

Aus der Medizinischen Klinik
für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekt von Makrophagen-Subpopulationen
auf die intestinale Barriere**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. univ.
Donata Clara Lissner
aus München

Datum der Promotion: 06.09.2019

Vorwort

Teilweise wurden die Ergebnisse der Experimente der hier vorliegenden Dissertation bereits vorab in folgender Publikation (Originalarbeit) veröffentlicht:

- **Lissner D**, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kühl AA, Erben U, May C, Schulzke JD, Siegmund B. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Jun;21(6):1297-305. doi: 10.1097/MIB.0000000000000384.

Die Abbildung 2 dieser Monographie wurde außerdem vorab in folgender Publikation (Review) veröffentlicht:

- **Lissner D**, Siegmund B. The multifaceted role of the inflammasome in inflammatory bowel diseases. *ScientificWorldJournal.* 2011 Jul 28;11:1536-47. doi: 10.1100/tsw.2011.139.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ASC | <i>Apoptotic speck-like protein containing a CARD</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| CARD | <i>Caspase recruitment domain</i> |
| CBA | <i>Cytometric bead arrays</i> |
| CCL | CC-Chemokinligand |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CED | Chronisch entzündliche Darmerkrankungen |
| CU | Colitis ulcerosa |
| DAMPs | <i>Danger-associated molecular patterns</i> |
| DAPI | <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSS | Natrium-Dextransulfat |
| E-Cad | E-Cadherin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FACS | Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>) |
| FBS | Fötales Rinderserum |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| GI | Gastrointestinal |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| HNF4 α | <i>Hepatocyte nuclear factor 4α</i> |
| hpf | <i>High power fields</i> |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| IBD | <i>Inflammatory bowel disease</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IFN | Interferon |
| iNOS | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase |
| JAM | <i>Junctional adhesion molecule</i> |

| | |
|---------------|--|
| Ktrl | Kontrolle |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LSM | <i>Laser scanning microscope</i> |
| M-CSF | <i>Macrophage-colony stimulating factor</i> |
| MACS | Magnetische Zelltrennung (<i>magnetic-activated cell separation</i>) |
| MAGI2 | <i>Membrane-associated guanylate kinase inverted 2</i> |
| MC | Morbus Crohn |
| MFI | Durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (<i>mean fluorescence intensity</i>) |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| Mo | Monozyten |
| MPS | Mononukleäres Phagozyten-System |
| NF κ B | <i>Nuclear factor kappa B</i> |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzellen |
| NLRP3 | <i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein3</i> |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOD2 | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i> |
| PAMPs | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PARD3 | <i>Partitioning defective 3</i> |
| PBMC | Periphere mononukleäre Zellen des Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PI | Propidiumiodid |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| PPR | Mustererkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| Rt | Transepithelialer Widerstand |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |

