den Extrazellularraum [17, 18]. Die Panethzelldegranulation wird dabei wahrscheinlich durch den Toll-like Rezeptor 9 (TLR 9) vermittelt [19]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Knockout-Mäuse, denen es an Matrilysin (murines Äquivalent zum humanen Trypsin zur Prozessierung der Alpha-Defensine) fehlte, eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für oral verabreichte Bakterien gegenüber dem Wildtyp aufweisen [20]. Transgene Mäuse, die α5 exprimierten, waren deutlich resistenter gegen Salmonella typhimurium und ertrugen sogar Bakterienkonzentrationen, die für den Wildtyp tödlich waren [21]. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte auch, dass Salmonella typhimurium wiederum die Expression von Panethzell-Defensinen inhibiert [22]. Für α5 fand man heraus, dass es als effektives Antitoxin gegen Clostridium difficile wirkt, in dem es die Toxinaggregation stimuliert [23]. Während für die Alpha-Defensine 1-5 auch immunmodulatorische Effekte machgewiesen wurden [24, 25, 26, 27], steht für α6 dieser Nachweis bisher noch aus.

1.2.2 Beta-Defensin 2

Beta-Defensine werden im menschlichen Organismus von Epithelzellen exprimiert, welche in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen (Auge, Haut, Lunge, Darm). Während die Beta-Defensin-1-Expression (HBD1 bzw. β1) konstitutiv erfolgt, ist Beta-Defensin 2 (HBD2 bzw. β2) in gesunder Dünndarmschleimhaut nur in geringer Menge vorhanden. Es wird jedoch stark hochreguliert nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren (wie TNF-α, IL-1β), als Antwort auf Darmpathogene und Probiotika (LPS gramnegativer und schwächer grampositiver Bakterien) oder während einer Darmentzündung [28, 29]. Die Hochregulierung von β2 läuft anhand einer komplexen Signalkaskade ab, bei welcher die Toll-like Rezeptoren (insbesondere TLR2 und TLR4) sowie der intrazelluläre Rezeptor NOD2 eine wesentliche Rolle spielen [30]. TLR2, TLR4 und NOD2 gehören zur Gruppe der Pattern-Recognition Rezeptoren und befinden sich im Darm hauptsächlich auf Makrophagen, dendritischen Zellen, Enterozyten sowie Panethzellen [31]. Sie erkennen spezielle Komponenten der Bakterienwand (zum Beispiel Peptidoglykan) und aktivieren nach deren Bindung verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor kappa B (NFκB) oder Activator protein 1 (AP-1) [32]. Diese

wiederum induzieren die Transkription von $\beta 2$ und anderen proinflammatorischen Mediatoren [33, 34, 35]. Diverse Studien zeigen, dass Mutationen im NOD2/CARD15-Gen zu einer eingeschränkten Aktivierung von NFκB und damit zu einer reduzierten $\beta 2$-Ausschüttung führen (siehe Kapitel 1.3.2) [36]. Hier könnte eine wesentliche Schwachstelle in der Darmgewebshomöostase liegen, welche möglicherweise für eine chronisch entzündliche Darmerkrankung prädisponiert [37].
Neben seiner antimikrobiellen Eigenschaft hat $\beta 2$ auch immunmodulatorische Funktion. An unreifen dendritischen Zellen agiert es als endogener Ligand für TLR4 und induziert somit die Zellreifung sowie die Expression kostimulatorischer Enzyme. Weiterhin ist $\beta 2$ chemotaktisch für Gedächtnis-T-Zellen. Es könnte somit eine wichtige Rolle im Immunüberleben gegen Pathogene, Autoantikörper und Tumorantigene spielen [38, 39].

1.3 Morbus Crohn

1.3.1 Definition, Epidemiologie, Klinik

Beim Morbus Crohn[2] handelt es sich um eine chronisch entzündliche, meist in Schüben verlaufende Darmerkrankung, die alle Abschnitte des Verdauungstraktes betreffen kann und durch eine diskontinuierliche, transmurale und häufig granulomatöse Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist. Am häufigsten manifestiert sich die Erkrankung in Form einer Ileokolitis (40-55%), einer Ileitis terminalis (25-40%) oder einer Kolitis (15-35%, davon in circa 30% der Fälle mit Rektumbeteiligung). Isolierter Magen- oder Ösophagusbefall kommt deutlich seltener (1-4%) vor.
Makro- wie mikroskopisch zeigt sich eine Entzündung aller Wandschichten der segmental betroffenen Darmabschnitte sowie eine fibrotische Verdickung der Darmwand mit Ausbildung segmentaler Stenosen, aphtösen Läsionen, fissuralen Ulzera und Fisteln. Typisch sind das sogenannte „Pflastersteinrelief“ durch ödematös aufgetriebene Schleimhautinseln sowie der „Gänsehautaspekt“ durch lymphofollikuläre Hyperplasie. Histologisch finden sich häufig Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen sowie weiterhin eine Hyperplasie der regionären Lymphknoten und eine Lymphangiektasie.
Es wird prinzipiell beim Morbus Crohn zwischen einem inaktiven, einem akut rezidivieren-

[2] beschrieben und benannt nach dem amerikanischen Mediziner Burrill Bernhard Crohn (1884-1983)

den und einem chronisch aktiven Verlauf unterschieden, wobei die Klinik vielgestaltig ist. Zu den häufigsten Symptomen zählen vor allem krampfartige rechtsseitige und periumbilikale Bauchschmerzen, wässrige, selten auch blutige Durchfälle, starker Gewichtsverlust und Fieber. Mögliche Komplikationen sind perianale Abszesse und Fisteln, Subileuszustände oder sogar Darmperforationen. Seltener manifestiert sich die Krankheit extraintestinal. Im Labor zeigen sich häufig erhöhte Entzündungswerte (Leukozytose, erhöhtes CRP) sowie bestimmte Blutbildveränderungen (Anämie, Thrombozytose). Die veränderten Blutparameter sind jedoch alle nicht krankheitsspezifisch, sondern helfen lediglich den Schweregrad der Erkrankung abzuschätzen beziehungsweise den Verlauf zu kontrollieren [40].
Die Inzidenz der Erkrankung beträgt in Deutschland 5,2/100.000/Jahr, die Prävalenz wird auf 120-200/100.000 geschätzt. Auch wenn ein Häufigkeitsgipfel zwischen dem 15. und 34. Lebensjahr [41] beschrieben wurde, kann man prinzipiell in jedem Alter an einem Morbus Crohn erkranken. Das Geschlechterverhältnis liegt mit einem relativen Risiko von 1,2 leicht auf der Seite des weiblichen Geschlechts. Kaukasier (insbesondere Ashkenazi-Juden) erkranken häufiger als Negroide und Asiaten. Schwarzafrikaner sind deutlich seltener betroffen als weiße Afrikaner, wohingegen Afroamerikaner eine der weißen Bevölkerung ähnliche Krankheitshäufigkeit aufweisen. Es ist weiterhin ein Nord-Süd-Gefälle zu verzeichnen, ebenso ein Anstieg der Häufigkeit mit zunehmendem sozioökonomischen Status.
Die Prognose wird beim Morbus Crohn weitestgehend von den Komplikationen bestimmt, die eine chirurgische Intervention notwendig machen, wie zum Beispiel Stenosen, Ileuszustände, Perforationen oder Fisteln. Medikamentennebenwirkungen sind dank verbesserter Präparate heute nicht mehr der limitierende Faktor. Unter adäquater Betreuung und Therapie ist die Lebenserwartung der Betroffenen kaum eingeschränkt [40].

1.3.2 Ätiologie, Pathogenese

Trotz intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte ist die Pathogenese des Morbus Crohn noch immer nicht vollständig geklärt. Man geht heute von einer multifaktoriellen Ätiologie aus, die sich aus genetischen Manifestationen auf der einen Seite und bestimmten Umweltfaktoren auf der anderen Seite ergibt. Die additive Wirkung der Einzelrisikofaktoren evoziert schließlich eine Imbalance zwischen Wirtsanfälligkeit, Darmflora und Schleimhautimmunität [42].

Generell lässt sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine familiäre Häufung (10% der Patienten) sowie eine hohe Konkordanz in monozygoten Zwillingen (50-60%, dagegen nur 4% in dizygoten Zwillingen) beobachten, so dass eine erbliche Disposition unumstritten ist [40]. Mehr als 30 genetische Kopplungsregionen wurden im Laufe der letzten Jahre für den Morbus Crohn detektiert [43]. Am bedeutendsten darunter war die Detektion von „IBD1“, einem Locus auf Chromosom 16q, der für das NOD2/CARD15-Gen kodiert (siehe Kapitel 1.2.2) [44]. NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor für Muramyldipeptid, einem Bakterienwandprodukt auf antigenpräsentierenden Zellen. Eine durch ihn induzierte Signaltransduktion geht üblicherweise mit einer Erhöhung des Transkriptionsfaktors NFκB einher, welcher wiederum die Bildung proinflammatorischer Mediatoren (Zytokine, Defensine) einleitet. Bestimmte Veränderungen im NOD2/CARD15-Gen sind in hohem Maße mit dem Auftreten eines Morbus Crohn assoziiert und dabei vor allem mit dem Risiko einer Beteiligung des terminalen Ileums, einem frühen Krankheitsbeginn sowie strikturierenden Erkrankungsformen [37, 45]. NOD2 ist bei 20-30% der Morbus Crohn-Patienten mutiert, allerdings kann wahrscheinlich nur bei weniger als 10% der Morbus Crohn-Patienten die Krankheitsmanifestation durch eine NOD2-Variante allein erklärt werden [40].
Neben der genetischen Suszeptilität ist die Störung der intestinalen Barrierefunktion ein weiterer wichtiger Punkt in der Pathogenese des Morbus Crohn. Dem intestinalen Immunsystem stehen normalerweise eine Reihe verschiedener immunologischer Mechanismen zur Verfügung, um sich mit dem großen Keimspektrum des menschlichen Darmes auseinanderzusetzen. Es ist dabei in der Lage, den Wirt einerseits vor pathogenen Infektionen zu schützen, andererseits aber auch Keime der kommensalen Darmflora zu tolerieren. Die Hyporeaktivität (Toleranz) auf die endogene Darmflora versteht sich dabei als aktiver Hemmprozess, vorrangig vermittelt durch T-Helferzellen, und stellt sicher, dass die permanente physiologische Antigenpräsentation nicht zu einer lokalen Immunantwort mit dem Ergebnis einer Darmentzündung führt. Wesentlich dabei ist einerseits die Intaktheit der epithelialen Grenzschicht, andererseits aber auch die gezielte Aktivierung antiinflammatorischer Mediatoren. Teile dieser Mechanismen scheinen jedoch beim Morbus Crohn gestört zu sein [40, 46]. So wurde bei Morbus Crohn-Patienten eine veränderte intestinale Permeabilität sowie eine erhöhte Anzahl oberflächenadhärenter Bakterien nachgewiesen [49, 50, 51, 52]. Des Weiteren fand sich eine Überexpression proinflammatorischer Th1-Zytokine (TNF-α, IFN-γ, IL-1β)

sowie eine verringerte Anzahl antiinflammatorischer Th2-Zytokine (IL-4, IL-10, TGF-β) in der Lamina propria [53, 54, 55]. Aus diesem Grund geht man heute davon aus, dass es sich beim Morbus Crohn um eine Th1-Krankheit handelt, bei welcher die Differenzierung der T-Helferzellen vorrangig zugunsten der Th1-Zellen verläuft (siehe Kapitel 1.1.2) [46]. Die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-β bewirken eine Hochregulation der Expression von NOD2 in den Epithelzellen, was eine verstärkte NFκB-Aktivierung zur Konsequenz hat [56]. Umgekehrt induziert NFκB vor allem die Bildung proinflammatorischer Zytokine und hemmt die Apoptose von T-Zellen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von TLR2 und TLR4 auf Makrophagen der Lamina propria bei Morbus Crohn-Patienten erhöht ist [57]. Auch dieser Effekt geht durch eine Signalverstärkung mit einer gesteigerten NFκB-Aktivierung einher, was unabhängig davon in anderen Studien bestätigt wurde [58]. Eine NOD2-Genmutation, die bei einem Teil der Morbus Crohn-Patienten zu finden ist, würde dagegen eine verminderte NFκB-Stimulation implizieren. Die Ergebnisse scheinen widersprüchlich und bedürfen weiterführender Erklärungsmodelle. Auch ist noch nicht klar, was an dieser Stelle Ursache und was Wirkung ist. Es wird jedoch vermutet, dass alle Immunprozesse schlussendlich in einem Circulus vitiosus münden, bei welchem die pathologische Entzündungsreaktion durch positive Rückkoppelung aufrechterhalten wird. Die Folge ist eine Chronifizierung des Geschehens [37, 46].

Für den Morbus Crohn existieren weitere wichtige Risikofaktoren aus dem Bereich der Lebensweise, die immer wieder kontrovers diskutiert werden. So gilt der Einfluss des Rauchens auf die Krankheitsgenese heute als gesichert, wohingegen orale Kontrazeptiva beziehungsweise bestimmte Ernährungsgewohnheiten, wie erhöhter Konsum raffinierter Zucker und wenig Ballaststoffe, keinen gesicherten Einfluss zu haben scheinen [40]. Es wird außerdem postuliert, dass die verstärkte Hygiene und damit verbundene Erregerkarenz in den ersten Lebensjahren (vor allem in den Industrieländern und dort in den sozioökonomisch höher gestellten Schichten) sowie vorausgegangene bakterielle oder virale Darminfektionen bei der Krankheitsmanifestation eine Rolle spielen könnten [47]. Langem Stillen dagegen wird ein protektiver Effekt zugeschrieben. Auch psychosomatische Faktoren wurden immer wieder im Hinblick auf die Krankheitsausprägung in Erwägung gezogen. Gesicherte Zusammenhänge, dass Morbus Crohn-Patienten einer bestimmten Persönlichkeitsstruktur zuzuordnen sind, liegen jedoch nicht vor [40].

1.3.3 Therapie

Die Therapie des Morbus Crohn bietet eine Reihe verschiedener Ansatzpunkte, begonnen bei der medikamentösen Behandlung über die enterale Formuladiät, die Psychotherapie und komplementärtherapeutische Verfahren (unter anderem Akupunktur, Nahrungsergänzung) bis hin zur chirurgischen Intervention. Trotz der großen Bandbreite gibt es derzeit noch keine kausalen beziehungsweise kurativen Ansätze, das heißt eine Behandlung des Morbus Crohn erfolgt derzeit rein symptomatisch.
Die medikamentöse Morbus Crohn-Therapie beinhaltet verschiedene antiphlogistische sowie immunsuppressive Substanzen. Kortikosteroide zählen sowohl in der Schubtherapie als auch in der Remissionserhaltung zu den Basistherapeutika der ersten Wahl und werden je nach Schwere- und Komplikationsgrad der Krankheit mit anderen immunmodulatorischen Substanzen (Azathioprin, Methotrexat, TNF-alpha-Rezeptorblocker, Cyclosporin A) sowie gegebenenfalls Antibiotika kombiniert. Der Einsatz von 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) als Basistherapeutikum wird nach heutigem Stand nicht mehr generell empfohlen [40, 59].
Im folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Medikamente Mesalazin, Prednisolon und Azathioprin im Einzelnen vorgestellt, jeweils basierend auf den aktuellen Therapie-Leitlinien und bezogen auf einen Morbus Crohn mit Ileozökalbefall.

Mesalazin

Mesalazin gehört zur Gruppe der Aminosalicylate und greift als solches unspezifisch in den Entzündungsprozess ein. Zu den Wirkungen zählen die Reduktion der Leukotrien- und Prostaglandinsynthese, die Expressionshemmung von Immunglobulinen und proinflammatorischen Zytokinen, die Inaktivierung freier O_2-Radikale, die Reduktion der Leukozyten-Chemotaxis sowie die Aktivitätssenkung neutrophiler Granulozyten. Mesalazin kann sowohl systemisch (Tabletten, Granulat) als auch topisch (Suppositorien, Klysmen, Rektalschaum) verabreicht werden. Die empfohlene Dosis liegt bei 4 g/Tag. Basierend auf Studien, die eine Remissionsinduktion von Mesalazin zeigen konnten, sowie aufgrund der geringen Nebenwirkungen der Substanz galt Mesalazin lange als Mittel der Wahl in der Behandlung eines Morbus Crohn mit leichter bis mäßiger Entzündungsaktivität. Die Wirksamkeit zur Remissionsinduktion wie auch zur Remissionserhaltung ist heute jedoch aufgrund des zu geringen Effektes umstritten, so dass die neuen Leitlinien einen begleitenden Einsatz von Mesalazin

lediglich bei Beteiligung des Kolons empfehlen [40, 59, 60].

Prednisolon

Prednisolon ist ein synthetisches Glukokortikoid und ein aktiver Metabolit des Prednisons. Es besitzt eine ausgeprägte immunsuppressive, antiinflammatorische und antiallergische Wirkung. Über spezifische Glukokortikoidrezeptoren wird die Transkription von Genen beeinflusst. Einerseits wird so die Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen gehemmt und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine vermindert. Andererseits senkt Prednisolon die Makrophagenaktivität und die Lymphozytenzahl, hemmt Granulozyten an der Migration und setzt die Permeabilität von Blutgefäßen herab. Es moduliert somit Prozesse des zellulären und humoralen Immunsystems. Der Einsatz von Prednisolon bei Morbus Crohn mit Ileozökalbeteiligung erfolgt oral und wird empfohlen bei mäßiger bis hoher Entzündungsaktivität in einer Dosierung von 1 mg/kg KG/Tag, sollte aber aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen der Substanz nur kurzzeitig verabreicht beziehungsweise nach Remissionsinduktion langsam ausgeschlichen werden. Für eine remissionserhaltende Therapie sind Steroide generell ungeeignet. Als problematisch bei der Steroidgabe erweisen sich die Steroidabhängigkeit (wenn eine stabile Remission nur unter andauernder Steroidapplikation erreicht werden kann und zwei Ausschleichversuche innerhalb von sechs Monaten scheitern) sowie die Steroidresistenz (wenn trotz hoher kontinuierlicher Steroidgaben keine Remission erreicht wird) [40, 59, 60].

Azathioprin

Azathioprin gehört zur Gruppe der klassischen Immunsuppressiva und ist ein Derivat des 6-Mercaptopurins. Als Purinantagonist beeinträchtigt es die DNA- und RNA-Synthese und führt somit zu einer Hemmung der zellulären und humoralen Immunabwehr. Sein therapeutischer Nutzen beruht in erster Linie auf der Proliferationshemmung von T- und B-Lymphozyten sowie Natürlichen Killerzellen. Ein weiterer kürzlich nachgewiesener Wirkmechanismus ist die Apoptoseinduktion von T-Zellen durch Blockade des G-Proteins Rac1. Die CD28-abhängige Rac1-Aktivierung führt normalerweise zur kontrollierten T-Zellaktivierung. Eine Blockade dieses Signalweges führt somit zur T-Zellsuppression [48]. Azathioprin ist zur Behandlung mittelschwerer bis schwerer Fälle des Morbus Crohn zugelassen, wenn Kortiko-

steroide nicht vertragen werden oder mit hohen Dosen keine ausreichende Wirkung erzielt wird. Weiterhin ist es das Mittel der Wahl zur Rezidivprophylaxe nach einem schweren Schub beziehungsweise postoperativ. Die Dosierung ist individuell festzulegen, im Normalfall werden 2-2,5 mg/kg KG/Tag verabreicht. Für eine dauerhafte Remission ist oftmals eine Langzeitanwendung erforderlich. Es muss dabei bedacht werden, dass ein klinisches Ansprechen der Substanz erst nach circa acht Wochen erwartet werden kann [40, 59, 60].

2 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Defensinexpression im entzündlichen Infiltrat der Ileumwand bei Morbus Crohn-Patienten unter verschiedenen medikamentösen Therapieschemata zu untersuchen. Im Fokus der Betrachtungen stand die Lamina propria, da sich in dieser Zellschicht eine Darmentzündung vornehmlich abspielt und sich dort auch die größte Dichte an immunkompetenten Zellen befindet.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragen:

1. Kommen die konstitutiv exprimierten Defensine $\alpha 5$ und $\alpha 6$ beziehungsweise das regulierte Defensin $\beta 2$ in Zellen der Lamina propria des Ileums vor?

2. Gibt es Unterschiede im Verteilungsmuster der Menge Defensin-positiver Zellen in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Entzündung?

3. Gibt es Unterschiede im Verteilungsmuster dieser Defensin-positiven Zellen zwischen einer akuten (Appendizitis) und einer chronischen (Morbus Crohn) Darmentzündung?

4. Verändert sich das Verteilungsmuster der Menge Defensin-positiver Zellen bei Morbus Crohn unter verschiedenen medikamentösen Therapien (Mesalazin, Kortison, Azathioprin)?

5. Gibt es Zusammenhänge zwischen Defensin-positiven Zellen und Entzündungszellen im subepithelialen Ileum?

6. Gibt es Zusammenhänge zwischen Defensin-positiven Zellen beziehungsweise Entzündungszellen im Ileum und verschiedenen Blutwerten (Hämoglobin, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, partielle Thromboplastinzeit)?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arbeitsplatz

Die experimentellen Tätigkeiten dieser Forschungsarbeit wurden im Chirurgischen Forschungslabor sowie im Forschungsbereich der Klinischen Physiologie des Klinikums Benjamin Franklin durchgeführt. Folgende Arbeitsgeräte wurden genutzt:

Gerät	***Hersteller***
Brutschrank *Typ A*	Melag®, Berlin, Deutschland
Digitalkamera *ColorView XS*	Olympus Optical Co. Ltd., London, UK
Digitalkamera *AxioCam MRc*	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Einbettanlage *Histocenter™*	Shandon Inc, Pittsburgh, USA
Fluoreszenzmikroskop *BX 60 F5*	Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
Gewebeaufbereiter *Hypercenter™ XP*	Shandon Inc, Pittsburgh, USA
Laser Scanning Mikroskop *LSM 510 META*	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop *Axioskop 2*	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer *MR 3001*	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Pipetten (diverse) *Research®*, *Reference®*	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle *M1727N*	Samsung Electronics Co. Ltd., Chertsey, UK
pH-Meter *CG 840*	Schott AG, Mainz, Deutschland
Pipettierhilfe *pipetus®-akku*	Hirschmann® Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage *BP 310 S*	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Schneidegerät *RM2125RT*	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Mixer *Stuart® SA7*	Barlowold Scientific Ltd., Stone, UK
Wasserbad *MH 8501*	Electrothermal® Engineering Ltd., Southend-on-Sea, UK
Zentrifuge *5415 D*	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Software

Programm	***Hersteller***
AnalySIS, Version 3.0	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland
AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
CorelDRAW Graphics Suite, Version 12.0.0.458	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Photoshop CS	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
SPSS, Version 11.5.1	SPSS Software GmbH, München, Deutschland
WinShell, Version 3.1.0.10	Ingo H. de Boer, Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	***Bezugsquelle***
Adhäsive Objektträger *Histobond® ISO 8037/1*	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Knigshofen, Deutschland
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bechergläser aus Duran®	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Cryoboxen aus Karton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser (diverse)	Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

Einbettkassetten für paraffiniertes Gewebe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Probenbecher	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Wägeschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Färbegestelle mit Glaskasten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbekästen nach Hellendahl mit Erweiterung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gewindeflaschen aus Duran®	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Korkplatten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührstäbe (zylinderförmig)	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Messbecher	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Messkolben	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Messpipetten (diverse) *Falcon*®	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Messzylinder aus Duran® (diverse)	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Mikrotomklingen *S35*	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Objektträgerkästen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pinzetten (diverse)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (diverse) *epT.I.P.S.*®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präparatemappen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15ml)	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Reaktionsgefäße (50ml)	Sarstedt AG & Co., Nmbrecht, Deutschland
Skalpelle (diverse)	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Spatel (diverse)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzflaschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trichter aus Duran®	Schott-Rohrglas GmbH, Mitterteich, Deutschland
Viereckige Petrischalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellstofftücher	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	***Bezugsquelle***
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DakoCytomation Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium *Roti®-Histokitt II*	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium *Shandon Immu-Mount®*	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Eosinlösung 2%	Chroma GmbH, Münster, Deutschland
Essigsäure 100% (Eisessig)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 Vol.-%, denaturiert mit MEK	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Ethanol ≥ 99,8 Vol.-%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fc-Rezeptor-Blocking-Reagenz	Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, Deutschland
Formalin-Lösung 10%, neutral gepuffert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerin *Rotipuran®* ≥ 99,5%, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraffin *Histosec®*, p.a., hochrein	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pferdeserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure, kristallin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

PBS-Lösung: auf 3 l Aqua dest.
17,25 ml Lösung A
→ 27,6 g NaH_2PO_4 auf 1 l Aqua dest. (+4°C)
57,72 ml Lösung B
→ 35,6 g Na_2HPO_4 auf 1 l Aqua dest. (RT)
13,44 g NaCl
pH = 7,4

EDTA-Lösung [0,5 M]: 146,45 mg auf 1 l Aqua dest.
pH = 8

Hämatoxylin nach Mayer: 1000 ml Aqua dest. (70°C)
1 g Hämatoxylin
0,2 g Natriumjodat
50 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)
50 g Chloralhydrat
1 g kristalline Zitronsäure

Eosin-Gebrauchslösung: 12,25 ml Eosinlösung (2%ig) auf 250 ml Aqua dest.
1 Tropfen Eisessig

3.1.5 Gewebe

Der Hauptteil der verwendeten Darmgewebe entstammt einer 1998 angelegten Gewebebank der Chirurgischen Klinik der Charité (Campus Benjamin Franklin, Berlin), welche Darmresektate beziehungsweise -biopsate von Morbus Crohn-, Colitis Ulcerosa- und Darmtumorpatienten archiviert. Die vorliegende Arbeit nutzte daraus ausschließlich Ileumresektate und -biopsate von Morbus Crohn- und Tumorpatienten. Ileales Gewebe wurde gewählt, da sich

ein Morbus Crohn initial vorwiegend im terminalen Ileum manifestiert und somit auf einen großen Patientenpool zugegriffen werden konnte.
Des Weiteren wurden Appendixresektate von Appendizitispatienten verwendet, welche für diese Arbeit in gleicher Vorgehensweise wie die Darmgewebe der oben genannten Gewebebank aufbereitet wurden (siehe 3.2.2).
Die durchgeführte Studie unterlag den Richtlinien und der Genehmigung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Von allen Patienten lag ein schriftliches Einverständnis über die weitere Nutzung der Gewebeproben sowie ihrer Krankenhaus-Daten zu Studienzwecken vor.

3.1.6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Färbereihen verwendet:

Primärantikörper Reaktivität: human			
Antigen ***Klon***	***Spezies***	***Klonalität*** ***Isotyp***	***Bezugsquelle***
α-Defensin 5 -	Kaninchen	polyklonal IgG	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
α-Defensin 6 -	Kaninchen	polyklonal IgG	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
β-Defensin 2 -	Ziege	polyklonal IgG	Abcam Ltd., Cambridge, England
CD4 4B12	Maus	monoklonal IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
CD8 BC/1A5	Maus	monoklonal IgG	Biocare Medical, Concord, Kanada
CD68 KP1	Maus	monoklonal IgG	Biocare Medical, Concord, Kanada

Sekundärantikörper Reaktivität: Primärantikörper-Spezies			
Antigen Konjugation	***Spezies***	***Klonalität Isotyp***	***Bezugsquelle***
Kaninchen Cy™2	Ziege	polyklonal IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege Cy™2	Esel	polyklonal IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
Maus Cy™3	Esel	polyklonal IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland

Die in lyophilisierter Form vorliegenden Defensin-Antikörper wurden jeweils in 100 μl PBS gelöst ($c_{\alpha 5,\ \alpha 6}$ = 1 mg/ml, $c_{\beta 2}$ = 0,5 mg/ml) und anschließend in Aliquots à 20 μl bei -20°C gelagert. Die Lagerung der Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls bei -20°C in 10 μl-Aliquots nach jeweiliger Lösung in 100 μl PBS und 100 μl Glycerin (c_{Cy2} = 1,5 mg/ml, c_{Cy3} = 1,4 mg/ml). Die Antikörper gegen CD4, CD8 und CD68 wurden in liquider Form bezogen (c = 1 mg/ml) und in Aliquots à 20 μl bei +4°C gelagert.

3.2 Methodik

3.2.1 Patienteneinteilung

Zunächst wurden die Morbus Crohn-Patienten der verwendeten Gewebebank mit Hilfe ihrer Krankenhaus-Akten in drei Subgruppen eingeteilt. Für die erste Gruppe wurden nur solche M. Crohn-Patienten ausgewählt, die mindestens drei Monate vor ihrer OP beziehungsweise Koloskopie keine immunsupressiven Medikamente eingenommen, sondern lediglich eine entzündungshemmende Therapie mit Mesalazin erhalten hatten. In die zweite Gruppe wurden M. Crohn-Patienten aufgenommen, die seit mindestens drei Wochen präoperativ unter systemischer Steroid-Therapie standen und dabei eine Mindestdosis von 80 mg Kortison ($\widehat{=}$ 20 mg Prednisolon) täglich erhalten hatten. Der dritten Gruppe wurden M. Crohn-Patienten unter Azathioprin-Therapie zugeteilt, welche dieses über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten in einer Dosierung von 150 mg pro Tag erhielten. Drei Wochen vor der geplanten Darmresektion wurde standardgemäß bei diesen Patienten die Azathioprin-Therapie unterbrochen.

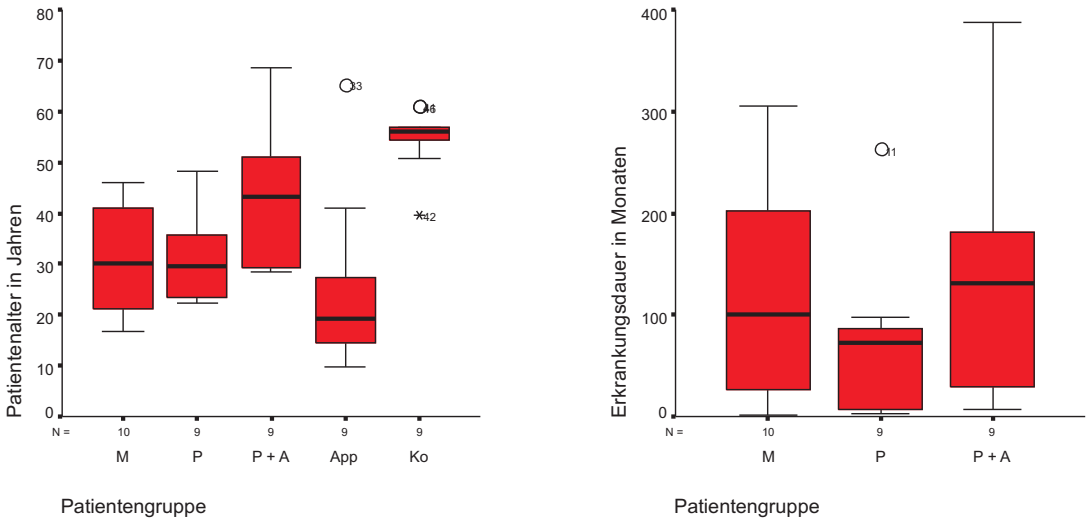

Abbildung 3.1: Boxplots über die Altersverteilung der Studienpatienten sowie die Erkrankungsdauer innerhalb der verschiedenen Morbus Crohn-Patientengruppen.

Alle verwendeten Appendizitis-Patienten standen zum Zeitpunkt der Operation unter keiner immunsuppressiven Therapie. Es wurden weiterhin nur diejenigen Patienten für die vorliegende Arbeit verwendet, deren Appendizitis im postoperativ erfolgten pathologischen Gutachten als akut klassifiziert wurde. Patienten mit subakuter oder perforierter Appendizitis wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Als Kontrolle diente gesundes Ileumgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom, welches aus den ilealen Resektionsrändern der Tumorresektate gewonnen werden konnte. Es wurden keine Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis verwendet.

Der folgenden Tabelle 3.5 sowie Abbildung 3.1 sind weitere Informationen zu den Patientenkollektiven zu entnehmen. Es ist ersichtlich, dass die Altersverteilung innerhalb der verschiedenen Patientengruppen inhomogen ist. Während an einer Appendizitis größtenteils jüngere Menschen erkranken (Altersmedian z = 19 Jahre), sind Darmtumorpatienten selten unter 50 Jahre alt (z = 55 Jahre). Für Morbus Crohn liegt der Altermedian eher im mittleren Bereich (z = 35 Jahre). Die einzelnen Studiengruppen, die Patienten mit einer Darmentzündung (Morbus Crohn, Appendizitis) enthalten, unterscheiden sich bezüglich ihres Alters signifikant von den Kontrollpatienten. Innerhalb der Patientengruppen mit einer Darmentzündung gibt es lediglich zwischen Appendizitis-Patienten und M. Crohn-Patienten unter Kombinationstherapie signifikante Altersunterschiede. Die durchschnittliche Erkran-

Patientengruppe	**1** M. Crohn	**2** M. Crohn	**3** M. Crohn	**4** Appendizitis	**5** Kontrolle
Therapie	M	P	P + A	-	-
Anzahl	10	9	9	9	9
Geschlecht m : w	6 : 4	3 : 6	4 : 5	5 : 4	4 : 5
Altersmedian [Jahre] (Variationsbreite)	27,5 (16 - 46)	29 (22 - 48)	43 (28 - 68)	19 (9 - 65)	55 (39 - 61)
Erkrankungsdauer [Monate] (Variationsbreite)	100 (1 - 306)	73 (3 - 263)	130 (7 - 388)	-	-

Tabelle 3.5: Patienteninformationen differenziert nach den untersuchten Gruppen.

kungsdauer eines Morbus Crohns bis zur Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention beträgt für alle Studienpatienten 108 Monate (Median m = 81 Monate), wobei hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen existieren.

3.2.2 Gewebevorbereitung

Gewebeasservation

Direkt nach der chirurgischen oder koloskopischen Entnahme wurden die Darmresektate beziehungsweise -biopsate zurechtgeschnitten, gegebenenfalls zur Schleimhautstraffung auf eine Korkunterlage gespannt und zur Gewebestabilisierung sowie Schrumpfungsminimierung in 10%iger gepufferter Formalinlösung je nach Resektatgröße für mindestens 24 Stunden fixiert. Nach Abschluss der Fixation erfolgte die maschinelle Aufbereitung der Gewebestücke im pathologischen Institut der Charité (Campus Benjamin Franklin, Berlin). Hierbei wurden die fixierten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Aceton eingelegt und anschließend bei +60°C paraffiniert (genaues Protokoll siehe A.1). Abschließend erfolgte die Paraffin-Einbettung der Gewebe in spezielle Einbettkassetten. Die konservierten Gewebeblöcke werden bei +4°C gelagert und stehen somit Jahrzehnte für weitere Bearbeitungsschritte zur Verfügung.

Anfertigung der Gewebeschnitte

Von den paraffinierten Gewebeblöcken wurden am Microm-Schneidegerät 3μm dicke Dünnschnitte angefertigt und diese auf speziell beschichtete, adhäsive Objektträger (Histobond®) aufgetragen. Die Fixation wurde durch nächtliches Inkubieren bei +37°C optimiert.

3.2.3 Färbeverfahren

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist als histologisches Routinefärbeverfahren in der Lage, verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes morphologisch darzustellen. Saure Moleküle im Schnitt (Kerne, Schleimsubstanzen, Bakterien, Kalk) werden durch Färbung in basischem Hämalaun und anschließendem Spülen in Leitungswasser („Bläuen“) blau dargestellt, basische Strukturen (Zytoplasma, Kollagen, proteinhaltige Lösungen) erscheinen nach Färbung mit saurem Eosin rot. Das genaue Färbeprotokoll befindet sich im Anhang A.2.

Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine geeignete Färbemethode zur Darstellung spezifischer zelleigener Proteine oder anderer Makromoleküle. Es werden fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt, die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden können. Die vorliegende Arbeit hat die indirekte Immunfluoreszenz-Methode verwendet, bei der ein unmarkierter Primärantikörper an das gewünschte Antigen bindet und dessen Fc-Teil anschließend durch einen zweiten, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert wird. Es können dabei sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper verwendet werden. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozyten gebildet und sind in der Konsequenz immunchemisch unterschiedlich, wodurch sie daher auch mit unterschiedlichen Epitopen des Antigens, gegen das sie gebildet wurden, reagieren. Monoklonale Antikörper werden von B-Zell-Klonen gebildet. Sie sind immunchemisch identisch und reagieren nur mit einem spezifischen Epitop des Antigens. Sie sind demnach spezifischer als polyklonale Antikörper.

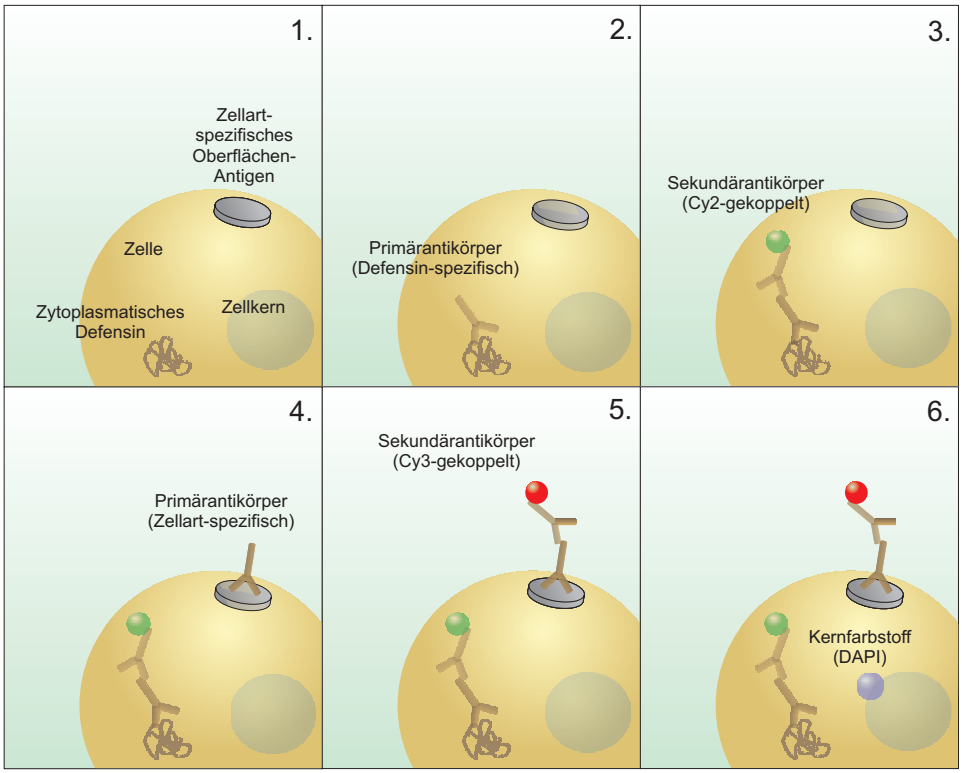

Abbildung 3.2: Übersicht zur Immunfluoreszenzfärbung. 1. Ausgangssituation. 2. Defensinmarkierung. 3. Defensinvisualisierung. 4. Zellmarkierung. 5. Zellvisualisierung. 6. Zellkernvisualisierung.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach entsprechender Gewebevorbereitung in verschiedenen Färbereihen die Defensine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 2$ mit Hilfe polyklonaler Primärantikörper (Anti-HDA5, Anti-HDA6, Anti-HBD2) zytoplasmatisch gebunden und anschließend durch den Sekundärantikörper Cy™2 (Carbocyanin) markiert. Dieser photostabile grünleuchtende Fluoreszenzfarbstoff hat ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 492$ nm sowie ein Emmissionsmaximun von $\lambda = 508$ nm.

Die primäre Markierung der ausgewählten Entzündungszellen (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Makrophagen) wurde ebenfalls in unterschiedlichen Färbereihen durch monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene realisiert (Anti-CD4, Anti-CD8, Anti-CD68). Als Sekundärantikörper wurde für diesen Schritt das photostabile Fluorochrom Cy™3 verwendet, welches bei $\lambda = 550$ nm maximal angeregt wird und mit einem Emissionmaximum von $\lambda = 570$ nm im roten Bereich des sichtbaren Spektrums fluoresziert.

Zum Abschluss wurde eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) durch-

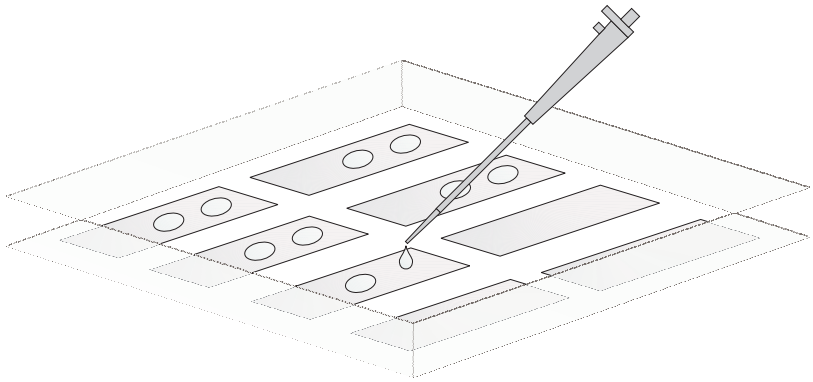

Abbildung 3.3: Schema einer feuchten Kammer zur Antikörperinkubation.

geführt. Dieser blaue Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 340$ nm und einem Emissionsmaximum von $\lambda = 488$ nm bindet direkt an zelluläre DNA, wodurch sich die Zellkerne stark anfärben und von den restlichen Zellstrukturen abheben. Die Zellkernfärbung diente einerseits als Kontrolle, dass man sich in der zu untersuchenden Lamina propria befindet. Zum Anderen konnte später durch Auszählen der Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop die Gewebedichte der einzelnen Schnitte bestimmt werden.
Das verwendete Färbeprotokoll stammt aus dem Institut für Mikrobiologie des Max-Planck-Instituts Berlin und kann im Anhang A.3 eingesehen werden.

Bei jeder Färbereihe wurde zur Kontrolle eine Negativ- und Positivkontrolle angefertigt. Für eine Positivkontrolle wird Gewebe verwendet, bei welchem nach sachgerechter vollständiger Färbung eine positive Reaktion sicher zu erwarten ist. Im vorliegenden Fall wurde hochentzündetes Ileumgewebe eines M. Crohn-Patienten mit einem pathologischen Entzündungsscore größer 2,5 (siehe Kapitel 3.2.4) verwendet. Die Negativkontrolle stammte vom gleichen Patienten, wurde jedoch vor der Sekundärantikörpermarkierung mit PBS anstelle des Primärantikörpers inkubiert.

Testung von Sensivität und Spezifität der Färbemethodik

Test	***Fc***	***ZS***	***PS***	***BSA***	***SAk***	***Tr***
1	+	+	−	−	+	−
2	+	+	−	−	−	−
3	+	−	+	−	+	−
4	+	−	+	−	−	−
5	+	+	+	−	+	−
6	+	+	+	−	−	−
7	+	−	−	+	+	−
8	+	−	−	+	−	−
9	+	+	+	−	+	+
10	+	+	+	−	−	+
11	−	−	−	−	+	−
12	−	−	−	−	−	+

Tabelle 3.6: Testfärbereihen zur Qualitätssicherung der Färbemethodik. + = Schritt durchgeführt, - = Schritt unterlassen und stattdessen mit PBS inkubiert, Fc = Fc-Rezeptor-Blocking, ZS = Blocking mit Ziegenserum, PS = Blocking mit Pferdeserum, BSA = Blocking mit Bovinem Serum-Albumin, SAk = Inkubation mit Sekundärantikörper, Tr = Trocknen gelassen.

Vor Beginn der einzelnen Immunfluoreszenz-Färbereihen wurden Testfärbungen sowie Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop (siehe 3.2.4) zur Testung der Antikörper-Sensitivität und -Spezifität durchgeführt. Da die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Ergebnisse lediglich auf Färbemethoden basieren, musste eine Sicherstellung der Methodenqualität vorangestellt werden und war oberstes Gebot für eine Weiterführung der Experimente.
Einige Testreihen wurden nach in Tabelle 3.6 angegebenem Schema durchgeführt. Verschiedene Komponenten der Färbekette wurden dafür variiert und der daraus resultierende Effekt geprüft. Hauptziel dabei war die Minimierung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz und der Entstehung von Artefakten. In weiteren Testreihen wurden die Inkubationszeiten und Temperaturbedingungen aller einzelnen Färbeschritte etabliert.