| | |
|--------------|-----------------------------------|
| TER | <i>Transepithelial resistance</i> |
| Th1 | T-Helferzelle Typ 1 |
| Th2 | T-Helferzelle Typ 2 |
| TJ | <i>Tight junction</i> |
| TLR | <i>Toll-like-Rezeptoren</i> |
| TNF α | Tumor Nekrose Faktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan |
| ZO | Zonula occludens |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 8 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| ABSTRACT (DEUTSCH) | 10 |
| ABSTRACT (ENGLISH) | 12 |
| EINLEITUNG | 13 |
| CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN | 13 |
| <i>Epidemiologie und Definition</i> | 13 |
| <i>Pathogenese</i> | 13 |
| <i>Genetik</i> | 13 |
| <i>Umweltfaktoren</i> | 14 |
| <i>Immunobiologie</i> | 15 |
| MAKROPHAGEN IN DER INTESTINALEN ENTZÜNDUNG | 16 |
| <i>Makrophagensubtypen</i> | 16 |
| <i>Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i> | 20 |
| DAS INFLAMMASOM IN DER INTESTINALEN ENTZÜNDUNG | 21 |
| <i>Aufbau und Aktivierungsmechanismen</i> | 21 |
| <i>Inflammasom bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i> | 23 |
| EPITHELIALE BARRIERE | 24 |
| <i>Tight junction-Proteine</i> | 24 |
| <i>Epitheliale Barriere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i> | 25 |
| FRAGESTELLUNG | 27 |
| MATERIALEN UND METHODEN | 28 |
| MATERIALIEN | 28 |
| <i>Chemikalien, Lösungen und Kits</i> | 28 |
| <i>Materialien und Geräte</i> | 30 |
| <i>Gele, Puffer- und Standardlösungen</i> | 31 |
| <i>Medien, Antikörper, Zytokine und Zytokinblockade</i> | 33 |
| <i>Untersuchungsmaterial</i> | 34 |
| METHODEN | 35 |
| <i>Immunhistochemie</i> | 35 |
| <i>Zellpräparation und Zellkultur</i> | 36 |
| <i>Monozyten-Isolierung und Makrophagen-Polarisierung</i> | 36 |
| <i>Stimulation</i> | 37 |
| <i>Co-Kultur von Makrophagen mit Epithelzellen</i> | 37 |
| <i>Epithelzellen und Versuchsaufbau</i> | 37 |
| <i>Messung des transepithelialen Widerstandes</i> | 38 |
| <i>Zytokinbestimmung</i> | 39 |
| <i>Cytometric Bead Array</i> | 39 |
| <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> | 40 |
| <i>Durchflusszytometrie zur Darstellung der Oberflächenantigene</i> | 41 |
| <i>Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie</i> | 41 |
| <i>Western Blot</i> | 42 |
| <i>Statistik</i> | 43 |
| ERGEBNISSE | 44 |
| CHARAKTERISTIKA DER PATIENTENPROBEN | 44 |
| MAKROPHAGEN IN DER LAMINA PROPRIA BEI PATIENTEN MIT CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN DARMERKRANKUNGEN | 44 |
| <i>Makrophagen-Subtypen</i> | 44 |
| <i>Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen</i> | 47 |