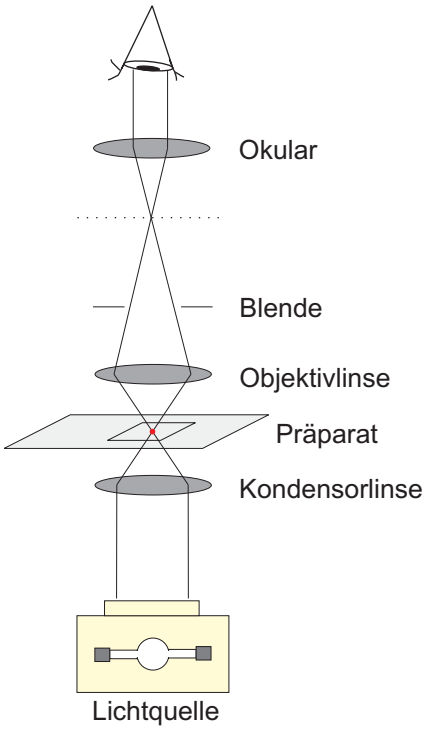

Abbildung 3.4: Strahlengang in einem Lichtmikroskop

Als indirekter Nachweis für eine gelungene α5- und α6-Defensinfärbung diente die Darstellung der Panethzellen (siehe Abbildung 4.5 c und g) unter dem Fluoreszenzmikroskop, da Panethzellen diese beiden Defensine in ihren Vesikeln speichern [13, 17].

3.2.4 Mikroskopie

Lichtmikroskopie

Lichtmikroskope eignen sich zur einfachen Zelldifferenzierung und Entzündungsgradeinteilung sowie zur Darstellung von feingeweblichen Strukturen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Sie bestehen vereinfacht aus einer Lichtquelle (meist Halogenlampen) und zwei Linsensystemen (Objektiv, Okular) und dienen dazu, Objekte vergrößert abzubilden.
Zunächst wird das Licht der Lichtquelle durch Kondensorlinsen auf das Objekt fokussiert. Das Linsensystem des Objektivs bildet dabei das Objekt in ein reales Zwischenbild ab, welches vom Linsensystem des Okulars in ein vergrößertes, virtuelles Bild umgewandelt wird (siehe Abbildung 3.4). Die aus dem Okular austretenden Strahlen werden im Auge zu einem scharfen Bild konstruiert.

Durch Auswechseln der Objektive können 2- bis 100fache Vergrößerungen erreicht werden.

Mit Hilfe der HE-gefärbten Schnitte wurde zunächst von allen Gewebeproben die Qualität des Gewebes beurteilt. Es wurde dabei auf eine einheitliche Schnittführung sowie die vollständige Intaktheit der Schleimhaut geachtet. Außerdem wurde geprüft, ob es sich bei dem Resektatstück tatsächlich um Ileumgewebe handelt, da bei der Resektion des terminalen Ileums immer auch Kolonanteile mit entfernt werden.
Des Weiteren wurden die HE-gefärbten Schnitte aller Patientengruppen anhand verschiedener morphologischer Kriterien durch Herrn Dr. Christoph Loddenkemper (Institut für Pathologie, Charité, Campus Benjamin Franklin) unter dem Lichtmikroskop untersucht und ihnen ein Punktewert zwischen Null und Vier zugeordnet. Die Punktevergabe erfolgte mit Hilfe eines histologischen Bewertungssystems nach folgendem standardisierten System [61]:

0	normales Darmgewebe ohne Anzeichen einer Entzündung
1	Ödem und leichte Entzündung der Lamina propria
2	Kryptenabszesse und mäßige Entzündung der Lamina propria
3	schwere Entzündung mit Kryptenabszessen, mögliche Granulome
4	schwerste Entzündung mit Ulzerationen und Fissuren

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine erweiterte Form der Lichtmikroskopie und findet einen wichtigen Einsatz in der Immunfluoreszenz unter Verwendung spezifischer fluoreszierender Antikörper zur Detektion von Proteinen.
Das Prinzip beruht dabei auf der Eigenschaft einiger Moleküle (sogenannter Fluorochrome), Licht einer spezifischen Wellenlänge zu absorbieren und dabei gleichzeitig Licht mit größerer Wellenlänge zu emittieren (auch als Stokessche[1] Regel bezeichnet). Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren hierbei die Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Beim Zurückfallen auf ihr Ursprungsniveau setzen sie die aufgenommene Energie in Form von Licht und Wärme wieder frei. Das dabei emittierte

[1] entdeckt und benannt nach dem Physiker Sir George Gabriel Stokes (1819-1903)

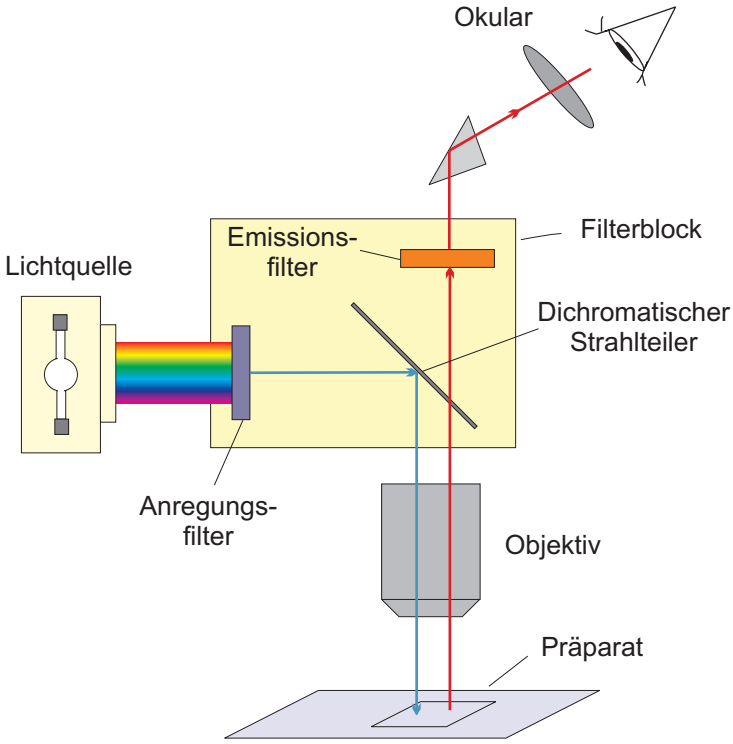

Abbildung 3.5: Prinzip eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops

Licht ist energieärmer als das Anregungslicht, was sich durch eine größere Wellenlänge und eine andere Lichtfarbe ausdrückt.

Heute gebräuchliche Standard-Fluoreszenzmikroskope arbeiten nach dem Auflichtprinzip (siehe Abbildung 3.5). Das Präparat wird hierbei von oben durch das Objektiv beleuchtet. Als Lichtquelle dienen Quecksilberdampf- oder Xenon-Lampen, die Wellenlängen zwischen 360 nm und 700 nm liefern. Mit Hilfe des Anregungsfilters wird aus dem Beleuchtungsspektrum die anregende Wellenlänge des gewählten Fluorochroms herausgefiltert und auf einen dichromatischen Teilerspiegel geleitet. Dieser reflektiert die Anregungsstrahlung auf das Präparat und ist gleichzeitig durchlässig für die längerwellige Emissionsstrahlung des angeregten Fluorochroms. Der Emissionsfilter filtert schließlich die austretende Strahlung und es entsteht das eigentliche Fluoreszenzbild, welches durch das Okular des Mikroskops betrachtet oder auf einen elektronischen Verstärker weitergeleitet werden kann. Wichtig für eine gute mikroskopische Abbildung ist die möglichst vollständige Trennung von Anregungs- und Emissionsstrahlung durch das optische System, was durch den Einsatz von Filtersätzen mit geeigneten Filterkombinationen erreicht werden kann.

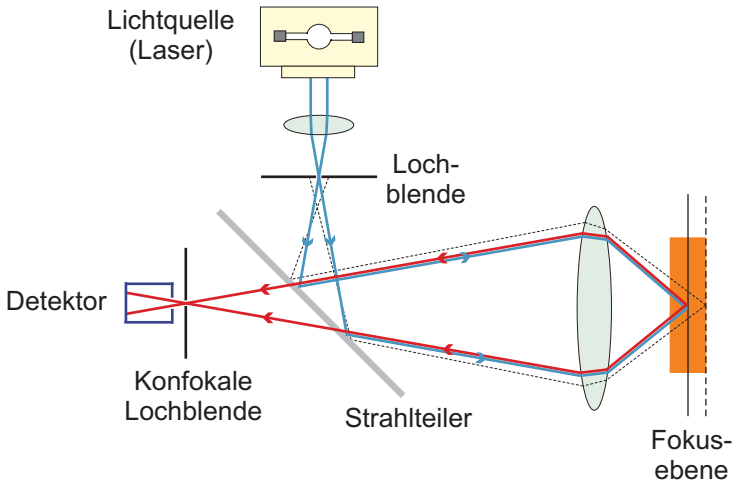

Abbildung 3.6: Prinzip eines Konfokalmikroskops

Für die fluoreszemzmikroskopische Auswertung der Färbereihen wurde ein Mikroskop vom Typ BX 60 F5 der Firma Olympus verwendet. Zunächst wurde von allen mittels Immunfluoreszenz gefärbten Gewebeschnitten der apikale Pol eingestellt. Danach wurden jeweils fünf Gesichtsfelder der Ileumschleimhaut mit drei verschiedenen Bandpassfiltern (λ = 420-480 nm für DAPI, λ = 505-550 nm für Cy™2 und $\lambda >$ 545 nm für Cy™3) abfotografiert. Die insgesamt fünfzehn pro Gewebeschnitt angefertigten Aufnahmen wurden für weitere Auswertungsschritte elektronisch archiviert.

Konfokale Lasermikroskopie

Auch die konfokale Mikroskopie geht aus der klassischen Lichtmikroskopie hervor. Es kommen dabei Lochblenden zum Einsatz, die lediglich das aus der Brennebene emittierte Licht zum Detektor passieren lassen, von außerhalb der Fokalebene stammendes Licht jedoch ausblenden können. Dies hat den Vorteil, dass innerhalb eines Präparates Abbilder einzelner Schichten erzeugt werden können.
Der Strahlengang eines Konfokalmikroskops ist in Abbildung 3.2.4 dargestellt. Nachdem das Anregungslicht in die Probe hineinfokussiert wurde, wird Licht aus demselben Fokus dann durch das gleiche Objektiv auf eine Lochblende abgebildet und von dort auf einen Detektor geleitet. Als Lichtquelle verwendet man heute meist einen Laser, da er monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt bündeln und Fluoreszenzfarbstoffe damit

spezifischer anregen kann. Es entsteht zunächst nur ein Bildpunkt (in dem Punkt gemessene Fluoreszenzintensität), der genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt. Um ein vollständiges Abbild des Objekts zu erhalten, ist eine punktuelle „Abrasterung“ (*Scanning*) des Präparates in x-, y- und z-Richtung notwendig. Die dabei gesammelten Bildpunkte müssen anschließend von einem Rechner verarbeitet werden und ermöglichen durch geeignete Software eine räumliche Darstellung des Objektes.
Die vorliegende Arbeit nutzte ein Zeiss LSM 510 META Mikroskop zur Defensin- und Immunzelldetektion, wobei lediglich planare x-y-Scans durchgeführt wurden.

3.2.5 Bildbearbeitung und Zielzellauszählung

Zunächst wurde von allen Bildern eine Rasterung in 5x4 Felder vorgenommen. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung der fluoreszierenden Zellen unter Zuhilfenahme eines handelsüblichen Handzählers. Es wurden lediglich Zellen der Lamina propria ausgezählt, angeschnittene Zellen des Epithels beziehungsweise der Tunica muscularis mucosae blieben unberücksichtigt (siehe Abbildung 3.7). Für jeden Patienten wurde von den Zellzahlen aus den entsprechenden fünf Gesichtfeldern der Mittelwert gebildet, so dass sich am Ende jeweils ein Wert für die Anzahl Defensin-positiver Zellen, ein Wert für die Anzahl an Immunzellen und ein Gesamtzellwert pro Patient ergaben. Im folgenden Schritt wurden nun die Anzahlen an Defensin-positiven Zellen und an Immunzellen auf die Gesamtzellzahl normiert. Der so ermittelte prozentuale Zellanteil diente als Basis für weitere Berechnungsschritte. Die Normierung der Zellzahlen war notwenig, um eine Vergleichbarkeit der erhalten Zählwerte zu erreichen, da alle Gewebeschnitte eine andere Zelldichte aufweisen und außerdem unterschiedlich große Bereiche angrenzender Zellschichten im Gesichtsfeld mit angeschnitten sind, welche nicht in die Zählung mit eingerechnet wurden.
Von einigen Bildern wurden mittels eines Bildbearbeitungsprogrammes Überlagerungsbilder erstellt. Dies diente der Detektion Defensin-positiver Immunzellen, das heißt Zellen, die sowohl positiv für das untersuchte Defensin als auch für das jeweilge Immunzellantigen waren. Auf den Fluoreszenzbildern stellen sich diese „überlagerten“ Zellen gelb dar.

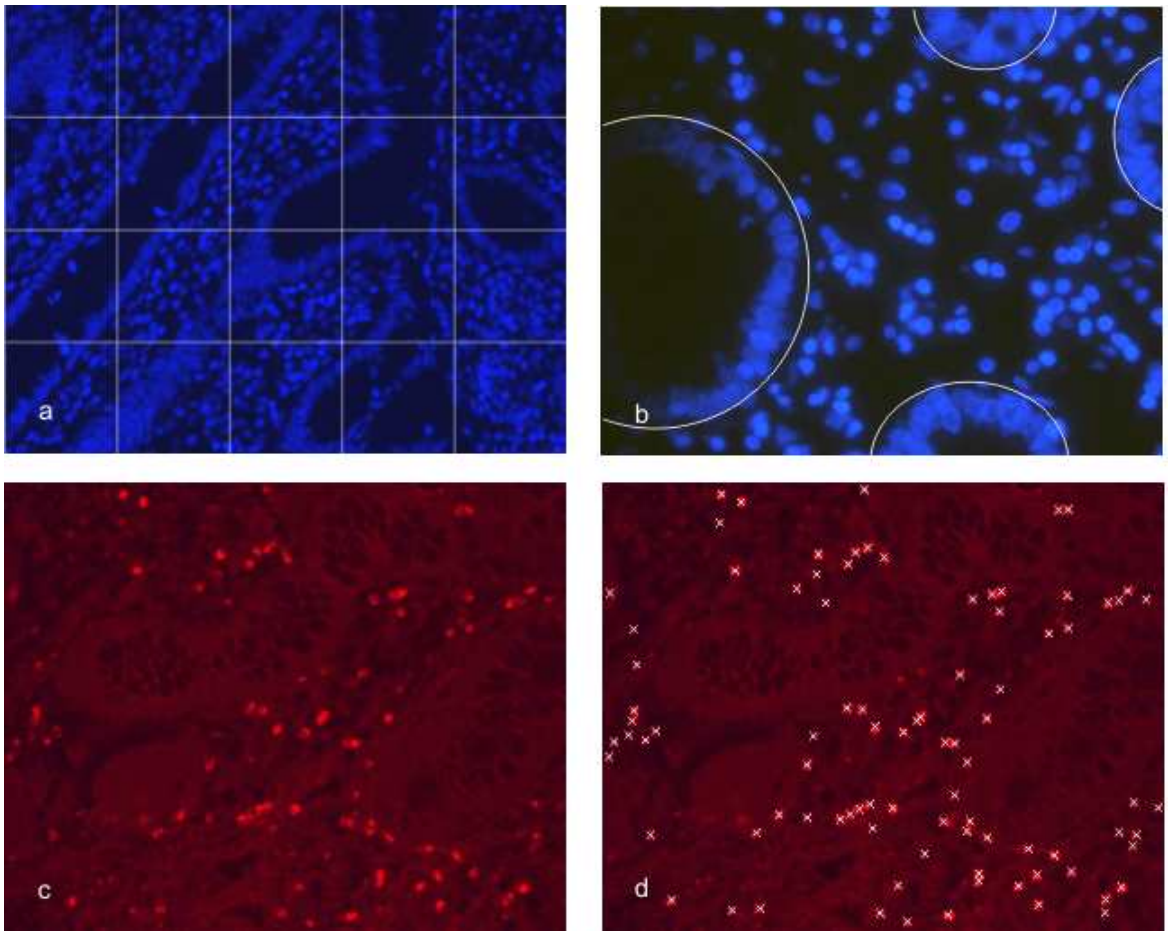

Abbildung 3.7: Zielzellauszählung. **a**] Rasterung der Bilder in 5x4 Einzelfelder. **b**] Zellen des Epithels wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt (siehe weiß abgegrenzte Bereiche). **c** und **d**] Auszählung am Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD68-positive Zellen (Makrophagen) bei einem Patienten mit M. Crohn unter Kortison-Therapie. Die auszuzählenden Zielzellen wurden mit einem weißen Kreuz markiert.

3.2.6 Erfassung der Blutparameter

Mit Hilfe der elektronischen Stationsdatenbank wurden zu den jeweiligen Patienten verschiedene Laborwerte erhoben. Da Morbus Crohn-Patienten häufig Blutbildveränderungen (Anämie, Leukozytose, Thrombozytose) aufweisen, wurde das Hauptaugenmerk auf Hämoglobin, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und die partielle Thromboplastinzeit gelegt. Die Blutentnahmen waren 10 - 24 Stunden präoperativ erfolgt. Die Blutanalysen wurden standardgemäß durch das hauseigene Labor durchgeführt.

3.2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde SPSS für Windows in der Version 11.5.1 verwendet. Alle Werte der deskriptiven Statistik wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, als prozentualer Mittelwert ± Standardabweichung ausgegeben. Für die graphische Darstellung der Lage und Verteilung einer Variable wurden Boxplots, für die Darstellung von Wertepaaren Streudiagramme gewählt. Alle statistischen Hypothesen wurden zweiseitig formuliert.
Signifikanzprüfungen auf Unterschiede von Zellmengen zwischen verschiedenen Patientenkollektiven wurden mit dem Kruskall-Wallis-Test durchgeführt. Für die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Patientengruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Diese beiden nicht-parametrischen Testverfahren, überprüfen mit Hilfe von Rangsummenbildung die Hypothese, ob zwei beziehungsweise mehrere unabhängige Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen. Eine Normalverteilung in den Gruppen ist nicht erforderlich, für die Variablen ist Ordinalskalenniveau ausreichend.
Beziehungen zwischen zwei Variablen einer Patientengruppe wurden mit Korrelationsanalysen untersucht. Der berechnete Korrelationskoeffizient stellt dabei ein Maß für die Stärke und die Richtung des untersuchten Zusammenhangs zweier Variablen dar und kann Werte zwischen -1 (negativer Zusammenhang) und +1 (positiver Zusammenhang) annehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (ρ) verwendet, da für diesen die untersuchten Stichproben nicht normalverteilt und auch hier die Variablen lediglich ordinalskaliert sein müssen.
Der Einfluss bestimmter Confounder auf die erhaltenen Zellmengen wurden mit Hilfe von Varianz- beziehungsweise Kovarianzanalysen (ANOVA, ANCOVA) untersucht.
Das Signifikanzniveau p bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der die vorher bestimmte Nullhypothese fälschlicherweise verworfen wird, obwohl sie eigentlich richtig ist (Fehler erster Art oder α-Fehler). Es wird daher häufig auch als Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet. In dieser Arbeit wurden p-Werte $<$ 0,05 ($\widehat{=}$ 5%) als signifikant und p-Werte $<$ 0,01 ($\widehat{=}$ 1%) als hoch signifikant angenommen [62].

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Verteilungsmuster Defensin-positiver Zellen in der Lamina propria des Ileums bei Morbus Crohn-Patienten unter verschiedenen medikamentösen Therapieschemata untersucht und mit akut entzündetem Appendixgewebe als Positivkontrolle sowie gesundem Ileumgewebe als Negativkontrolle verglichen werden. P-Werte $< 0{,}05$ wurden als signifikant, p-Werte $< 0{,}01$ als hoch signifikant angenommen.

4.1 Histologischer Entzündungsgrad

Zunächst wurde von allen verwendeten Gewebeschnitten anhand der HE-Färbungen der Entzündungsgrad bestimmt (Beispielbilder siehe Abbildung 4.2, Methodik siehe 3.2.4). Dabei entsprach ein Wert von 0 keiner Entzündung und ein Wert von 4 der schwersten Entzündungsstufe.
Die Verteilung der Entzündungsstufen innerhalb der einzelnen Patientengruppen zeigen Tabelle 4.1 sowie Abbildung 4.1.

	0	**0 - 1**	**1**	**1 - 2**	**2**	**2 - 3**	**3**	**3 - 4**	**4**	**z**
MC - M	0	0	1	1	5	0	2	1	0	2
MC - P	0	0	1	1	5	0	1	1	0	2
MC - P+A	0	0	2	2	3	0	2	0	0	2
App	0	0	5	1	1	1	1	0	0	1
Ko	5	0	3	1	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4.1: Verteilung der Entzündungsstufen über die Gruppen (MC = Morbus Crohn, M = Mesalazin, P = Prednisolon, P+A = Prednisolon und Azathioprin in Kombination, App = Appendizitis, Ko = Kontrolle, z = Median).

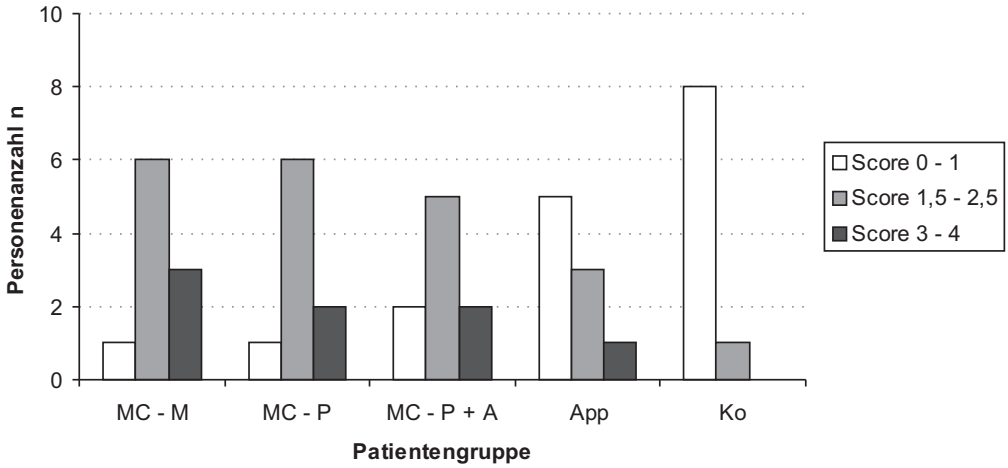

Abbildung 4.1: Verteilung der Entzündungsstufen über die Gruppen.