| | |
|---|-----------|
| IN-VITRO GENERIERTE MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN..... | 48 |
| <i>Morphologie</i> | 48 |
| <i>Oberflächenmarker</i> | 49 |
| INFLAMMASOM IN MONOZYTEN | 50 |
| MAKROPHAGEN-SUBTYPEN UND EFFEKT AUF DIE EPITHELIALE BARRIERE..... | 54 |
| <i>Epitheliale Integrität</i> | 54 |
| <i>Analyse der Makrophagen vor und nach Co-Kultur</i> | 57 |
| Zytokine im Überstand | 57 |
| Oberflächenmarker | 57 |
| <i>Deregulation von Tight Junction-Proteinen</i> | 60 |
| ZYTOKINBLOCKADE | 63 |
| <i>Blockade von TNFα</i> | 63 |
| <i>Blockade des Inflammasoms</i> | 63 |
| DISKUSSION | 65 |
| MAKROPHAGEN-SUBPOPULATIONEN – ALLES NUR THEORIE? | 66 |
| MAKROPHAGEN UND EPITHELIALE DYSFUNKTION – WAS KOMMT ZUERST? | 68 |
| IN-VITRO CO-KULTUR-MODELL | 71 |
| EPITHELZELLINIEN UND DIE IN VIVO-ÜBERTRAGBARKEIT DER ERGEBNISSE | 72 |
| VERLUST DER EPITHELIALEN INTEGRITÄT - ERKLÄRUNGSMODELLE..... | 73 |
| DER EFFEKT VON INFLIXIMAB AUF DIE INTESTINALE ENTZÜNDUNG | 73 |
| DER EFFEKT DES INFLAMMASOMS AUF DIE INTESTINALE ENTZÜNDUNG | 74 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 76 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 78 |
| EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG..... | 88 |
| LEBENS LAUF | 91 |
| PUBLIKATIONS LISTE | 92 |
| DANKSAGUNG..... | 93 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------------|---|-----------------|
| Abbildung 1. | <u>Makrophagen-Klassifikation.</u> | <u>Seite 19</u> |
| Abbildung 2. | <u>Modell und Aktivierungsmechanismen des Inflammasoms.</u> | <u>Seite 22</u> |
| Abbildung 3. | <u>Co-Kultur von Makrophagen mit Epithelzellen.</u> | <u>Seite 38</u> |
| Abbildung 4. | <u>Makrophagen Subpopulationen in der Lamina propria – Immunhistochemie.</u> | <u>Seite 45</u> |
| Abbildung 5. | <u>Makrophagen Subpopulationen in der Lamina propria - Auswertung.</u> | <u>Seite 46</u> |
| Abbildung 6. | <u>iNOS/CD163 Ratio.</u> | <u>Seite 47</u> |
| Abbildung 7. | <u><i>In-vitro</i>-polarisierte Makrophagen-Subtypen - Morphologie.</u> | <u>Seite 48</u> |
| Abbildung 8. | <u><i>In-vitro</i>-polarisierte Makrophagen-Subtypen - Oberflächenprofil.</u> | <u>Seite 49</u> |
| Abbildung 9. | <u>Inflammasom-abhängige Produktion von IL-1β durch Monozyten <i>in vitro</i> - ELISA</u> | <u>Seite 51</u> |
| Abbildung 10. | <u>Inflammasom-abhängige Produktion von IL-1β durch Monozyten <i>in vitro</i> – Western Blot</u> | <u>Seite 52</u> |
| Abbildung 11. | <u>Inflammasom-abhängige Produktion von IL-1β durch Monozyten und HT-29 <i>in vitro</i> – Western Blot</u> | <u>Seite 53</u> |
| Abbildung 12. | <u>Effekt von Makrophagen-Subtypen auf die epitheliale Barriere – zeitlicher Verlauf.</u> | <u>Seite 55</u> |
| Abbildung 13. | <u>Effekt von Makrophagen-Subtypen auf die epitheliale Barriere nach 54h</u> | <u>Seite 56</u> |
| Abbildung 14. | <u>Zytokinprofil von Monozyten und Makrophagen <i>in vitro</i></u> | <u>Seite 58</u> |
| Abbildung 15. | <u>Effekt der Co-Kultur auf die Makrophagen-Polarisierung</u> | <u>Seite 59</u> |
| Abbildung 16. | <u>Effekt der Monozyten und Makrophagen auf die Expression von ZO-1 und Claudin-2.</u> | <u>Seite 61</u> |
| Abbildung 17. | <u>Effekt der Monozyten und Makrophagen auf die Expression von ZO-1 und JAM-1.</u> | <u>Seite 62</u> |
| Abbildung 18. | <u>Effekt von Zytokin-Antagonisierung auf den Monozyten- / Makrophagen-vermittelten Epithelschaden.</u> | <u>Seite 64</u> |
| Abbildung 19. | <u>Modell der intestinalen Entzündung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.</u> | <u>Seite 77</u> |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----------------|
| Tabelle 1. <u>Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.</u> | <u>Seite 28</u> |
| Tabelle 2. <u>Verwendete Materialien und Geräte.</u> | <u>Seite 30</u> |
| Tabelle 3. <u>Gele, Puffer und Standardlösungen.</u> | <u>Seite 31</u> |
| Tabelle 4. <u>Verwendete Medien.</u> | <u>Seite 33</u> |
| Tabelle 5. <u>Verwendete Antikörper.</u> | <u>Seite 33</u> |
| Tabelle 6. <u>Verwendete rekombinante Zytokine.</u> | <u>Seite 34</u> |
| Tabelle 7. <u>Zytokinblockade.</u> | <u>Seite 34</u> |

Abstract

Abstract (Deutsch)

Einleitung. Makrophagen sind von entscheidender Bedeutung in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED). Sie werden in ein Spektrum eingeteilt, das von pro- bis hin zu anti-inflammatorischen Makrophagen reicht. Neben dem inflammatorischen Zellinfiltrat der Lamina propria stellt die Störung der epithelialen Barriere einen weiteren zentralen Pathomechanismus der CED-Entstehung dar. Ziel dieser Arbeit war es, den spezifischen Effekt von Makrophagen-Subpopulationen auf die epitheliale Barriere zu untersuchen.