Die Kontrollgruppe enthielt fast ausschließlich unentzündetes Gewebe beziehungsweise Gewebe mit einer geringen Entzündungreaktion. Nur ein Patient wies eine leichte bis mäßige Entzündung (Grad = 1 - 2) auf. Die anderen Patientengruppen verhielten sich im Vergleich dazu deutlich heterogener, das heißt es kamen Darmgewebe aller Entzündungsstufen vor, wobei insgesamt Gewebe mit mäßiger Entzündung (Grad = 2) überwogen. Es fiel dabei auf, dass bei den Patienten mit einer klinisch nachgewiesenen Darmentzündung insbesondere die Appendizitis-Patienten eine verhältnismäßig geringe Entzündungsaktivität zeigten. Allein fünf von den neun Patienten wiesen in ihren Appendixresektaten einen Entzündungsgrad von Eins auf, was lediglich einer leichten Entzündung entspricht. Alle Patientengruppen mit einer Darmentzündung (Morbus Crohn und Appendizitis) unterschieden sich hinsichtlich ihrer mittleren Entzündungsaktivität signifikant von der Gruppe der Kontrollpatienten (für alle Gruppen $p < 0{,}01$). Zwischen den vier Entzündungsgruppen zeigte der gemittelte histologische Entzündungsgrad jedoch keine signifikanten Unterschiede, auch wenn die Gewebeschnitte im Einzelnen deutlich unterschiedlich entzündet waren.

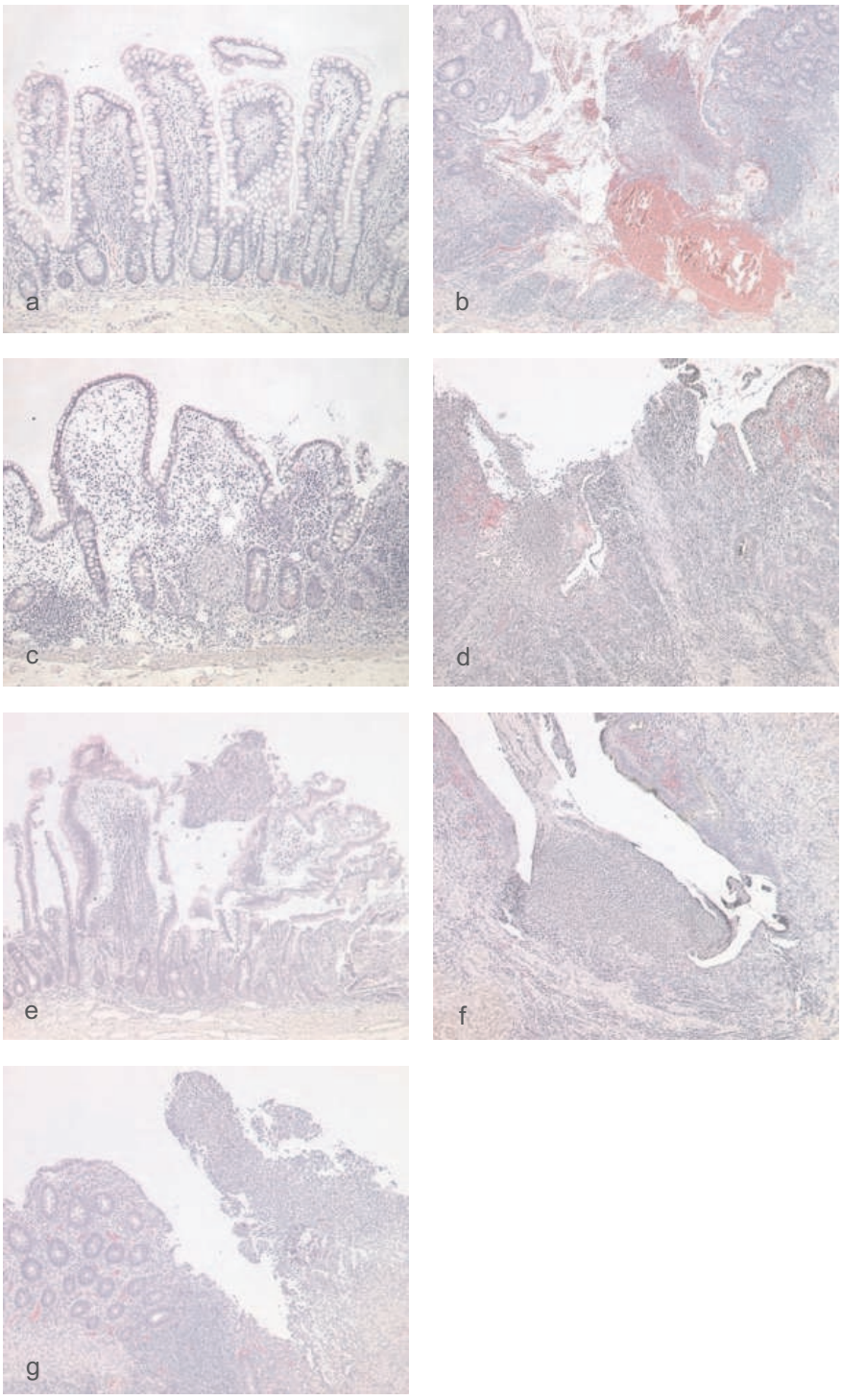

Abbildung 4.2: HE-Färbung, Lichtmikroskopie, 20fache Vergrößerung, HEG = histologischer Entzündungsgrad. **a**] gesunde Kontrolle, HEG 0, **b**] MC (Prednisolon + AZA), HEG 3 mit Erosion, **c**] MC (Prednisolon), HEG 1 mit Schleimhautödem und Granulozyteneinwanderung, **d**] MC (Prednisolon), HEG 3-4 mit Erosion und fissuraler Entzündung, **e**] MC (Prednisolon + AZA), HEG 1, **f**] MC (Mesalazin), HEG 3 mit Erosion, **g**] akute Appendizitis, HEG 4 mit Granulozyten-Fibrin-Schorf.

	n	**CD4+**	**CD8+**	**CD68+**
MC - M	10	8,47 ± 5,08	7,01 ± 3,34	9,17 ± 2,92
MC - P	9	9,67 ± 4,40	7,66 ± 4,52	8,20 ± 2,22
MC - P+A	9	6,34 ± 3,67	7,10 ± 4,05	8,54 ± 4,07
App	9	6,42 ± 2,39	6,49 ± 3,09	6,88 ± 3,72
Ko	9	4,22 ± 2,10	2,53 ± 1,70	3,50 ± 1,61

Tabelle 4.2: Menge der Immunzellen im subepithelialen Ileum in Prozent (angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung).

4.2 Immunzellen im subepithelialen Ileum

Als weiteres Kriterium für die Entzündungsaktivität wurde die Menge bestimmter Immunzellen in der subepithelialen Ileumschleimhaut untersucht. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurden zellspezifische Oberflächenantigene markiert, wobei CD4 als Marker für T-Helferzellen, CD8 als Marker für zytotoxische T-Zellen und CD68 als Marker für Makrophagen diente. Die Anzahl der Immunzellen sowie der gesamten Zellen in der Lamina propria aus fünf Gesichtsfeldern wurde manuell bestimmt und daraus anschließend die relative Immunzellmenge berechnet (Quotient aus Immunzellmenge und Gesamtzellmenge).
Tabelle 4.2 sowie Abbildung 4.3 ist zu entnehmen, dass bei den Patienten mit einer Darmentzündung die Menge CD4-, CD8- sowie CD68-positiver Zellen im subepithelialen Ileum jeweils zwischen 6 und 10 % lag, wobei die Menge an CD8-positiven Zellen jeweils am geringsten war. Im Vergleich dazu war die Menge an Immunzellen bei den gesunden Kontrollpatienten insgesamt kleiner. Hier fanden sich zwischen 2,5 und 4,5 %.

Die Menge an Immunzellen als ein Maß für die Entzündungsaktivität korrelierte hoch positiv (für alle Gruppen $p < 0{,}01$) mit dem histologischen Entzündungsgrad (siehe Tabelle 4.3 und Abbildung 4.3), das heißt je höher die zugewiesene histologische Entzündungsstufe, desto größer war auch die Menge an Immunzellen. Auch korrelierten die Immunzellen untereinander hoch signifikant (jeweils $p < 0{,}01$, siehe Tabelle 4.6). Fand sich also in einem Gewebe eine hohe Menge an CD4-positiven Zellen, so war im Mittel auch die Menge an CD8- und CD68-positiven Zellen erhöht und umgekehrt.

	CD4+	**CD8+**	**CD68+**
Rho	0,503	0,438	0,535
p	<0,001	0,002	<0,001

	CD4+	**CD8+**	**CD68+**
Z	-2,617	-3,475	-3,614
p	0,009	0,001	<0,001

Tabelle 4.3: Links: Korrelation zwischen Immunzellen und histologischem Entzündungsgrad, rechts: Mann-Whitney-U-Test Darmentzündung versus Kontrolle (Rho = Korrelationskoeffizient nach Spearman, p = Irrtumswahrscheinlichkeit).

Alle Patientengruppen mit einer Darmentzündung zusammengefasst unterschieden sich bezüglich der Immunzellmenge hoch signifikant ($p < 0{,}01$; Tabelle 4.3) von der Kontrollgruppe. Im Einzelgruppenvergleich dagegen zeigte sich zwischen M. Crohn-Patienten unter Kombinationstherapie und Kontrollpatienten keine Signifikanz für CD4+ sowie zwischen Appendizitis- und Kontrollpatienten keine Signifikanz für CD4+ und CD68+. Alle anderen Vergleiche zur Kontrollgruppe erreichten mindestens ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.
Beim Vergleich der Gruppen mit einer Darmentzündung untereinander ergaben sich weder zwischen M. Crohn- und Appendizitispatienten noch zwischen den verschiedenen Morbus Crohn-Subgruppen signifikante Unterschiede.

4.3 Defensin-positive Zellen im subepithelialen Ileum

Mit Hilfe immunologischer Färbemethoden (POD-Färbung, Immunfluoreszenzfärbung) wurde zunächst sichergestellt, dass in den subepithelialen Schleimhautschichten des Ileums überhaupt Defensin-positive Zellen vorhanden sind. Abbildung 4.4 zeigt Bilder der POD-Färbung, Abbildung 4.5 Bilder der Immunfluoreszenzfärbung.
Man erkennt darauf, dass sich einzelne Zellen farblich darstellen lassen und somit Defensin-positiv sind. In der Kontrollgruppe, deren Entzündungsgrad im Mittel niedriger war als bei den Patientengruppen mit akuter oder chronischer Darmentzündung, waren auch die Immunfärbungen deutlich schwächer ausgeprägt. Eine positive Reaktion für $\alpha 5$ und $\alpha 6$ ergab sich hier lediglich bei den Panethzellen (siehe Pfeil-Markierung in Abbildung 4.4) sowie für $\beta 2$ im Epithel.

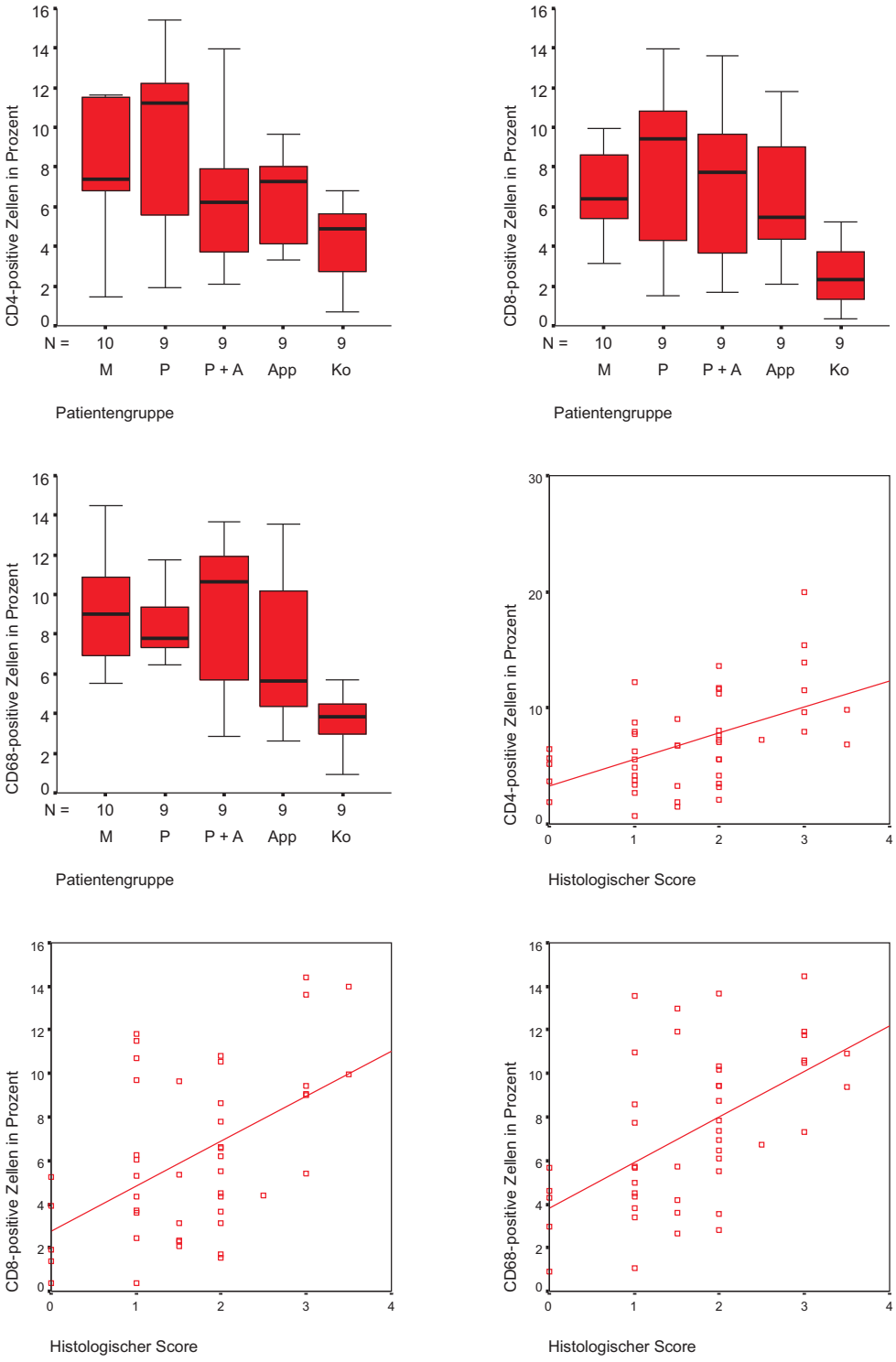

Abbildung 4.3: Boxplots zur Menge der Immunzellen; Streudiagramme mit linearer Regressionsgerade für die Mengen CD4-, CD8- und CD68-positiver Zellen in Abhängigkeit vom histologischen Entzündungsgrad.

Nach Auszählung der Defensin-positiven Zellen pro Gesichtsfeld und Normierung auf die Gesamtzellzahl konnten folgende Mengenverteilungen evaluiert werden:

	n	**α5+**	**α6+**	**β2+**
MC - M	10	5,43 ± 2,38	4,34 ± 2,00	2,75 ± 1,85
MC - P	9	5,20 ± 2,34	4,63 ± 1,88	6,05 ± 2,68
MC - P+A	9	4,77 ± 1,84	4,46 ± 1,72	3,17 ± 1,85
App	9	5,83 ± 2,37	3,81 ± 2,55	3,85 ± 2,91
Ko	9	2,88 ± 1,81	0,68 ± 0,40	0,63 ± 0,39

Tabelle 4.4: Menge der Defensin-positiven Zellen im subepithelialen Ileum in Prozent (angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung).

Innerhalb der Patientengruppen mit einer Darmentzündung waren zwischen 4,8 und 5,8 % aller Zellen in der Lamina propria Defensin-positiv für α5, zwischen 3,8 und 4,6 % positiv für α6 sowie zwischen 2,7 und 6 % positiv für β2. Im Hinblick auf β2 fiel auf, dass Morbus Crohn-Patienten unter Kortison-Therapie eine doppelt so hohe Menge an Defensin-positiven Zellen aufwiesen wie Mesalazin-therapierte Patienten oder solche mit einer Kombinationstherapie aus Kortison und Azathioprin. Auch im Vergleich zur Gruppe der Appendizitispatienten war die β2-Menge bei den Morbus Crohn-Patienten unter Kortison-Therapie etwa um die Hälfte höher.
Demgegenüber verfügte die Kontrollgruppe über eine deutlich geringere Menge an Defensin-positiven Zellen. Diese lag zwischen 0,6 und 2,9 %, wobei α5-positive Zellen mehr als viermal häufiger auftraten als α6- oder β2-positive.

Mit Hilfe von Varianzanalysen wurde in weiteren Schritten geprüft, ob das Patientenalter, die Erkrankungsdauer sowie das Geschlecht als mögliche Confounder einen Einfluss auf die erhaltenen Mengenverteilungen der Defensin-positiven Zellen und der Immunzellen haben. Es konnten jedoch keine nennenswerten Zusammenhänge festgestellt werden (für alle Zellmengen $p > 0,05$).

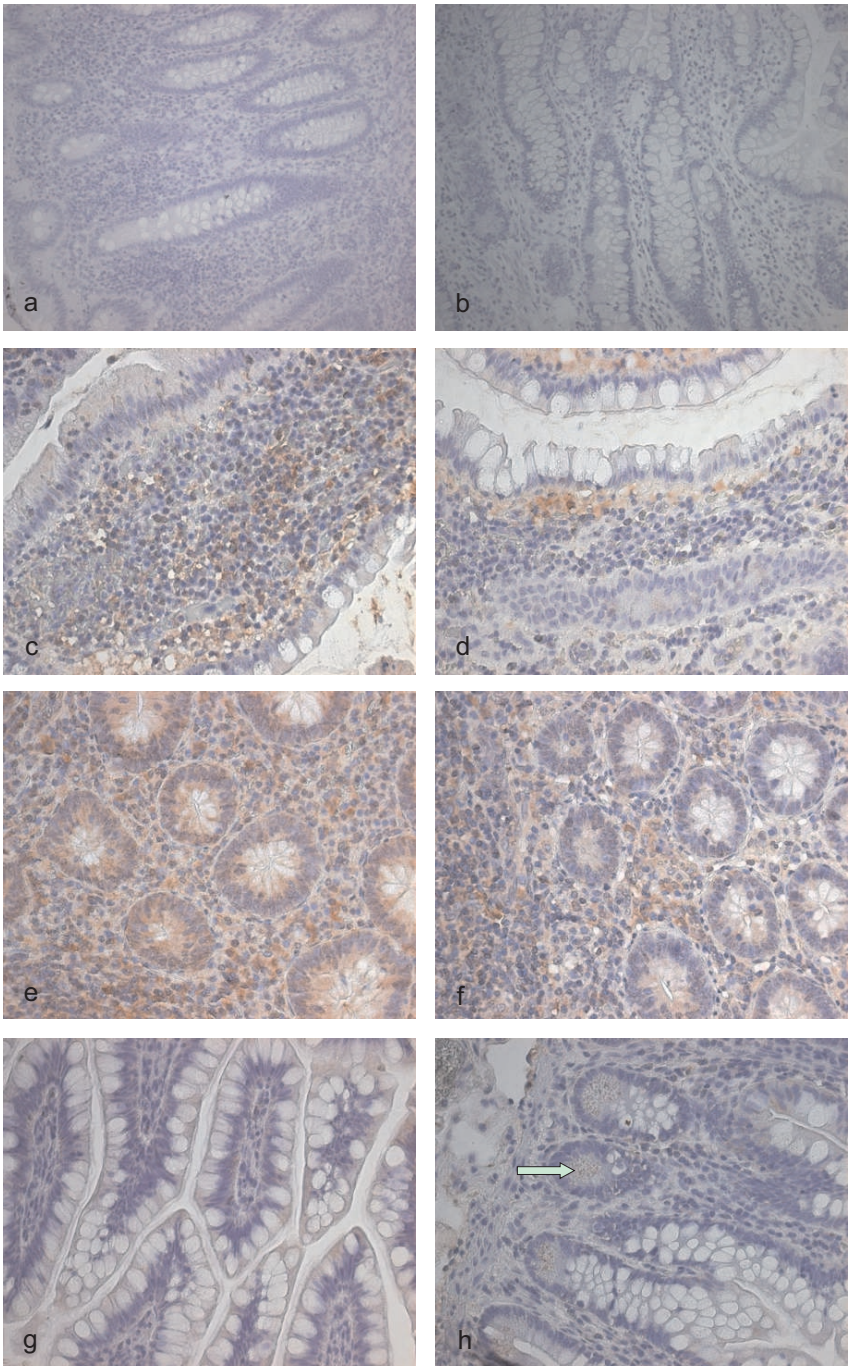

Abbildung 4.4: POD-Färbung mit Anti-Defensin als Primärantikörper, Lichtmikroskopie, 20fache Vergrößerung. Eine Antigen-Antikörper-Bindung stellt sich nach Peroxidase-Reaktion braun dar. Der Pfeil markiert die in den Krypten liegenden Panethzellen. **a**] Negativkontrolle bei akuter Appendizitis, **b**] Negativkontrolle bei MC (Prednisolon + AZA), **c**] α5 bei MC (Prednisolon), **d**] α6 bei MC (Prednisolon), **e**] α5 bei akuter Appendizitis, **f**] α6 bei akuter Appendizitis, **g**] α5 bei Kontrolle, **h**] α6 bei Kontrolle.

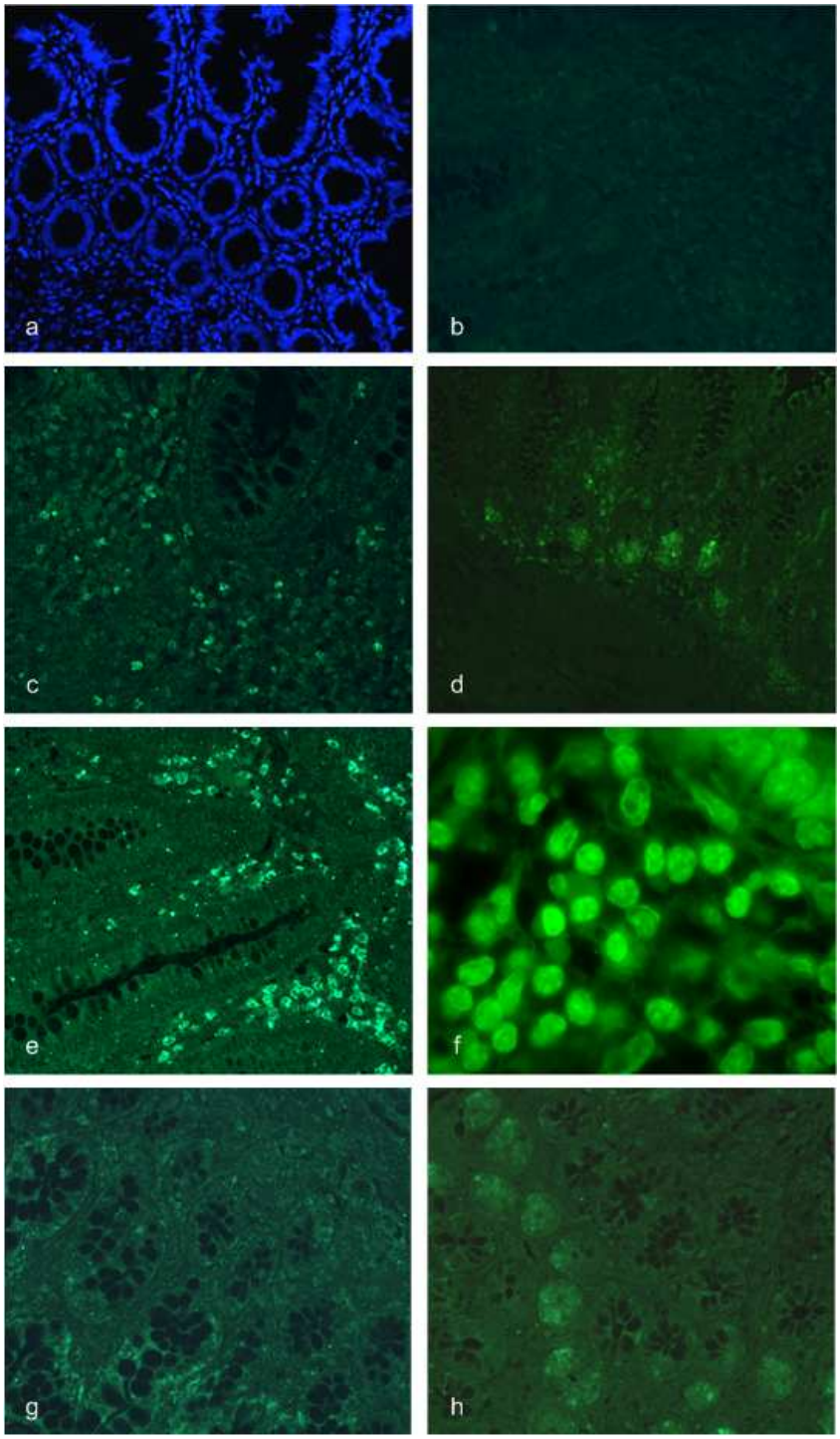

Abbildung 4.5: Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Defensin als Primärantikörper und Cy2 als Sekundärantikörper, Fluoreszenzmikroskopie, 20fache Vergrößerung. Eine Antigen-Antikörper-Bindung fluoresziert grün. **a**] Zellkernfärbung mit DAPI, **b**] Negativkontrolle bei MC (Prednisolon), **c**] $\beta 2$ bei MC (Mesalazin), **d**] $\alpha 6$ bei MC (Prednisolon), **e**] $\beta 2$ bei akuter Appendizitis, **f**] $\alpha 6$ bei akuter Appendizitis (100x), **g**] $\beta 2$ bei Kontrolle, **h**] $\alpha 6$ bei Kontrolle.

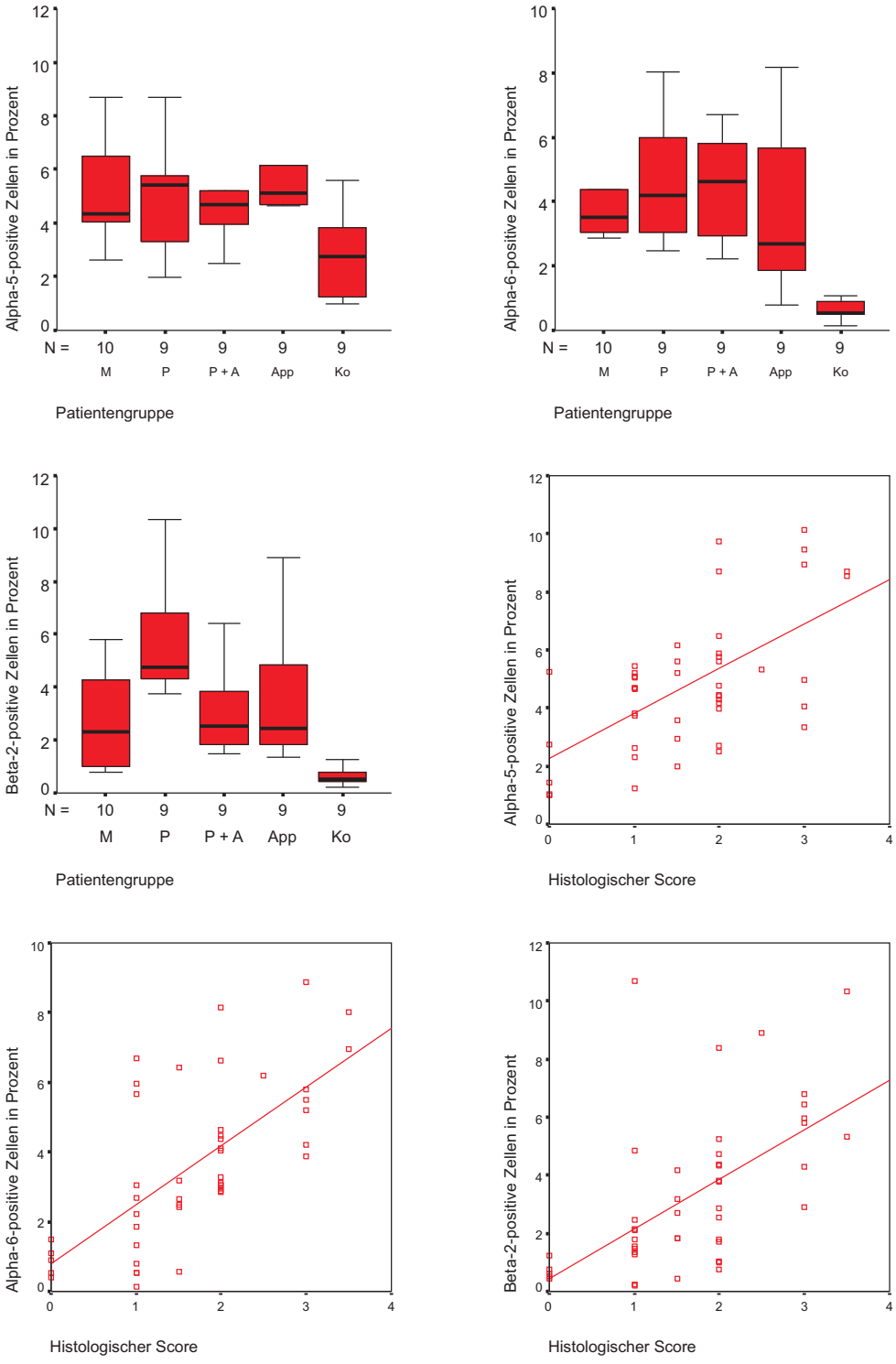

Abbildung 4.6: Boxplots zur Menge Defensin-positiver Zellen; Streudiagramme mit linearer Regressionsgerade für α5-, α6- und β2-positive Zellen in Abhängigkeit vom histologischen Entzündungsgrad.

4.4 Unterschiede im Verteilungsmuster Defensin-positiver Zellen

In den folgenden Schritten wurden nun statistische Untersuchungen zur Menge der Defensin-positiven Zellen im subepithelialen Ileum zwischen den verschiedenen Patientengruppen durchgeführt.

4.4.1 Vergleich zwischen entzündetem und nicht entzündetem Darmgewebe

Zunächst wurde geprüft, ob es signifikante Unterschiede der Menge an Defensin-positiven Zellen im Ileum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Entzündung gibt. Als Unterscheidungskriterium zwischen „entzündetem“ und „nicht entzündetem“ Darmgewebe wurde der histologische Entzündungsgrad herangezogen (siehe Kapitel 4.1).

	α**5**+	α**6**+	β**2**+
Rho	0,512	0,681	0,653
p	<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle 4.5: Korrelation zwischen Defensin-positiven Zellen und histologischem Entzündungsgrad (Rho = Korrelationskoeffizient nach Spearman, p = Irrtumswahrscheinlichkeit).

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, dass die Menge der Defensin-positiven Zellen in der Lamina propria mit dem Grad der Entzündung des jeweiligen Gewebes stark positiv korrelierte, das heißt ein erhöhter Entzündungsgrad anhand des zugewiesenen Punktewertes ging mit einer erhöhten Menge an Defensin-positiven Zellen einher. Geringer entzündetes Gewebe wies demzufolge eine geringere Defensinzellmenge auf. In Abbildung 4.6 sind die Zusammenhänge in Form von Streudiagrammen graphisch dargestellt.

Es erfolgte weiterhin die Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Defensin-positiven Zellen und den untersuchten Immunzellen untereinander. Auch hier zeigten sich hoch signifikante Korrelationen (siehe Tabelle 4.6).

		α5+	**α6+**	**β2+**	**CD4+**	**CD8+**	**CD68+**
α5+	Rho	-	0,536	0,442	0,535	0,500	0,418
	p		<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,004
α6+	Rho	0,536	-	0,801	0,633	0,645	0,747
	p	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
β2+	Rho	0,442	0,801	-	0,605	0,585	0,639
	p	0,002	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001
CD4+	Rho	0,535	0,633	0,605	-	0,733	0,628
	p	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
CD8+	Rho	0,500	0,645	0,585	0,733	-	0,752
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
CD68+	Rho	0,418	0,747	0,639	0,628	0,752	-
	p	0,004	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tabelle 4.6: Korrelationen zwischen den untersuchten Zellen untereinander (n = 46, Rho = Korrelationskoeffizient nach Spearman, p = Irrtumswahrscheinlichkeit).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass je höher die Menge Defensin-positiver Zellen in der Lamina propria war, sich auch umso mehr Immunzellen in dieser Gewebeschicht fanden. Das heißt, je mehr CD4-positive Zellen vorhanden waren, umso mehr CD8- und CD68-positive waren nachweisbar und je mehr Zellen α5-positiv waren, umso mehr α6- und β2-positive konnten detektiert werden.

Im folgenden Schritt wurde ermittelt, ob sich die Kontrollgruppe, in der sich definitionsgemäß Patienten mit gesundem Darmgewebe befanden, bezüglich der Menge Defensin-positiver Zellen in der Lamina propria von den Patientengruppen mit einer Darmentzündung (Morbus Crohn und Appendizitis) unterschied. Den Boxplots in Abbildung 4.6 ist bereits zu entnehmen, dass die Kontrollgruppe für alle untersuchten Defensine die geringste Menge an positiven Zellen aufwies.
Für die Prüfung dieses Zusammenhangs auf Signifikanz wurden zunächst alle Patienten mit einer Darmentzündung zu einer Gruppe zusammengefasst, unabhängig davon, ob eine akute oder eine chronische Darmerkrankung vorlag. Es stellte sich heraus, dass die Menge an α5-, α6- und β2-positiven Zellen bei Patienten der Kontrollgruppe hoch signifikant ($p < 0,01$)

niedriger war als bei Patienten mit einer Darmentzündung (siehe Tabelle 4.7).
Auch die Aufsplittung der Patienten mit einer Darmentzündung in die vorab vorhandenen Untergruppen (Morbus Crohn-Patienten unter Mesalazin-Therapie, Kortison-Therapie und Kortison-Kombinationstherapie mit Azathioprin sowie Appendizitispatienten) ergab eine jeweilige hoch signifikante ($p < 0,01$) Unterscheidung von der Kontrollgruppe bezüglich der Mengen Defensin-positiver Zellen.

4.4.2 Vergleich zwischen akuter und chronischer Darmentzündung

Es folgte nun die Prüfung auf Unterscheidung der Mengen Defensin-positiver Zellen zwischen akuter (Appendizitis) und chronischer (Morbus Crohn) Darmentzündung. Auch hier wurden zunächst die Patienten mit Morbus Crohn unabhängig von ihrer erhaltenen medikamentösen Therapie zu einer Gruppe zusammengefasst (Tabelle 4.7).
Alle p-Werte lagen oberhalb der Grenze von 0,05, was somit keine Differenzierung zwischen den beiden Stichproben zuließ. Auch im Subgruppenvergleich, das heißt bei Betrachtung der einzelnen Morbus Crohn-Patientengruppen im Vergleich zur Gruppe der Appendizitispatienten, wurden keine signifikanten p-Werte erreicht.

	α5+	**α6+**	**β2+**
Z	-2,672	-4,500	-4,431
p	0,008	$<$ 0,001	$<$ 0,001

	α5+	**α6+**	**β2+**
Z	-0,956	-1,204	-0,248
p	0,339	0,229	0,804

Tabelle 4.7: Links: Mann-Whitney-U-Test Darmentzündung versus Kontrolle, rechts: Mann-Whitney-U-Test akute versus chronische Darmentzündung (p = Irrtumswahrscheinlichkeit).

4.4.3 Vergleich von Morbus Crohn-Patienten unter verschiedenen medikamentösen Therapien

Bei Betrachtung der drei Morbus Crohn-Therapiegruppen untereinander ist schon anhand der Boxplots (Abbildung 4.6) ersichtlich, dass die Mittelwerte der Mengen Defensin-positiver Zellen ähnlich sind. Der Mann-Whitney-U-Test bestätigte, dass bis auf β2-Defensin keine signifikanten Gruppenunterschiede zu ermitteln waren, demzufolge alle p-Werte deutlich

über der Grenze von 0,05 lagen. Lediglich für β2-Defensin zeigte sich eine signifikant höhere Menge positiver Zellen bei Patienten unter Prednisolon-Therapie im Vergleich zu Mesalazin-therapierten Patienten (Z = -2,531, p = 0,011) sowie solchen mit einer Kombinationstherapie aus Prednisolon und Azathioprin (Z = -2,428, p = 0,015).

4.5 Defensin-positive Immunzellen

Korrelative Zusammenhänge zwischen den Mengen Defensin-positiver Zellen mit den Immunzellen wurden bereits in Kapitel 4.4.1 besprochen. Bei Betrachtung der Ergebnisse entsteht dabei die interessante Frage, ob es sich bei Defensin-positiven Zellen und Immunzellen in der Lamina propria um verschiedene Zellspezies handelt oder ob sich die jeweils untersuchten Immunzellen (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Makrophagen) selbst Defensin-positiv darstellen. Da alle Färbungen in Doppelimmunfluoreszenztechnik angefertigt wurden, konnten mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms am Rechner Überlagerungsbilder von allen einzelnen Ausschnittsaufnahmen der Defensin-positiven Zellen (grün) mit den entsprechenden Ausschnittsaufnahmen der jeweiligen Immunzellen (rot) erstellt werden. Zellen, die in Defensin- und in Immunzellfärbung positiv sind, stellen sich auf den Bildern gelb bis orange dar.

Abbildung 4.7 zeigt Beispiele von erstellten Überlagerungsbildern. Es ist ersichtlich, dass durchaus Defensin-positive Immunzellen in der Lamina propria vorkommen. Eine positive Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigte sich für alle drei untersuchten Immunzellspezies (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Makrophagen), und zwar jeweils für α5, α6 und β2. Prozentuale Mengen beziehungsweise gar Mengenunterschiede zwischen den Gruppen wurden aufgrund der geringen Fallzahlen und der sensiblen Methodik nicht bestimmt.

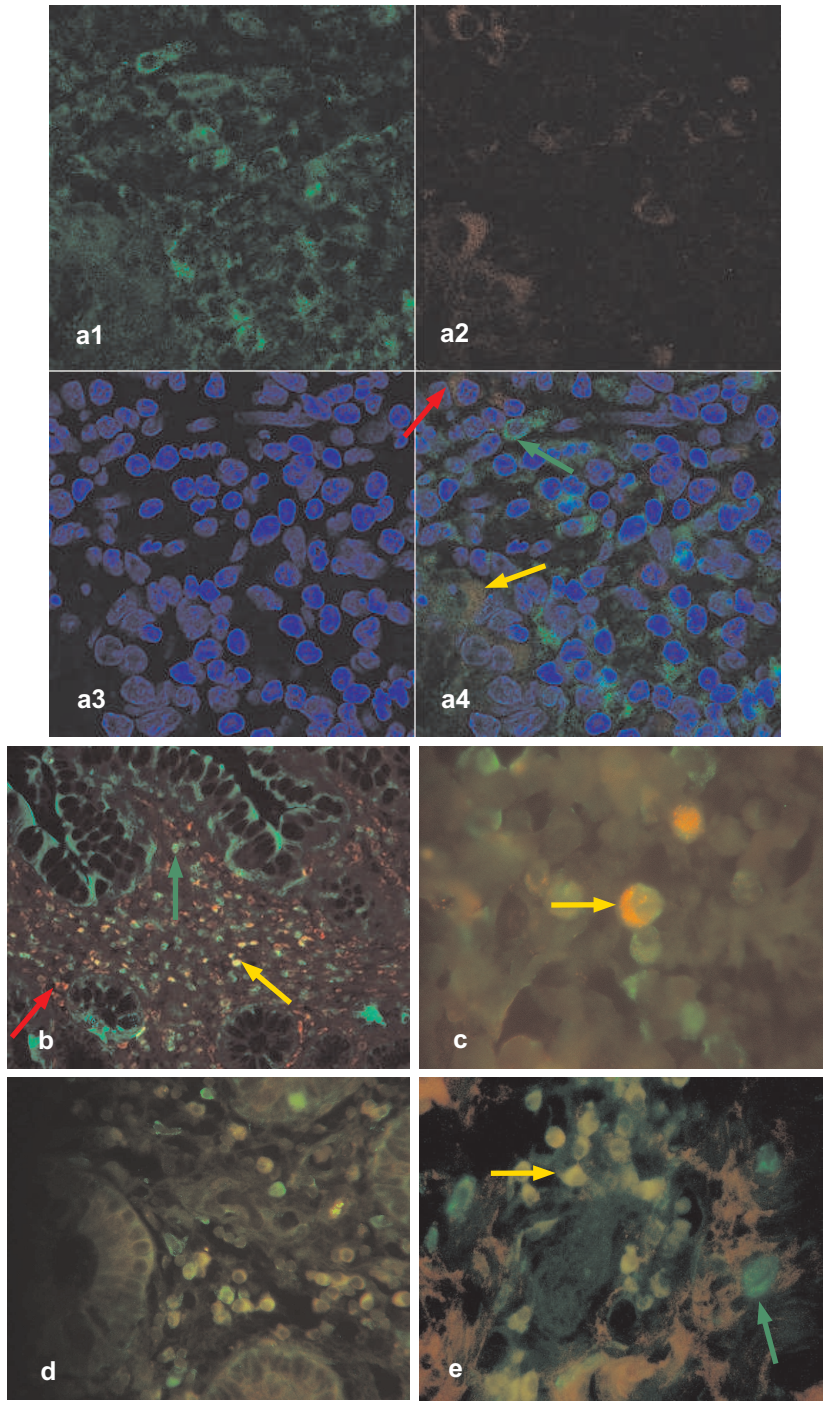

Abbildung 4.7: Beispiele für Überlagerungsbilder, Immunfluoreszenzfärbung, a1-4 konfokale Lasermikroskopie, b-e Fluoreszenzmikroskopie. grün = Defensin-positive Zelle, rot = Immunzelle, gelb/orange = Defensin-positive Immunzelle, blau = Zellkern. **a1-a4**] β2 und CD4 bei MC (Prednisolon), 100x. 1) Defensinfärbung, 2) Immunzellfärbung, 3) Zellkernfärbung, 4) Überlagerung aller drei Färbungen, **b**] α6 und CD68 bei MC (Prednisolon), 20x, **c**] α5 und CD8 bei MC (Prednisolon), 100x, **d**] α5 und CD4 bei MC (Prednisolon), 40x, **e**] α6 und CD8 bei MC (AZA), 40x.

4.6 Zusammenhänge der untersuchten Zellen im Ileum mit verschiedenen Blutwerten

Als letzter Schritt wurde untersucht, ob es korrelative Zusammenhänge zwischen der Menge Defensin-positiver Zellen beziehungsweise Immunzellen im Ileum und verschiedenen Blutwerten gibt. Das Augenmerk wurde hierbei auf Hämoglobin, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit gelegt. Die venösen Blutentnahmen waren maximal 24 Stunden vor der jeweiligen Operation erfolgt. Die gemittelten Werte sind aus Tabelle 4.8 ersichtlich sowie in Abbildung 4.8 graphisch dargestellt.

	Hb (m) [14 - 18]	**Hb (w)** [12 - 16]	**Leukos** [4 - 10]	**Thrombos** [150 - 400]	**apTT** [26 - 40]
MC - M	13,57 ± 1,66	11,85 ± 3,22	9,64 ± 3,50	408,50 ± 205,93	35,79 ± 6,49
MC - P	13,70 ± 1,85	12,50 ± 1,19	15,14 ± 5,01	370,22 ± 131,69	33,70 ± 4,06
MC - A+P	11,60 ± 2,51	11,16 ± 3,33	8,63 ± 3,53	397,22 ± 74,72	33,31 ± 5,05
App	14,50 ± 1,22	12,73 ± 0,84	10,07 ± 3,72	243,22 ± 44,21	34,89 ± 2,86
Ko	12,20 ± 2,12	12,58 ± 1,82	6,90 ± 1,27	373,78 ± 130,69	33,20 ± 2,97

Tabelle 4.8: Präoperative Blutwerte: Hämoglobin in g/dl, Leukozytenzahl in n/nl, Thrombozytenzahl in n/nl, aktivierte partielle Thromboplastinzeit in s (angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, Referenzbereiche in eckigen Klammern).