Methodik. Durch Immunhistochemie an intestinalen Resektionspräparaten wurde das Vorkommen von Makrophagen-Subpopulationen in der Mukosa des entzündeten Darms bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa quantifiziert und mit gesunden Kontrollen verglichen. Humane CD14⁺ Zellen des peripheren Bluts wurden *in vitro* in pro- bzw. anti-inflammatorische Makrophagen polarisiert und der Einfluss dieser Subtypen sowie von Monozyten als Kontrollpopulation auf verschiedene Epithelzelllinien (Caco-2, T84, HT-29/B6) mittels Widerstandsmessungen analysiert. Die Epithelzellen wurden anschließend durch Immunfluoreszenzfärbungen weiter charakterisiert. Zytokinkonzentrationen im Überstand wurden mittels „*cytometric bead array*“ und *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. Eine Inhibition von Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , Interleukin (IL)-1 β und IL-18 wurde durch Verwendung spezifischer Antikörper bzw. Rezeptor-Antagonisten erreicht.

Ergebnisse. Sowohl bei Patienten mit Morbus Crohn als auch mit Colitis ulcerosa fand sich eine massive Invasion der pro-inflammatorischen CD68⁺/iNOS⁺/TNF α ⁺-Makrophagen in die Lamina propria des entzündeten Darms. So verschob sich die Balance der Makrophagen in Richtung des pro-inflammatorischen Subtyps, wobei dieser Effekt beim Morbus Crohn am stärksten ausgeprägt war. *In-vitro* polarisierte pro-inflammatorische Makrophagen führten zu einem Widerstandsverlust und somit zu einer Störung der epithelialen Integrität von Caco-2, T84 und HT29/B6 Zellen, was durch Stimulation von *Toll-like*-Rezeptoren mit Lipopolysaccharid nochmals verstärkt wurde. Mechanistisch ist dies durch parazelluläre Leckage mittels deregulierter *tight junction*-Proteine zu erklären: Vor allem das porenbildende Claudin-2 wurde nach Co-Kultur mit den pro-inflammatorischen Makrophagen vermehrt an der Epithelzellmembran

exprimiert. Ferner kam es zu einer Umverteilung von *tight junction*-Proteinen innerhalb der Zelle. Die pro-inflammatorischen Makrophagen waren charakterisiert durch eine hohe Expression von $\text{TNF}\alpha$. Daher konnte der vermittelte Epithelschaden effektiv durch die Inhibition von $\text{TNF}\alpha$ durch Infliximab reduziert werden. Der Monozyten-induzierte Epithelschaden hingegen ließ sich durch IL-1-Rezeptor- Inhibition bzw. einen spezifischen Antikörper gegen IL-18 effektiv antagonisieren.

Schlussfolgerung. Pro-inflammatorische Makrophagen, die die Lamina propria von CED-Patienten infiltrieren, beeinträchtigen die epitheliale Barriere durch Deregulation von *Tight Junction*-Proteinen. Durch Zytokin-Blockade kann dies effektiv antagonisiert werden, wodurch einer Chronifizierung der Entzündung entgegengewirkt werden kann.

Abstract (English)

Background. Macrophages are key players in inflammatory bowel disease (IBD). They can be classified into pro- and anti-inflammatory macrophages. Besides inflammatory cell infiltrates in the lamina propria of the gut, intestinal barrier dysfunction is a main feature of the pathogenesis of IBD. Hence, the aim of this study was to determine the specific effect of macrophage subtypes on epithelial barrier.

Methods. The presence of macrophage subtypes in intestinal resection specimens of IBD patients was visualized by immunohistochemistry and compared to healthy controls. Human peripheral blood CD14⁺ cells were polarized into either pro- or anti-inflammatory macrophages *in vitro*. The influence of these subtypes and monocytes as control population on epithelial cell layers (Caco-2, T84, HT-29/B6) was analyzed using resistance measurements. Epithelial cells were then further examined by immunofluorescence staining. Cytokine concentrations were quantified applying cytometric bead array and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Inhibition of TNF α , IL-1 β and IL-18 was achieved by specific antibodies or receptor antagonists.