Es ist zu erkennen, dass die Leukozyten bei den M. Crohn-Patienten unter Prednisolon-Therapie präoperativ im Mittel deutlich erhöht waren. Die Hämoglobin-Werte[1] bei den M. Crohn- sowie den Darmtumorpatienten (Kontrolle) bewegten sich am unteren Grenzwert, was durch Schleimhautblutungen zu erklären ist.

Über alle Gruppen hinweg korrelierte lediglich die Leukozytenzahl im Blut positiv mit dem histologischen Entzündungsscore sowie der Mengen CD4-, CD8- und CD68-positiver Zellen in der Lamina propria des Ileums. Daneben zeigten sich auch hoch positive Korrelationen mit den Mengen α5-, α6- und β2-positiver Zellen. Die Zusammenhänge veranschaulicht

[1] Hier erfolgte nochmals eine Auftrennung nach Geschlecht, da unterschiedliche Referenzbereiche für weibliche und männliche Patienten existieren.

Abbildung 4.9.

Für Hämoglobin, die Thrombozytenzahl und die partielle Thromboplastinzeit lagen bei der Überprüfung auf Zusammenhänge mit den untersuchten Zellen im subepithelialen Ileum alle p-Werte oberhalb der Grenze von 0,05.

	HEG	**α5+**	**α6+**	**β2+**	**CD4+**	**CD8+**	**CD68+**
Rho	0,524	0,401	0,514	0,509	0,352	0,301	0,392
p	<0,001	0,006	<0,001	<0,001	0,017	0,042	<0,007

Tabelle 4.9: Korrelation zwischen Blutleukozyten und histologischem Entzündungsgrad [HEG], Defensin-positiven Zellen und Immunzellen (Rho = Korrelationskoeffizient nach Spearman, p = Irrtumswahrscheinlichkeit).

Eine Aufsplittung in die Subgruppen erschien anhand der Fragestellung und der Stichprobengrößen nicht sinnvoll.

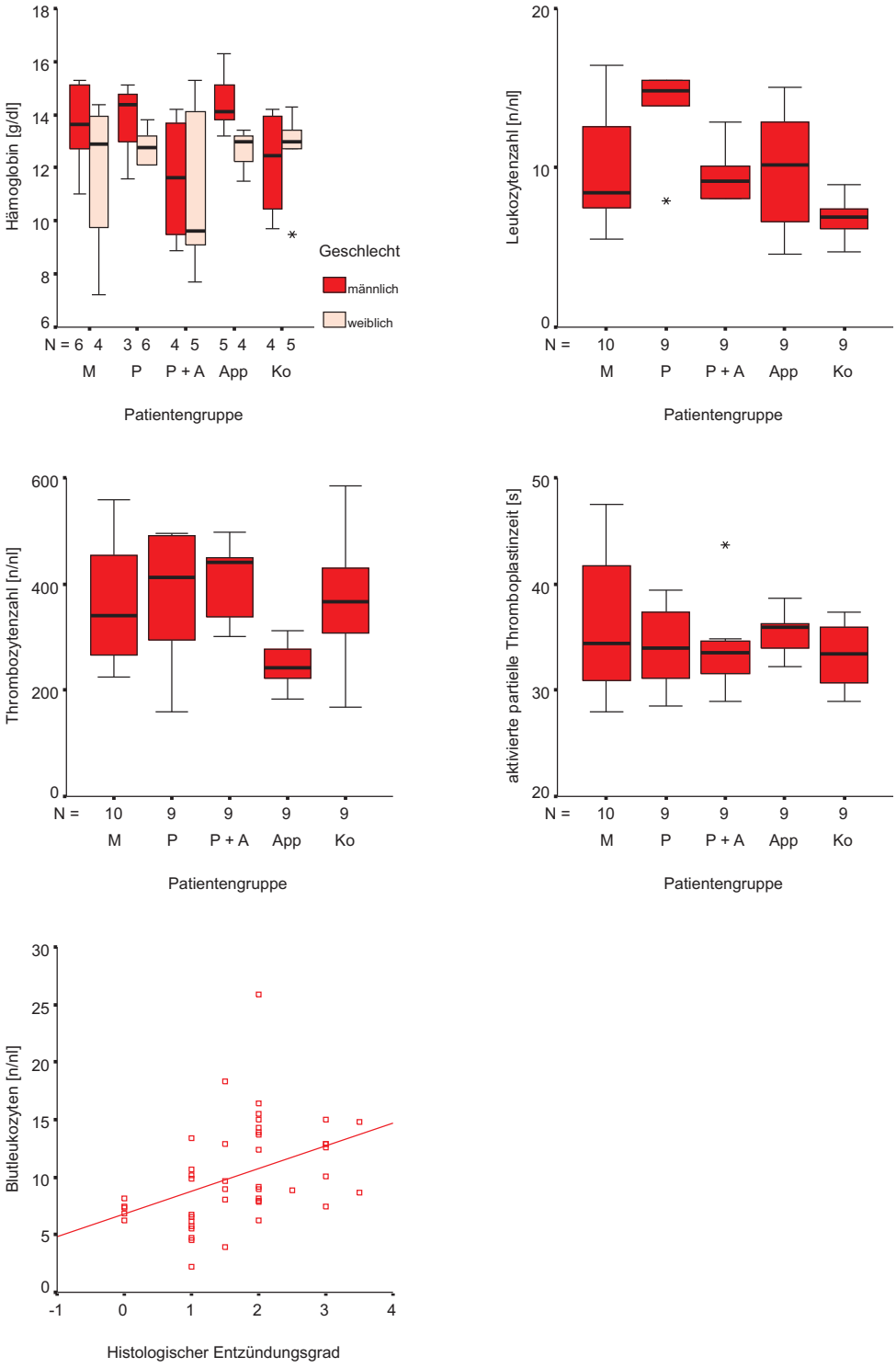

Abbildung 4.8: Boxplots zu präoperativen Blutwerten; Streudiagramm mit linearer Regressionsgerade für Blutleukozyten in Abhängigkeit vom histologischen Entzündungsgrad.

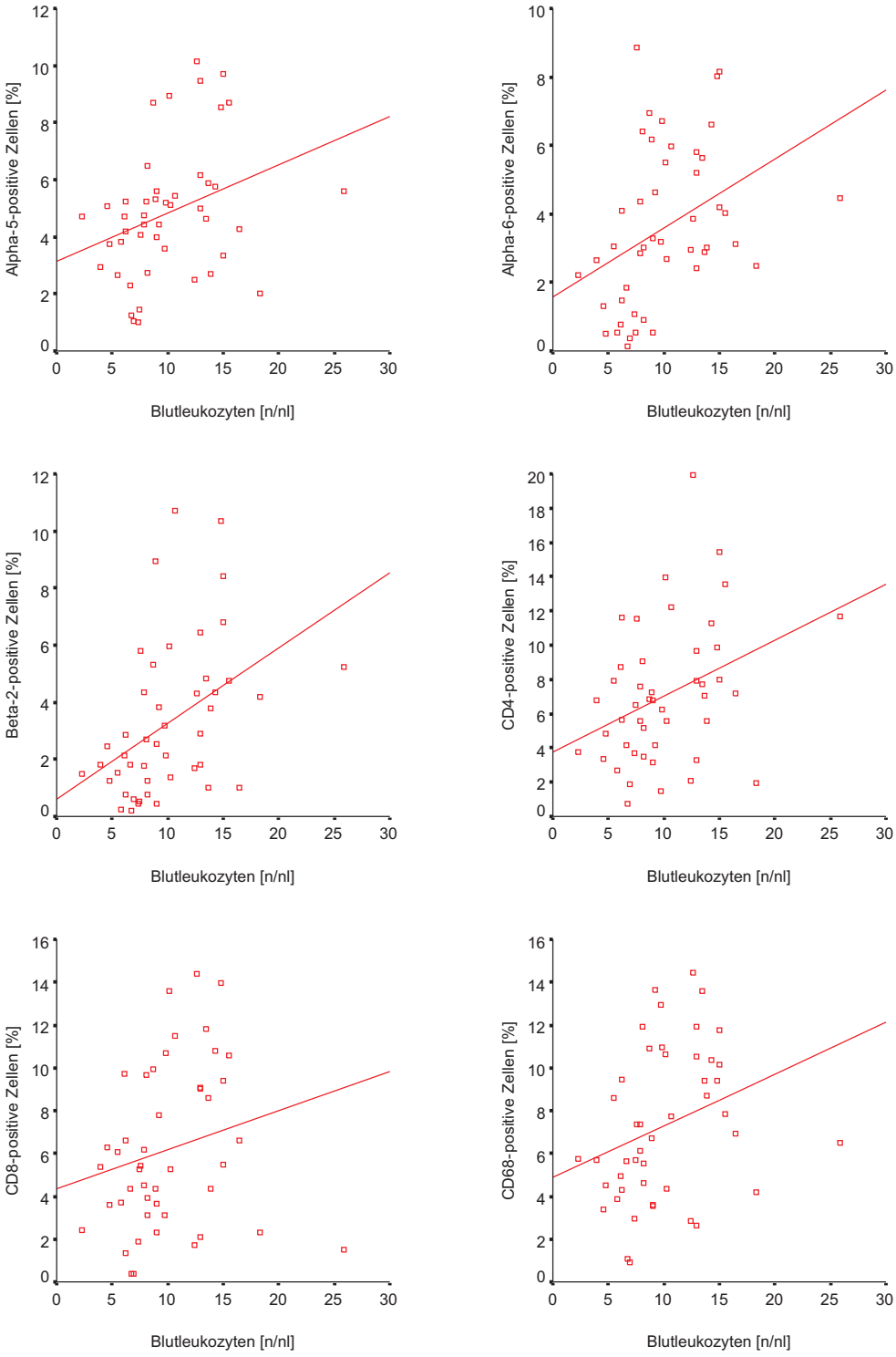

Abbildung 4.9: Streudiagramme mit linearer Regressionsgerade für Defensin-positive Zellen und Immunzellen im Ileum in Abhängigkeit von Leukozyten im peripheren Blut.

5 Diskussion

Obwohl der Morbus Crohn schon vor über 100 Jahren erstbeschrieben wurde, ist seine Pathogenese bis heute noch immer unklar. Neben genetischen Dispositionen werden auch bestimmte Umweltfaktoren als wesentliche ätiologische Ursachen angenommen. In der Konsequenz entsteht schließlich ein dysreguliertes mukosales Immunsystem, welches sich durch eine überschießende Abwehrreaktion auf die endogene Bakterienflora und somit eine gestörte Darmgewebshomöostase auszeichnet [42, 63]. Mit Entdeckung der Defensine Anfang der Achtziger Jahre ergaben sich neue Ansatzpunkte im Verständnis der Immunabwehr an Grenzflächen und damit auch der intestinalen Mukosa. Defensine leisten als antimikrobielle Peptide einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der mukosalen Barrierefunktion. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie in der Lage, direkt Mikroben abzuwehren, aber auch Immunzellfunktionen zu regulieren [4, 12, 18, 64]. Anhand ihrer Struktur werden die humanen Defensine in Alpha- und Beta-Defensine unterschieden. Die Alpha-Defensine $\alpha 5$ und $\alpha 6$ werden konstitutiv hauptsächlich von Panethzellen der Ileumschleimhaut exprimiert [79]. Die Expression von Beta-Defensinen erfolgt auf Organoberflächen, im Darm vorrangig von intestinalen Epithelzellen. Eine besondere Eigenschaft von $\beta 2$ stellt die Induzierbarkeit unter entzündlichen Bedingungen dar. Im gesunden Darm ist $\beta 2$ dagegen nur in sehr geringer Menge vorhanden [28, 29, 70].

5.1 Defensinvorkommen im subepithelialen Ileum

Da sich die Hauptauseinandersetzung des intestinalen Immunsystems mit den verschiedenen Darmkeimen vorrangig an der Schleimhautoberfläche abspielt, liegen zahlreiche *in vitro*- wie *in vivo*-Studien zur Expression von Defensinen im Darmepithel vor (siehe folgende Kapitel). Es existieren allerdings bisher kaum Studien, die sich mit der Defensinexpression in subepithelialen Darmwandschichten beschäftigt haben. Aus diesem Grund lag der Fokus der

vorliegenden Doktorarbeit auf der Betrachtung der Lamina propria, der Zellschicht, die sich dem Epithel unmittelbar anschließt und sich hauptsächlich aus retikulärem Bindegewebe und immunkompetenten Zellen zusammensetzt. In ihr befinden sich auch die Nodi lymphatici aggregati, Ansammlungen von Sekundärfollikeln, die als Peyer-Plaques bezeichnet werden.
Im Rahmen der Studie wurde zunächst untersucht, ob Defensine in den subepithelialen Schleimhautschichten des Ileums überhaupt vorkommen. Hierfür wurden immunhistochemische Verfahren (POD-Färbung, Immunfluoreszenzfärbung) verwendet, bei welchen die untersuchten Proteine durch indirekte Antikörpermarkierung sichtbar gemacht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Defensine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 2$ auch in der Lamina propria des Ileums aufzufinden sind. Defensin-positive Zellen konnten dabei sowohl im Ileum von Kontrollpatienten als auch bei Patienten mit einer Darmentzündung (Appendizitis, Morbus Crohn) mikroskopisch detektiert werden.

5.1.1 Defensin-positive Zellen unter entzündlichen Bedingungen

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Morbus Crohn, welcher zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählt. Wenngleich sich die Krankheit per definitionem durch ein chronisches Entzündungsgeschehen auszeichnet, sind auch rezidivierende akute Exazerbationen für den Krankheitsverlauf typisch. Als vergleichende akute Entzündung wurde die Appendizitis herangezogen, da die Appendix einen ähnlichen Wandaufbau wie das terminale Ileum aufweist. Um bezüglich der untersuchten Defensine Gruppenvergleiche durchführen zu können, wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen die Defensin-positiven Zellen für alle Gruppen quantifiziert und anschließend auf die Gesamtzellzahl normiert.
Insgesamt konnte eine erhöhte Menge Defensin-positiver Zellen im subepithelialen Ileum unter entzündlichen Bedingungen eruiert werden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Menge mit dem Grad der Entzündung (ermittelt durch histopathologische Beurteilung der Schleimhaut und Vergabe eines Punktewertes zwischen 0 und 4), und zwar unabhängig vom untersuchten Defensin und unabhängig davon, ob es sich um eine akute oder eine chronische Darmentzündung handelte. Da die Lymphozyten der Lamina propria Effektorzellen darstellen, die auf Entzündungszustände an der epithelialen Grenzfläche reagieren, ist anzunehmen, dass bei einer Hochregulierung der Defensinexpression im Epithel auch die

in den darunterliegenden Schichten vorkommenden Defensine vermehrt exprimiert werden. Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Methodik kann allerdings lediglich eine Aussage über die Anzahl Defensin-positiver Zellen getroffen werden, nicht jedoch über die absolute Defensinmenge. Auch kann nicht differenziert werden, ob die angefärbten Zellen die Defensine nur oberflächlich binden oder diese auch exprimieren.
Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass bei einem Morbus Crohn in der ilealen Lamina propria ähnliche Mengen an α5-, α6- und β2-positiven Zellen vorkommen wie in der Lamina propria der Appendix vermiformis bei akuter Appendizitis. Da Defensine im Darm nicht nur spezifisch für einen Morbus Crohn gelten, sondern als Antwort auf jegliche Entzündungsvorgänge exprimiert werden, erscheint dieses Ergebnis durchaus plausibel, wenngleich bei einer akuten Darmentzündung höhere Mengen Defensin-positiver Zellen zu erwarten gewesen wären als bei einer chronischen Darmentzündung. Kritisch zu betrachten ist allerdings, dass die Appendizitis-Patienten in ihren Resektaten entgegen der Erwartung eine verhältnismäßig geringe Entzündungsaktivität zeigten (der gemittelte Entzündungsgrad der Patientengruppe betrug 1). Sie können somit nicht als repräsentativ für eine akute Entzündung gelten.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich im Laufe der letzten Jahre mit der Defensinexpression in verschiedenen Epithelien des Magen-Darm-Traktes unter entzündlichen Bedingungen beschäftigt. So wurde bei Neugeborenen mit nekrotisierender Fasziitis [73] sowie bei Entzündungen im weiblichen Geschlechtstrakt [74] eine vermehrte α5-Expression aufgezeigt. Eine stark erhöhte Expression von α5 und α6 fand sich auch im Duodenum bei Patienten mit aktiver Zöliakie, jedoch nicht bei Patienten mit Zöliakie in Remission [79]. Beta-Defensin 2 fand sich hochreguliert bei Helicobacter pylori-induzierter Gastritis [75], bei natürlichen Abschürfwunden im Mundhöhlenbereich [76, 77] sowie im Peritoneum von Patienten mit chronischer und akuter Appendizitis [78]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von Alpha- und Beta-Defensinen durch bakterielle Stimuli beziehungsweise durch proinflammatorische Mediatoren (TNF-α, IL-1β) induzieren lässt. Dieser Nachweis gelang für die Panethzelldefensine α5 und α6 im Mausmodell [17], für β2 in Versuchen an Kolonepithelzelllinien [28, 29].
Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gilt heute als gesichert, dass die Menge der Defensine verändert ist. So konnten bei der Colitis ulcerosa sowie beim

Morbus Crohn mit Kolonbeteiligung eine Überexpression von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ durch metaplastische Panethzellen im Kolonepithel nachgewiesen werden [13, 70, 81, 82]. Im Ileumepithel von Patienten mit Morbus Crohn zeigte sich dagegen eine im Vergleich zur Kontrolle gleichbleibende Expression der Panethzelldefensine [70]. Wehkamp et al. wiesen sogar eine verminderte Expression nach [72]. Bezüglich $\beta 2$ wurde für die Colitis ulcerosa mehrfach eine starke Hochregulation im Dickdarmepithel gezeigt [83]. Auch in entzündeten Kolonbiopsien von Morbus Crohn-Patienten gelang der Nachweis einer $\beta 2$-mRNA-Vermehrung, die sich jedoch in nicht-entzündeten Arealen nicht bestätigte [28, 53, 70].

Der Morbus Crohn wird heute häufig als Defensinmangel-Syndrom bezeichnet [36, 71], wobei unterschieden wird zwischen einem defekten Alpha-Defensinsystem bei ilealem Morbus Crohn und einer fehlerhaften Induktion von Beta-Defensinen bei Morbus Crohn mit Manifestation im Kolon [65, 67, 72, 80]. Ein Teil der Patienten weist eine Mutation im NOD2/CARD15-Gen auf, welches für den intrazellulären Rezeptor NOD2 kodiert, der zur Erkennung bestimmter Bakterienwandprodukte notwendig ist. Es wurde nachgewiesen, dass ein NOD2-Defekt zu einer eingeschränkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und damit zu einer reduzierten $\beta 2$-Ausschüttung führt (siehe Kapietel 1.2.2). Dies erklärt die deutlich geringer ausgeprägte Hochregulation von $\beta 2$ bei Morbus Crohn im Vergleich zur Colitis ulcerosa, bei der diese Mutation nicht gehäuft auftritt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einem NOD2-Defekt und dem ilealen Alpha-Defensinmangel bei M. Crohn-Patienten wird derzeit kontrovers diskutiert [66, 84], ebenso die Anzahl der Alpha-Defensin exprimierenden Panethzellen im Ileum. Simms et al. konnten belegen, dass im Ileum von Morbus Crohn-Patienten durch den entzündungsbedingten Epithelschaden auch ein Panethzellverlust vorliegt [84]. Andere Studien wiederum zeigten, dass die Menge der Panethzellen im Vergleich zum gesunden Ileum unverändert ist [72, 85]. Es ist also weiterhin unklar, ob die Panethzellen beim Vorliegen eines Morbus Crohn durch bisher noch unbekannte Mechanismen weniger Defensine exprimieren als im gesunden Zustand oder ob die exprimierten Defensine eine Funktionseinschränkung aufweisen.

Einen wichtigen Erklärungsansatz lieferten wiederum Wehkamp et al. durch den Beweis der Kopplung der Panethzelldefensinexpression an den Wnt/Tcf-4-Signalweg [86]. Wnt ist ein Signalprotein, welches über eine komplexe Kaskade zur Hemmung des Abbaus von β-Catenin führt. β-Catenin ist in der Lage, durch Bindung an verschiedene Transkriptionsfaktoren

(Tcf) Gene im Zellkern zu aktivieren. Tcf-4 ist einer dieser Transkriptionsfaktoren und gilt als Schlüsselmolekül für die Panethzelldifferenzierung und die Expression der Panethzelldefensine α5 und α6 [87, 88]. Für Morbus Crohn-Patienten wurden im Ileum verminderte mRNA Level von Tcf-4 nachgewiesen, die mit der Reduktion der Alphadefensinexpression korrelierten. Außerdem konnte in Tcf-4-Knockout-Mäusen direkt eine verminderte Panethzelldefensinexpression gezeigt werden [86].

Bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse und unter Einbezug der aktuellen Studienlage wäre zu diskutieren, dass bei Morbus Crohn-Patienten durch die fehlende Barrierefunktion des intestinalen Epithels, gefördert durch den relativen epithelialen Defensinmangel, vermehrt Keime in die subepithelialen Schichten eindringen und somit konsekutiv eine verstärkte Entzündungsreaktion in der Lamina propria ausgelöst wird. Es wäre denkbar, dass es dort gegenregulatorisch zu einer Aktivierung oder sogar Proliferation von Zellen (möglicherweise immunkompetenter Zellen) kommt, die in der Lage sind, Defensine zu exprimieren. Möglich wäre außerdem auch eine vermehrte Defensinbindung durch Zellen der Lamina propria im Rahmen entzündungsinduzierter Signalkaskaden. Geht man davon aus, dass die Defensinproduktion nur durch Zellen des Epithels erfolgt, die Defensine aber subepithelial abgefangen werden, wäre effektiv weniger Defensin im Epithel messbar, was wiederum einen Defensinmangel suggeriert. Beide vorgestellten Hypothesen würden die erhöhten Mengen Defensin-positiver Zellen in der ilealen Lamina propria erklären, bedürfen allerdings weiterführender Studien.

5.1.2 Defensin-positive Zellen bei Morbus Crohn unter verschiedenen medikamentösen Therapien

Die medikamentöse Therapie des Morbus Crohn setzt sich aus verschiedenen antiphlogistischen, immunsuppressiven und immunmodulatorischen Substanzen zusammen und hat zum Ziel, die aktive Entzündung zu kontrollieren, eine Remission zu induzieren und zu erhalten sowie Komplikationen zu behandeln [89]. Durch die große Variationsbreite in den Ansprechraten und Nebenwirkungen der einzelnen Wirkstoffe ist eine Therapie, in Abhängigkeit vom Befallsmuster und Schweregrad der Erkrankung, immer individuell festzulegen.

Wirkweise von Mesalazin

Mesalazin gehört zur Gruppe der Aminosalicylate und hat antiinflammatorische wie auch immunsuppressive Wirkung. Durch Hemmung der Cyclooxygenase greift es in den Arachidonsäurestoffwechsel ein und inhibiert somit die Prostaglandin- und Leukotriensynthese [89, 90]. Es ist außerdem bekannt, dass Mesalazin in der Lage ist, freie Sauerstoffradikale zu binden. Des Weiteren zeigt Mesalazin auch immunmodulatorische Aktivität, indem es die Antikörperbildung von Plasmazellen sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine hemmt [91] und zusätzlich die Monozyten-, Lymphozyten- und Granulozytenfunktion abschwächt [92]. Nachgewiesen wurde auch eine Inhibierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs [93], was möglicherweise eine verminderte α-Defensinexpression durch Panethzellen zur Folge hat [86]. In Versuchen an Kolonepithelzelllinien untersuchten Witthöft et al. die Wirkung verschiedener medikamentöser Substanzen auf die β2-Expression, darunter auch Sulfasalazin, welches eine Verbindung aus Mesalazin und Sulfapyridin darstellt. Sulfasalazin war dabei nicht in der Lage, die β2-Hochregulation durch proinflammatorische Stimuli zu inhibieren [94], obwohl es als NFκB-Antagonist bekannt ist [95]. Die Wirkung von Mesalazin auf die β2-Expression wurde bisher nicht untersucht.

Wirkweise von Prednisolon

Prednisolon ist ein synthetisches Glukokortikoid mit einer ausgeprägten antiinflammatorischen, immunsuppressiven sowie antiallergischen Wirkung und findet einen breiten Einsatz bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Das Wirkungsspektrum lässt sich nicht auf einen Wirkmechanismus reduzieren, sondern ist vielgestaltig. So ist Prednisolon ein potenter Hemmer der Leukotrien- und Prostaglandinsynthese und bewirkt durch die Hemmung von NFκB [96] eine verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, 2, 4, 5, 6, 8 oder IFN-γ [97, 98]. Da NFκB in Makrophagen und Epithelzellen von entzündeter intestinaler Mukosa aktiviert ist [58], erklärt das den raschen Wirkeintritt in stark entzündetem Darmgewebe. Prednisolon verhindert weiterhin das Einwandern von Leukozyten in geschädigte Gewebebereiche [89]. Es setzt außerdem die Makrophagenaktivität sowie die Permeabilität von Blutgefäßen herab.

Es konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren in entzündeter Darmschleimhaut von CED-Patienten herunterreguliert sind, und zwar unabhängig davon, ob bei

den Patienten vorher eine Steroid-Therapie bestand oder nicht [99]. Es wird damit suggeriert, dass eine lokalisierte Darmentzündung keine systemische Herunterregulation der Glukokortikoidrezeptoren nach sich zieht, was möglicherweise einen verminderten Schutz gegen die Entzündungsaktivierung durch NFκB und somit eine Verstärkung der intestinalen Entzündungssymptomatik zur Folge hat. Ein lokaler Glukokortikoidrezeptormangel bei CED-Patienten würde aber auch bedeuten, dass verabreichte Glukokortikoide in der Darmschleimhaut eine geringere lokale Wirkung haben.
Eine NFκB-abhängige Regulation unter entzündlichen Bedingungen wurde auch für β-Defensin 2 im Darm nachgewiesen [28, 30]. Demzufolge müsste sich die β2-Expression durch Glukokortikoide inhibieren lassen. In Studien von Duits et al. konnte allerdings gezeigt werden, dass Kortikoide keinen Einfluss auf die β2-Expression durch Bronchusepithelzellen und mononukleären Phagozyten hat [100]. Witthöft et al. demonstrierten sogar eine Verstärkung der Expression von β2 durch Glukokortikoide [94]. Aus diesem Grund werden mittlerweile andere β2-Aktivierungswege diskutiert, die NFκB-unabhängig sind, beispielsweise induziert durch MAP-Kinasen [101].

Wirkweise von Azathioprin

Die immunsuppressive Wirkung von Azathioprin beruht auf der Hemmung der zellulären und humoralen Immunabwehr. Azathioprin ist ein Derivat des 6-Mercaptopurins und als solches purinantagonistisch wirksam. Es kommt dadurch zu einer fehlerhaften DNA- und RNA-Synthese, was therapeutisch vorrangig zur Proliferationshemmung von Lymphozyten genutzt wird. Des Weiteren ist Azathioprin in der Lage, die Apoptose von T-Zellen zu induzieren. Dies wird durch die Blockade des G-Proteins Rac1 erreicht, welches normalerweise CD28-abhängig in einer komplexen Signalkaskade die T-Zellaktivierung und -inaktivierung kontrolliert [48]. Außerdem wird Azathioprin eine unspezifische antiphlogistische Wirkung nachgesagt, wenngleich der Wirkmechanismus dafür bisher nicht bekannt ist.
Es liegen aktuell keine Studien vor, die sich mit der Expression verschiedener Defensine in der Darmschleinhaut unter Azathioprin-Therapie beschäftigt haben, nicht zuletzt, weil das Wirkspektrum von Azathioprin einen Einfluss auf die mukosale Defensinexpression nicht erwarten lässt.

Vergleich der Mengen Defensin-positiver Zellen unter verschiedenen Therapieschemata

In der vorliegenden Arbeit wurden Defensin-positive Zellen in der ilealen Lamina propria von Morbus Crohn-Patienten quantifiziert. Dabei wurden Patienten mit drei unterschiedlichen Therapieschemata betrachtet, wobei die erste Patientengruppe präoperativ Mesalazin erhalten hatte, die zweite Gruppe Prednisolon und die dritte Gruppe eine Kombinationstherapie aus Prednisolon und Azathioprin. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Morbus Crohn-Therapiegruppen hinsichtlich der Mengen α5- und α6-positiver Zellen. Bezüglich β2 konnte bei Patienten unter Prednisolon-Therapie eine erhöhte Anzahl Defensin-positiver Zellen im Vergleich zu Mesalazin-therapierten Patienten und solchen unter einer Kombinationstherapie aus Prednisolon und Azathioprin festgestellt werden. Da die Mengen Defensin-positiver Zellen bei unbehandelten Morbus Crohn-Patienten nicht bekannt sind und im Rahmen der Studie auch nicht untersucht wurden, bleibt unklar, ob die erhaltenen Mengen unter medikamentöser Therapie im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Behandlung erhöht, gleich oder vermindert sind. Auch kann aufgrund der Methodik keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Veränderungen der Mengen Defensin-positiver Zellen auf die Erkrankung selbst oder auf das jeweilige Therapeutikum zurückzuführen sind. Da Mesalazin im Anfangsstadium der Erkrankung beziehungsweise bei leichter Entzündungsaktivität eingesetzt wird, im Gegenzug dazu Prednisolon bei schwerer Entzündungsaktivität beziehungsweise im akuten Schub, können die Ergebnisse ein Indiz darauf sein, dass sich die Unterschiede der Mengen β2-positiver Zellen bezüglich dieser Patientengruppen durch eine unterschiedliche Entzündungsaktivität erklären lassen. Auch ist es möglich, dass die operierten Studienpatienten unter alleiniger Prednisolon-Therapie steroidrefraktär waren und somit deutlich schwerere Entzündungszustände im Darm aufwiesen. Wenngleich dies eine naheliegende Begründung ist, konnte die durchgeführte histopathologische Entzündungsgradbestimmung diese Annahme nicht bestätigen, da sich im M. Crohn-Gruppenvergleich ähnliche Entzündungsaktivitäten zeigten. Die nachgewiesene Vermehrung der Mengen β2-positiver Zellen unter Prednisolon-Therapie unterstützt aber auch die Hypothese, dass Glukokortikoide neben der von Witthöft et al. nachgewiesenen Verstärkung der β2-Expression unter entzündlichen Bedingungen [94] dabei auch die Proliferation von Zellen in der ilealen Lamina propria anregen, die in der

Lage sind, Defensine zu exprimieren beziehungsweise zu binden. Allerdings wurde die β2-Expression unter Glukokortikoid-Einfluss im Darm bisher lediglich an Kolonepithelzelllinien untersucht. Ob die dabei gewonnen Ergebnisse auch auf den menschlichen Dickdarm übertragbar sind, müssen weiterführende Studien klären. Es ist weiterhin anzunehmen, dass die β2-Expression in der Dünndarmschleimhaut anders durch Glukokortikoide beeinflusst wird als in der Dickdarmschleimhaut, da auch im gesunden Darm die Defensinexpressionsmuster zwischen Dünndarm und Dickdarm deutlich unterschiedlich sind [79].

5.2 Defensin-positive Immunzellen im subepithelialen Ileum

Die Lamina propria mucosae ist eine gefäß- sowie nervenreiche Schleimhautschicht und beinhaltet neben retikulärem Bindegewebe viele immunkompetente Zellen, deren Hauptaufgabe es ist, den Körper durch den kontrollierten Ablauf von Entzündungsvorgängen vor pathologischen Keimen zu schützen und Keime der kommensalen Darmflora zu tolerieren. Neben T- und B-Lymphozyten, die den größten Zellanteil ausmachen, finden sich hier auch Makrophagen und Mastzellen. Charakteristisch ist die Formation von Lymphfollikeln, bei denen sich zahlreiche immunkompetente Zellen auf engem Raum zirkulär anordnen und durch Bildung sogenannter Keimzentren eine Entzündungsreaktion vom restlichen Gewebe abschirmen.
Entzündungszellen müssen in der Lage sein, mit der jeweiligen Organgrenzfläche und auch untereinander zu kommunizieren, um die in Gang gesetzten Vorgänge und Kaskaden gezielt steuern zu können. Dies geschieht durch die Ausschüttung und Bindung von Botenstoffen, insbesondere den Zytokinen (siehe auch Kapitel 1.1.2). Auch Defensine können immunmodulatorisch wirksam sein [4, 12, 18, 64]. Bisher ging man jedoch davon aus, dass Defensine ausschließlich in der Epithelschicht exprimiert werden und auch dort ihre Wirkung entfalten. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass auch in der Lamina propria Defensine nachweisbar sind. Ob diese von den lokal ansässigen immunkompetenten Zellen exprimiert werden oder aber von epithelial in die Lamina propria gelangen, konnte dabei nicht geklärt werden. Bisher wurde eine lokale Expression für den Darm noch nicht beschrieben. Bekannt ist eine Expression von β-Defensin 2 durch dermale Makrophagen sowie Alveolarmakrophagen [102, 103], weiterhin findet sich eine α-Defensinexpression durch Makrophagen und $\gamma\delta$-T-Zellen erwähnt

[104]. Es ist daher durchaus möglich, dass auch intestinale Makrophagen und $\alpha\beta$-T-Zellen (zu welchen T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen zählen) zur Defensinexpression in der Lage sind. Unter welchen Bedingungen und in welchem Ausmaß dies geschieht, ist derzeit rein spekulativ.

Wie bereits in Kapitel 5.1 erwähnt, kann neben der Defensinexpression auch eine Defensinbindung für den Nachweis Defensin-positiver Zellen in der Lamina propria verantwortlich sein. Es wurde in vielen Studien ein chemotaktisches Verhalten der Defensine nachgewiesen. So haben β-Defensine chemotaktische Eigenschaften auf dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen [38], α-Defensine auf Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und T-Zellen [24, 25, 27]. Gezeigt wurde auch eine spezifische Bindung von α-Defensinen an den CD4-Rezeptor auf T-Zellen im Zusammenhang mit dem Primärschutz bei HIV-Infektionen [26]. In Anbetracht der Tatsache, dass sich in der Lamina propria der Hauptteil der Entzündungsreaktion abspielt, ist anzunehmen, dass Defensinbindung zur interzellulären Kommunikation dort ein häufig auftretendes Phänomen darstellt. Eine kumulative zelloberflächliche Proteinbindung, die zum fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Bild einer Defensin-positiven Zelle führt, ist also eine weitere wahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit für die beschriebenen Ergebnisse.

5.3 Korrelation zwischen Defensin-positiven Zellen der ilealen Lamina propria und Blutleukozyten

Im Rahmen der Untersuchungen konnten positive Zusammenhänge zwischen den α5-, α6- und β2-positiven Zellen in der ilealen Lamina propria mit den Leukozyten im präoperativ untersuchten Patientenblut festgestellt werden. In der Routinediagnostik wird die Menge an Blutleukozyten pro Nanoliter (neben anderen Parametern wie dem C-reaktiven Protein oder dem Procalcitonin) als Marker für das Ausmaß einer Entzündungsreaktion eingesetzt, wobei eine erhöhte Zellmenge eine verstärkte Entzündungsreaktion anzeigt. Da im Rahmen dieser Arbeit außerdem evaluiert werden konnte, dass die Menge an Defensin-positiven Zellen in der ilealen Lamina propria mit dem Grad der Entzündung ansteigt, erscheinen die beschriebenen Zusammenhänge zwischen Defensin-positiven Zellen und Blutleukozyten in jedem Fall plausibel.

5.4 Fehlerbetrachtung und Ausblick

- Bei der vorliegenden Doktorarbeit handelt es sich um eine Pilotstudie, die sich zum ersten Mal mit der Anzahl der Defensin-positiven Zellen im subepithelialen Ileum beschäftigte. Die Testung von neun beziehungsweise zehn Patienten pro Gruppe hat allerdings lediglich Stichprobencharakter. Künftige Studien sollten größere Patientenkollektive wählen. Außerdem wäre es interessant, zusätzlich auch gezielt die Defensinexpression zu evaluieren, da diese nicht mit der Menge Defensin-positiver Zellen korrelieren muss. Die Färbebilder zeigen zwar in den meisten Fällen eine deutliche inrazelluläre Akkumulation der untersuchten Defensine und lassen somit vermuten, dass es sich um exprimierte Defensine handelt, den tatsächlichen Nachweis dafür können aber nur Versuche auf mRNA-Ebene, beispielsweise In-situ-Hybridisierung, liefern.

- Es wäre weiterhin interessant, in künftigen Studien auch Kolonmukosa auf Defensin-positive Zellen zu untersuchen. Ebenfalls sinnvoll erscheint es, Colitis ulcerosa-Patienten vergleichend mit einzubeziehen. Auch wenn beide Krankheiten (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) zu den chronischen Erkrankungen zählen, so verhalten sie sich in Pathogenese, Manifestation, Verlauf und Behandlung völlig unterschiedlich. Bei der Expression epithelialer Defensine wurden bereits deutliche Divergenzen nachgewiesen (siehe Kapitel 5.1.1). Es ist zu vermuten, dass sich auch hinsichtlich der Mengen Defensin-positiver Zellen in der Lamina propria Unterschiede aufzeigen lassen.

- Immunhistochemie und Immunfluoreszenz sind trotz bestmöglicher Standardisierung in der Durchführung relativ fehleranfällige Verfahren. Die Etablierung der Methodik beinhaltet deshalb die Erkennung und bestmögliche Anpassung von potenziellen Einflussfaktoren. Zu diesen zählen unter anderem die Fixierungsart und -dauer des Gewebes, die Vorbehandlungsmethoden der Präparate, aber auch die Antikörperkonzentration und Inkubationszeit sowie die Temperatur-, Luft- und Lichtverhältnisse bei der Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch das Mitführen einer Positiv- und Negativkontrolle in jedem Färbegang, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, können Unregelmäßigkeiten in der Anordnung beziehungsweise im Ablauf aber gut kontrolliert werden.

- Die Wellenlängenbereiche der verwendeten Sekundärantikörper Cy™2 und Cy™3 lie-

gen im Fluoreszenzspektrum relativ nah beieinander. Um Überschneidungen im Grenzbereich beider Antikörper zu vermeiden, ist die Wahl enger Bandpassfilter wichtig.

- Die Wahl von Darmtumorpatienten als Kontrollgruppe war unumgänglich, da es nicht möglich ist, von einem gesunden Patientenkollektiv Darmresektate zu erhalten. Bei Tumorpatienten kommt es jedoch nicht selten zu einer Begleitentzündung im Tumor angrenzenden Gebiet, wobei Defensinmengenverschiebungen auftreten können. Durch die histopathologische Bestimmung des Entzündungsgrades können solche Effekte gut erfasst werden. Für alle in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Kontrollpatienten wurde ein Entzündungsgrad unter 2 bestimmt.

- Die untersuchten Appendix-Proben wurden aus der Basis der entzündeten Appendices entnommen. Da die akute Appendizitis im Normalfall in der Spitze der Appendix sitzt beziehungsweise von apikal nach basal nachlässt, war der histologische Entzündungsgrad der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Appendix-Proben vergleichsweise niedrig. Proben aus der Appendixspitze hätten vermutlich höhergradige Entzündungen gezeigt und somit vermutlich auch höhere Mengen an Defensin-positiven Zellen.

- Alle Morbus Crohn-Patienten wurden im akuten Schub operiert und wiesen somit eine verstärkte Entzündungsreaktion auf, unabhängig von ihrer erhaltenen medikamentösen Therapie. Es handelte sich also beim gewählten Patientenkollektiv höchstwahrscheinlich um sogenannte „Therapieversager“, was generelle Aussagen über die Wirksamkeit beziehungsweise Unwirksamkeit des jeweiligen Medikaments deutlich erschwert.

- Die Expression von Oberflächenrezeptoren auf Zellen wird in der Immunhistochemie zur Zelldifferenzierung eingesetzt. Während CD8 für zytotoxische T-Zellen und CD68 für Makrophagen charakteristisch ist, wird CD4 nicht nur auf T-Helferzellen exprimiert, sondern auch auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten.

Die Pathogenese des Morbus Crohn ist ein bereits viel umforschtes, jedoch auch heute noch zu einem großen Teil unverstandenes Feld. Die Möglichkeiten kurativ wirksamer medikamentöser Therapieansätze sind daher noch in ferner Zukunft anzusiedeln. Unter der Annahme einer multifaktoriellen Krankheitsgenese und auch durch die starken interindividuellen Unterschiede bezüglich der Krankheitsmanifestation erscheint der Einsatz

allgemeingültig wirksamer Therapeutika sogar nahezu unwahrscheinlich. Viel mehr wird es auch in Zukunft so sein, dass eine medikamentöse Therapie auf den individuellen Einzelfall zugeschnitten sein muss und möglicherweise auch weiterhin nur symptomatisch erfolgen kann.
Defensine und ihre veränderte Expression bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stellen lediglich einen von vielen Erklärungsansätzen für die gestörte Darmgewebshomöostase dar, wenngleich nach wie vor unklar ist, welches Ereignis zeitlich voran geht, das heißt, ob ein Morbus Crohn zu einer verminderten Expression von epithelialen Defensinen führt oder ob die gestörte Defensinexpression im Epithel zur Manifestation eines Morbus Crohn beiträgt. Wissenschaftlich belegt ist, dass Defensine essentielle Faktoren der Immunabwehr darstellen und ihr Fehlen beziehungsweise ihr Funktionsverlust dazu führt, dass der Organismus nicht mehr adäquat auf Entzündungszustände reagieren kann. Einige sogenannte Schlüsselfaktoren, wie bespielsweise Tcf-4 oder NOD2, wurden bereits identifiziert, sie liefern aber bisher nur ansatzweise befriedigende Erklärungskonzepte.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen, dass Defensine nicht nur unmittelbar an Grenzflächen vorkommen, sondern auch in tiefer gelegenen Gewebeabschnitten, insbesondere dort, wo sich hoch spezialisierte immunkompetente Zellen befinden, die in der Lage sind, die vom Epithel fortgeleitete Entzündung aktiv zu bekämpfen und zu regulieren. Defensine sind demzufolge nicht nur Abwehrmoleküle der ersten Reihe, sondern scheinen auch bei komplexen Entzündungsvorgängen der erworbenen Immunabwehr eine direkte beziehungsweise indirekte Rolle zu spielen, was durch die nachgewiesene positive Korrelation der Mengen Defensin-positiver Zellen mit dem Grad der Entzündung bestätigt werden konnte.

6 Zusammenfassung

Der menschliche Darm kommt über die Nahrung täglich mit einer Vielzahl verschiedenster Keime in Kontakt. Um auf diese adäquat reagieren zu können, ist einerseits eine intakte mukosale Barriere wichtig, andererseits aber auch die gezielte Aktivierung passiver sowie aktiver Abwehrmechanismen sowie die Toleranz gegenüber endogenen Kommensalen zur Vermeidung überschießender Immunreaktionen. Eine wesentliche Rolle bei der mukosalen Immunabwehr spielen die Defensine. Diese antimikrobiellen Peptide werden auf Organoberflächen exprimiert und tragen als sogenannte „körpereigene Antibiotika“ im Darm wesentlich zur Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosabarriere bei. Alpha-Defensin 5 und 6 ($\alpha 5$, $\alpha 6$) werden hauptsächlich von Panethzellen der Ileumschleimhaut konstitutiv exprimiert, wobei eine verminderte Expression im Ileum bei Vorliegen eines Morbus Crohn nachgewiesen wurde. Beta-Defensin 2 ($\beta 2$), vorrangig von Enterozyten exprimiert, wird stark hochreguliert als Antwort auf proinflammatorische Stimuli und spielt außerdem eine Rolle als Chemotaxin für Dendritische Zellen sowie Gedächtnis-T-Zellen. Ziel der vorliegenden Studie war es, Defensin-positive Zellen in der ilealen Darmwand bei Morbus Crohn-Patienten zu lokalisieren, die Unterschiede im Verteilungsmuster zur Appendizitis aufzuzeigen und den Einfluss verschiedener medikamentöser Therapien auf das Defensin-Vorkommen zu untersuchen.
Für die Versuchsreihen wurden paraffinfixierte OP-Resektate von menschlicher Darmschleimhaut verwendet. Terminales Ileumgewebe von 3 Morbus Crohn-Patientengruppen unter verschiedenen präoperativen Therapieschemata (Gruppe I: Mesalazin, Gruppe II: Prednisolon, Gruppe III: Prednisolon + Azathioprin) wurde mit gesundem Ileumgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom sowie Appendixgewebe von Patienten mit akuter Appendizitis verglichen. Mithilfe eines histopathologischen Bewertungssystems wurde für alle Gewebeschnitte der histologische Entzündungsgrad bestimmt (Punktevergabe von 0 bis 4, wobei 0 keiner Entzündung und 4 der schwersten Entzündungsstufe entspricht). Mittels Immunfluo-

reszenz erfolgten anschließend die Detektion von α5, α6 und β2 sowie die Bestimmung der prozentualen Menge Defensin-positiver Zellen in der Lamina propria.