Results. A massive invasion of pro-inflammatory CD68⁺/iNOS⁺/TNF α ⁺ macrophages into the lamina propria of the inflamed intestine occurred in IBD patients, predominantly in Crohn's disease, thereby shifting the balance of macrophages to a pro-inflammatory state. *In-vitro* polarized pro-inflammatory macrophages caused a significant loss of epithelial resistance and thus integrity of Caco-2, T84 and HT29/B6 cell layers. This was further amplified by toll-like receptor stimulation via addition of LPS. The mechanism was paracellular leakage through deregulation and/or redistribution of tight junction proteins, most notably claudin-2, caused by monocytes and pro-inflammatory macrophages. Pro-inflammatory macrophages were characterized by a dominant production of TNF α . Consequently, the epithelial damage mediated by this cell population was effectively reduced via inhibition of TNF α through infliximab. Monocyte-mediated damage was antagonized by inhibition of the inflammasome effector cytokines IL-1 β and IL-18.

Conclusion. Pro-inflammatory macrophages, as found in the lamina propria of IBD patients, disrupt the epithelial barrier through deregulation of tight junction proteins. This can effectively be antagonized by cytokine inhibition.

Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Epidemiologie und Definition

Die Erkrankungen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) zählen zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Inzidenz in Mitteleuropa liegt für den MC etwa bei 6 bzw. für die CU etwa bei 4 pro 100.000 Einwohnern, wobei sie in den industrialisierten Ländern stetig zunimmt [1-3]. Das Erkrankungsalter betrifft in den meisten Fällen die zweite und dritte Lebensdekade. Beide Erkrankungen sind durch eine chronische, in Schüben auftretende Entzündung von Teilen des Gastrointestinal (GI)-Traktes gekennzeichnet, wobei die Inflammation beim MC den gesamten Bereich vom Mund bis zum After betreffen kann. Hier ist ein segmentaler, diskontinuierlicher Befall charakteristisch; häufig findet man perianale, interenterische, enterokutane, enterovesikale oder enterovaginale Fisteln. Histologisch ist der MC durch eine transmurale Entzündung mit Granulombildung gekennzeichnet [4]. Bei der CU hingegen findet sich eine kontinuierliche Entzündung des Kolons, die immer das Rektum und in variablem Ausmaß das weiter proximal gelegene Kolon betrifft [2]. Eine seltene Ausnahme ist hier die „*Backwash-Ileitis*“, bei der auch das terminale Ileum involviert ist. Histologisch findet man ein auf die Mukosa und Submukosa beschränktes inflammatorisches Zellinfiltrat mit Kryptenabszessen und Becherzellverlust [2].

Pathogenese

Genetik

Die Pathogenese beider Erkrankungen ist multifaktoriell und ein Zusammenspiel aus intrinsischen und extrinsischen Risikofaktoren. Eine genetische Prädisposition ist unumstritten: Eine positive Familienanamnese stellt den größten unabhängigen Risikofaktor zur Entwicklung einer CED dar. Genetische Faktoren spielen beim MC eine deutlich größere Rolle als bei der CU: Verwandte ersten Grades haben bei dieser Entität ein bis zu 20-fach erhöhtes Risiko, ebenfalls zu erkranken [5, 6]. Die Konkordanz-Raten bezüglich Erkrankungsart, Erkrankungsmuster und Vorhandensein von extraintestinalen Manifestationen betragen 75-80% [7]. Der eindeutigste Beweis für die herausragende Bedeutung der genetischen Prädisposition ergibt sich aus Zwillings-