Patienten mit Morbus Crohn wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe unabhängig von Art und Dauer ihrer medikamentösen Therapie in der Lamina propria des betroffenen Ileumabschnitts eine erhöhte Menge an α5-, α6- und β2-positiven Zellen auf, wobei die Menge mit dem Grad der Entzündung positiv korrelierte. Auch bei Patienten mit akuter Appendizitis konnten erhöhte Mengen an Defensin-positiven Zellen verglichen zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Defensine α5 und α6 zeigten keine signifikanten Mengenunterschiede zwischen den verschieden therapierten Morbus Crohn-Gruppen. Dagegen wiesen Morbus Crohn-Patienten unter Prednisolon-Therapie signifikant höhere Mengen an β2-positiven Zellen auf als Patienten unter Mesalazin-Therapie und Patienten unter einer Kombinationstherapie aus Prednisolon und Azathioprin.

Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die humanen Defensine α5, α6 und β2 auch außerhalb des Darmepithels vorkommen. Dabei konnte eine Erhöhung der Mengen Defensin-positiver Zellen unter entzündlichen Bedingungen evaluiert werden, unabhängig davon, ob es sich um eine akute oder eine chronische Darmentzündung handelt. Es wäre denkbar, dass es bei einem Morbus Crohn durch die gestörte Barrierefunktion des intestinalen Epithels, gefördert durch den relativen epithelialen Defensinmangel, vermehrt Keime in die subepithelialen Darmwandschichten eindringen und somit konsekutiv eine verstärkte Entzündungsreaktion in der Lamina propria ausgelöst wird. Diese könnte zu einer Aktivierung beziehungsweise Proliferation von (möglicherweise immunkompetenten) Zellen führen, die in der Lage sind, Defensine zu exprimieren oder zu binden, um somit die Abwehrlage des Organismus zu verbessern. Die deutlich erhöhten Mengen β2-positiver Zellen bei Patienten unter Prednisolon-Therapie implizieren Regulationswege dieses Defensins durch Kortikosteroide, die NFκB-unabhängig sind.

Literaturverzeichnis

[1] Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Anatomie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1999, 8. Auflage.

[2] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2002, 5. Auflage.

[3] Boman HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* 1998, 48(1):15-25.

[4] Fellermann K, Stange EF. Defensins - innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001, 13(7):771-776.

[5] Harder J, Siebert R, Zhang Y et al. Mapping of the gene encoding human β-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22p23.1. *Genomics* 1997, 46(3):472-475.

[6] Liu L, Zhao C, Heng HH, Ganz T. The human β-defensin-1 and α-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* 1997, 43(3):316-320.

[7] Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* 1993, 2(8):1301-1312.

[8] Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* 1994, 3(9):1362-1373.

[9] Lomize A, Lomize M, Pogozheva I. Orientations of proteins in membranes. *http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1zmp, http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1zmq, http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1fd3* [Zugriff am 17.05.2009]

[10] Lehrer RI, Ganz T. Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes. *Ciba Found Symp* 1992, 171:276-290.

[11] Porter EM, van Dam E, Valore EV, Ganz T. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun* 1997, 65(6):2396-2401.

[12] Ganz T. Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003, 3(9):710-720.

[13] Cunliffe RN, Rose FR, Keyte J, Abberley L, Chan WC, Mahida YR. Human defensin 5 is stored in precursors form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001, 48(2):176-185.

[14] Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Gastroenterology* 2004, 20(2):82-88.

[15] Bevins CL. Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract. V. Paneth cell alpha-defensins in intestinal host defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, 289(2):G173-G176.

[16] Ghosh D, Porter E, Shen B et al. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 2002, 3(6):583-590.

[17] Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000, 1(2):113-118.

[18] Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003, 62(SupplII):ii17-ii21.

[19] Rumio C, Besusso D, Palazzo M et al. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* 2004, 165(2):373-381.

[20] Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP et al. Regulation of intestinal α-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999, 286(5437):113-117.

[21] Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003, 422(6931):522-526.

[22] Salzman NH, Chou MM, de Jong H, Liu L, Porter EM, Paterson Y. Enteric salmonella infection inhibits paneth cell antimicrobial peptide expression. *Infect Immun* 2003, 71(3):1109-1115.

[23] Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K. Human α-defensins inhibit Clostridium difficile Toxin B. *Gastroenterology* 2008, 134(7):2049-2058.

[24] Chertov O, Michiel DF, Xu L et al. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1996, 271(6):2935-2940.

[25] Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000, 68(1):9-14.

[26] Furci L, Sironi F, Tolazzi M, Vassena L, Lusso P. α-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood* 2007, 109(7):2928-2935.

[27] Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J Immunol* 2007, 179(6):3958-3965.

[28] O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999, 163(12):6718-6724.

[29] Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K et al. NF-κB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 2004, 72(10):5750-5758.

[30] Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schröder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide β-defensin-2. *J Biol Chem* 2006, 281(4):2005-2011.

[31] Lala S, Ogura Y, Osborne C et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003, 125(1):4757.

[32] Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-κB. *J Biol Chem* 2001, 276(7):4812-4818.

[33] Vora P, Youdim A, Thomas LS et al. β-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in epithelial cells. *J Immunol* 2004, 173(9):5398-5405.

[34] Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. NF-κB-mediated transcriptional regulation of human β-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 2002, 71(1):154-162.

[35] Cario E: Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa. Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005, 54(8):1182-1193.

[36] Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohns disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003, 15(6):627-634.

[37] Rogler G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2004, 20:311-317.

[38] Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN et al. β-Defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999, 286(5439):525-528.

[39] Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA et al. Toll-like receptor 4dependent activation of dendritic cells by β-defensin 2. *Science* 2002, 298(5595):1025-1029.

[40] Hoffmann JC (Hrsg.), Kroesen AJ (Hrsg.), Klump B (Hrsg.). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2004, 1. Auflage.

[41] Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis* 1999, 5(2):79-84.

[42] Cario E, Gerken G, Podolsky DK. „For whom the bell tolls!" Innate defense mechanisms and survival strategies of the intestinal epithelium against lumenal pathogens. *Z Gastroenterol* 2002, 40(12):983-990.

[43] Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008, 40(8):955-962.

[44] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411(6837):603-606.

[45] Ogura Y, Lala S, Xin W et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003, 52(11):1591-1597.

[46] Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005, 206:277-295.

[47] Subramanian S, Campbell BJ, Rhodes JM. Bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19(5):475484.

[48] Tiede I, Fritz G, Strand S et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003, 111(8):1133-1145.

[49] Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007, 23(4):379-383.

[50] Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998, 115(6):1405-1413.

[51] Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004, 127(2):412-421.

[52] Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002, 122(1):44-54.

[53] Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 2001, 10(5):445-56.

[54] Pagès F, Lazar V, Berger A et al. Analysis of interleukin-18, interleukin-1 converting enzyme (ICE) and interleukin-18-related cytokines in Crohn's disease lesions. *Eur Cytokine Netw* 2001, 12(1):97-104.

[55] Autschbach F, Giese T, Gassler N et al. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002, 441(5):500-513.

[56] Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K et al. TNF-α and IFN-γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003, 124(4):10011009.

[57] Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002, 122(7):19872000.

[58] Rogler G, Brand K, Vogl D et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998, 115(2):357-369.

[59] Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach F et al. S3 Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“. Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 2008, 46(9):1094-1146.

[60] Wehling M (Hrsg.). Klinische Pharmakologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2005, 1. Auflage.

[61] Visekruna A, Joeris T, Seidel D et al. Proteasome-mediated degradation of IκBα and processing of p105 in Crohn's disease and ulceratice colitis. *J Clin Invest* 2006, 116(12):3195-3203.

[62] Brosius F. SPSS 12. Mitp-Verlag Bonn, 2004, 1. Auflage.

[63] Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002, 347(6):417-429.

[64] Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62(12):1297-1307.

[65] Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. The role of defensins in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol* 2004, 42(2):333-338.

[66] Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohns diseas are associated with diminished mucosal α-defensin expression. *Gut* 2004, 3(11):1658-1664.

[67] Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leucoc Biol* 2005, 77(4):460-465.

[68] Cunliffe RN, Mahida YR. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* 2004, 75(1):49-58.

[69] Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 1999, 45(6):911-915.

[70] Fahlgren A, Hammarström S, Danielsson Å, Hammarström ML. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003, 131(1):90-101.

[71] Folwaczny C, Glas J, Török HP. Crohn's disease: an immunodeficiency? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003, 15(6):621626.

[72] Wehkamp J, Salzman NH, Porter E et al. Reduced paneth cell α-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(50):18129-18134.

[73] Salzman NH, Polin RA, Harris MC et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Ped Res* 1998, 44(1):20-26.

[74] Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998, 452(5):1247-1258.

[75] O'Neil DA, Cole SP, Martin-Porter E et al. Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun* 2000, 68(9):5412-5415.

[76] Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995, 267(5204):1645-1648.

[77] Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M. Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94(16):8686-8690.

[78] Grupp A, Kimmel M, Fritz P et al. The expression patterns of peritoneal defensins. *Perit Dial Int* 2007, 27(6):654-662.

[79] Frye M, Bargon J, Lembcke B, Wagner TO, Gropp R. Differential expression of human α- and β-defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. *Eur J Clin Invest* 2000, 30(8):695-701.

[80] Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. Inducible and constitutive β-defensins are differentially expressed in Crohns disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003, 9(4):215223.

[81] Wehkamp J, Schwind B, Herrlinger KR et al. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial α-defensins. *Dig Dis Sci* 2002, 47(6):1349-1355.

[82] Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR et al. Human β-defensin 2 but not β-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, 14(7):745-752.

[83] Fahlgren A, Hammarström S, Danielsson Å, Hammarström ML. β-defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2004, 137(2):379-385.

[84] Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 2008, 57(7):903-910.

[85] Kelly P, Feakins R, Domizio P et al. Paneth cell granule depletion in the human small intestine under infective and nutritional stress. *Clin Exp Immunol* 2004, 135(2):303-309.

[86] Wehkamp J, Wang G, Kübler I et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007, 179(5):3109-3118.

[87] Batlle E, Henderson JT, Beghtel H et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002, 111(2):251-263.

[88] van Es JH, Jay P, Gregorieff A et al. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 2005, 7(4):381-386.

[89] Regueiro MD. Update in medical treatment of Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2000, 31(4):282291.

[90] Hoult JR, Moore PK. Effects of sulphasalazine and its metabolites on prostaglandin synthesis, inactivation and actions on smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1980, 68(4):719730.

[91] MacDermott RP, Schloemann SR, Bertovich MJ, Nash GS, Peters M, Stenson WF. Inhibition of antibody secretion by 5-aminosalicylic acid. *Gastroenterology* 1989, 96(2 Pt 1):442448.

[92] Stevens C, Lipman M, Fabry S et al. 5-Aminosalicylic acid abrogates T-cell proliferation by blocking interleukin-2 production in peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, 272(1):399406.

[93] Bos CL, Diks SH, Hardwick JC, Walburg KV, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Protein phosphatase 2A is required for mesalazine-dependent inhibition of Wnt/β-catenin pathway activity. *Carcinogenesis* 2006, 27(12):2371-2382.

[94] Witthöft T, Pilz CS, Fellermann K, Nitschke M, Stange EF, Ludwig D. Enhanced human beta-defensin-2 (hBD-2) expression by corticosteroids is independent of NF-κB in colonic epithelial cells (CaCo2). *Dig Dis Sci* 2005, 50(7):1252-1259.

[95] Wahl Ch, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998, 101(5):1163-1174.

[96] Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995, 270(5234):286-290.

[97] Brattsand R, Linden M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1996, 10 Suppl 2:81-90.

[98] Angeli A, Masera RG, Sartori ML et al. Modulation by cytokines of glucocorticoid action. Ann NY Acad Sci 1999, 876:210220.

[99] Rogler G, Meinel A, Lingauer A et al. Glucocorticoid receptors are downregulated in inflamed colonic mucosa but not in peripheral blood mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 1999, 29(4):330-336.

[100] Duits LA, Rademaker M, Ravensbergen B et al. Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 , 280(2):522-525.

[101] Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA. Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-κB transcription factor family. *J Immunol* 2002, 168(1):316-324.

[102] Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002, 106(4):517-525.

[103] Schlapbach C, Yawalkar N, Hunger RE. Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa. *J Am Acad Dermatol* 2009, 61(1):58-65.

[104] Moutsopoulos NM, Greenwell-Wild T, Wahl SM. Differential mucosal susceptibility in HIV-1 transmission and infection. *Adv Dent Res* 2006, 19(1):52-56.

A Anhang

A.1 Protokoll der Gewebeasservation

1. Gewebevorbereitung
    - Waschen des Gewebes in 0,9%iger Kochsalzlösung
    - Zurechtschneiden des Gewebes auf einbettgerechte Größe
    - gegebenenfalls Spannen des Gewebestückes auf eine Korkunterlage zur Schleimhautstraffung
2. Gewebefixation
    - Einlegen des Gewebestückes in 10%ige Formalinlösung für mindestens 24 h
3. Gewebenachbereitung
    - Entfernen der Korkunterlage
    - Nachschneiden der Geweberänder für glatte Schnittkanten
    - Einlegen des Gewebestückes in größengerechte Einbettkassette
4. Maschinelle Gewebeentwässerung und -paraffinierung im Shandon Hypercenter™ XP
    - 2,5 h 10% Formalinlösung
    - 45 min 70% Alkohol
    - 1 h 80% Alkohol
    - 45 min 96% Alkohol
    - 40 min 96% Alkohol
    - 50 min 100% Alkohol
    - 1 h 100% Alkohol

- 45 min Aceton
- 1 h Aceton
- 1,5 h Paraffin
- 2 h Paraffin

5. Einbetten der paraffinierten Gewebestücke in Paraffin
6. Lagerung des konservierten Gewebes bei +4°C

A.2 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Entparaffinieren
   - 2 x 5 min Xylol
   - 2 min 100% Alkohol
   - 2 min 96% Alkohol
   - 2 min 70% Alkohol
   - 2 min Aqua dest.
2. 6 min Tauchen in Hämatoxylin zur Färbung saurer Strukturen
3. 6 min Bläuen in Leitungswasser
4. 4 min Tauchen in Eosin zur Färbung basischer Strukturen
5. Entwässern
   - Abspülen in Aqua dest.
   - Abspülen in 70% Alkohol
   - Abspülen in 96% Alkohol
   - 2 min 100% Alkohol
   - 5 min Xylol
6. Eindecken
7. Trocknen der Objektträger über Nacht bei RT
8. Lagerung der Objektträger bei RT

A.3 Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

1. Entparaffinieren
    - 2 x 5 min Xylol
    - 2 x 5 min 100% Alkohol
    - 1 x 5 min 96% Alkohol
    - 1 x 5 min 70% Alkohol
    - 2 x 5 min Aqua dest.
2. Kochen der Schnitte in 0,68%iger EDTA-Lösung (0.5 M, pH 8)
    - bei 600 W bis zum Sieden
    - danach 2,5 min bei 200 W weiterkochen
    - anschließend 20 min abkühlen
3. Herstellen der feuchten Kammer
4. Mehrmaliges Waschen der Objektträger in Aqua dest.
5. Präparation der Objektträger
    - Beschriftung
    - Umrundung der Schnitte mit DakoCytomation® Pen
    - Beträufeln der Schnitte mit PBS (immer feucht halten!)
6. Fc-Rezeptor-Blocking (24G2 3,6 mg OK2 / ml PBS)
    - 1:50-Verdünnung
    - Inkubation 20 min bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
    - 2 x 5 min in PBS waschen
7. Blocking der Sekundärantikörperspezies-Antigene mit 10%igem Serum (0,05% Tween 20 PBS)
    - Pferdeserum bei Färbung mit Donkey-anti-goat- und Donkey-anti-mouse-Ak (α5-Defensin und α6-Defensin-Färbung), Pferde- und Ziegenserum bei Färbung mit Goat-anti-rabbit- und Donkey-anti-mouse-Ak (β2-Defensin-Färbung)

- Inkubation 20 min bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
- nicht mit PBS waschen, sondern nur abschütten!

8. 1. Primärantikörper: Defensin-Markierung
   - für Anti-HDA5 & Anti-HDA6: $c_{(Aliquots)}$ = 1 mg / ml, benötigte c = 20 μ g / ml $\Rightarrow$ 1:50-Verdünnung
   - für Anti-HBD2: $c_{(Aliquots)}$ = 0,5 mg / ml, benötigte c = 20 μg / ml $\Rightarrow$ 1:25-Verdünnung
   - Negativkontrolle mit PBS
   - Inkubation ber Nacht bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
   - 2 x 5 min in PBS waschen
9. 1. Sekundärantikörper: Markierung mit Carbocyanin (Cy™2)
   - Goat-anti-rabbit bei HDA5- & HDA6-Färbung
   - Donkey-anti-goat bei HBD2-Färbung
   - $c_{(Aliquots)}$ = 1.5 mg / ml, benötigte c = 5 μg / ml $\Rightarrow$ 1:300-Verdünnung
   - Inkubation 45 min im Dunkeln bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
   - 2 x 5 min in PBS waschen
10. 2. Primärantikörper: Entzündungszell-Markierung
    - Anti-CD4, Anti-CD8 & Anti-CD68 = murine Ak
    - $c_{(Aliquots)}$ = 1 mg / ml, benötigte c = 20 μg / ml $\Rightarrow$ 1:50-Verdünnung
    - Negativkontrolle mit PBS
    - Inkubation 2 h im Dunkeln bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
    - 2 x 5 min in PBS waschen
11. 2. Sekundärantikörper: Markierung mit Indocarbocyanin (Cy™3)
    - Donkey-anti-mouse
    - $c_{(Aliquots)}$ = 1,4 mg / ml, benötigte c = 4,5 - 5 μg / ml $\Rightarrow$ 1:300-Verdünnung
    - Inkubation 45 min im Dunkeln bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
    - 2 x 5 min in PBS waschen

12. Zellkern-Markierung mit DAPI

    - $c_{(Aliquots)}$ = 1 mg / ml, benötigte c = 0,5 μg / ml $\Rightarrow$ 1:2000-Verdünnung
    - Inkubation 5 min im Dunkeln bei RT (pro Schnitt 100μl Benetzungsflüssigkeit)
    - 3 x 5 min in PBS waschen
    - 3 x spülen mit Aqua dest.

13. Eindecken in wasserlöslichem Medium

14. Trocknen der Objektträger im Dunkeln über Nacht bei RT

15. Lagerung der Objektträger im Dunkeln bei +4°C

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich im Laufe der letzten Jahre bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.
Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Dr. A.J. Kroesen für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, die finanzielle Realisierung des Projektes, seine Diskussionsbereitschaft sowie die vielen Anregungen und Hilfestellungen bei der Erstellung der Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. H.-J. Buhr sowie Herrn Prof. M. Fromm für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im jeweiligen Forschungslabor.
Bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau N. Slavova für ihre stetige Begleitung und Motivation.
Ich danke Frau D. Oberbeck-Müller für ihre Anleitung beim Erlernen der Immunfärbemethoden. Sie war immer eine hilfsbereite Ansprechpartnerin. Herrn J.F. Richter danke ich für die Einweisung und die vielen Hilfestellungen am Fluoreszenz- bzw. konfokalen Lasermikroskop.
Mein Dank gilt weiterhin Frau S. Dullat, Frau B. Hotz und Herrn M. Arndt, die mir bei Problemen und Aufgaben jeglicher Art immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Frau U. Erben danke ich für ihre Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, Herrn S. Högel für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.
Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. C. Loddenkemper für die histopathologische Bestimmung des Entzündungsgrades.

Besonders bedanken möchte ich bei meinen Eltern für ihre jahrelange Unterstützung.
Mein größter Dank kommt Sascha und Deike zu, die mir mit ihrer unermüdlichen Motivation und Hilfsbereitschaft immer zur Seite gestanden haben. Ohne die vielen kreativen Vorschläge und Hilfestellungen sowie die konstruktive Kritik hätte ich diese Arbeit nicht fertig stellen können.

Lebenslauf

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

Publikationen

Vorträge

M. Vorwerk

Nachweis und Quantifizierung Defensin-positiver Zellen im subepithelialen Ileum von Morbus Crohn-Patienten unter immunsuppressiver Therapie.

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, Mai 2009

Poster

M. Vorwerk, N. Slavova, H.-J. Buhr, A.J. Kroesen

Defensin expression in the mucosal infiltrate of patients with Crohn's disease under immunosuppressive therapy.

Inflammatory Barrier Disease Meeting, Kiel, Juli 2007

M. Vorwerk, N. Slavova, C. Loddenkemper, H.-J. Buhr, A.J. Kroesen

Defensin expression in the mucosal infiltrate of patients with Crohn's disease under immunosuppressive therapy.

Jahrestagung der European Society of Coloproctology, Malta, September 2007

M. Vorwerk, N. Slavova, C. Loddenkemper, H.-J. Buhr, A.J. Kroesen

Defensinexpression im entzündlichen Infiltrat der Darmwand bei Morbus Crohn-Patienten unter immunsuppressiver Therapie.

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

Erklärung

„Ich, Maja Vorwerk, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Nachweis und Quantifizierung Defensin-positiver Zellen im subepithelialen Ileum von Morbus Crohn-Patienten unter immunsuppressiver Therapie* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Berlin, 26.1.2010