Studien, in denen eine Konkordanz von 37,3% bei monozygoten Zwillingen und 7% bei dizygoten Zwillingen beschrieben wird [8-10]. Da beide Erkrankungen polygenetisch sind, haben genomweite Untersuchungen mittlerweile viele unterschiedliche Suszeptibilitätsgene identifiziert. Mutationen im *NOD2* Gen (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) auf Chromosom 16 beinhalten dabei das höchste Risiko für die Entwicklung eines Morbus Crohn [11]. *NOD2* (oft auch als *CARD15* für *caspase recruitment domain* bezeichnet) ist ein intrazellulärer Mustererkennungsrezeptor, der mit Fragmenten bakteriellen Peptidoglykans aktiviert werden kann und nachfolgend zu einer Aktivierung des nukleären Faktors κB ($NF\kappa B$) führt. Dieser Prozess ist im Falle einer *NOD2*-Mutation gestört, sodass Mikroben und bakterielle Antigene nicht adäquat erkannt werden können. Verschiedene Mutationen von *NOD2* (1007fs, R702W, G908R) sind mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an einem MC zu erkranken. Mutationen im *NOD2*-Gen sind in bis zu 25% der MC-Patienten nachzuweisen, und deren homozygote Träger haben ein bis zu 40-fach erhöhtes Risiko zu erkranken [12]. *NOD2*-Mutationen sind assoziiert mit jüngerem Erkrankungsalter, ilealem Befallsmuster, fibrostenotischem Verlauf sowie einem erhöhten Risiko für intestinale Operationen [13]. Seit der Identifikation des Risikogens *NOD2* im Jahre 2001 wurden durch Genom-weite Assoziationsstudien über 200 CED-Risikoloci lokalisiert, die eine Beteiligung vieler unterschiedlicher Zellen und Zellfunktionen in der Pathogenese der CED zeigen: Hierzu zählen unter anderem angeborenes und erworbenes Immunsystem, Autophagie, Stress des endoplasmatischen Retikulums, intestinale Barrierefunktion und mikrobielle Abwehr [3, 14-16].

Umweltfaktoren

Die Mehrzahl der CED-Patienten (>85%) hat jedoch keine positive Familienanamnese, so dass auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen müssen. Ein etablierter Risikofaktor für den Morbus Crohn ist Nikotinkonsum, wobei dieser für die CU sogar protektiv zu sein scheint [17]. Als weitere Faktoren werden exzessive Hygienemaßnahmen [18, 19] und vorangegangene gastrointestinale Infektionen angesehen [20]. Diskutiert wurde auch der Einfluss von oralen Kontrazeptiva [21], bestimmten Ernährungsgewohnheiten [22, 23] oder Gestillt-Werden im Säuglingsalter [24, 25], wobei die Datenlage diesbezüglich nicht eindeutig ist.

Immunobiologie

Die intestinale Entzündung bei CED ist das Resultat verschiedener defekter Regulationsmechanismen. Bei der Pathogenese spielt sowohl eine immunologische als auch eine mikrobielle Dysregulation eine Rolle, wobei diese durch Umweltfaktoren in genetisch suszeptiblen Patienten ausgelöst werden. Man nimmt an, dass die Inflammation unter anderem aus einer unangemessenen Immunantwort auf die natürliche Flora des Darmes resultiert [26], dass das Mikrobiom selbst jedoch auch pathologisch verändert ist [15, 27]. Von Geburt an und insbesondere in den ersten zwei bis drei Lebensjahren erfolgt die mikrobielle Kolonisation des Darmes; in dieser Zeit entwickelt sich auch das intestinale Immunsystem und die orale Toleranz. Ist die mikrobielle Kolonisation gestört, resultiert dies in einem Mangel an regulatorischen Makrophagen im Darm [28]. Das intestinale Immunsystem muss harmlose Antigene und symbiotische Bakterien von infektiösen oder toxischen Stoffen unterscheiden. Bei CED-Patienten findet sich eine veränderte Komposition des Mikrobioms im Vergleich zur gesunden Bevölkerung, sodass ein Ungleichgewicht zwischen protektiven kommensalen Bakterien und potentiellen Pathogenen entsteht [27, 29, 30]. Das Epithel bildet die physikalische Grenze zwischen Organismus und Außenwelt. Eine intakte Barriere hängt von einem lückenlosen intestinalen Epithel und dem darüber liegenden, funktionsfähigen Mukus ab, in den kommensale Mikroben eingebettet sind. Bei MC-Patienten treten vermehrt Defekte in Paneth-Zellen auf, einer Zellreihe, die normalerweise das intestinale Epithel des Dünndarms aufrechterhält. Diese Defekte sind mit einem aggressiveren MC-Verlauf assoziiert [14]. Auch die Mukusproduktion ist bei CED-Patienten gestört [31]. Mukosale α -Defensine, die eine wichtige antibakterielle Funktion innehaben, werden beim MC vermindert exprimiert, was ebenfalls mit *NOD2*-Mutationen assoziiert ist [32]. Diese Mutation ist insbesondere für Zellen des angeborenen Immunsystems von Bedeutung. Das angeborene Immunsystem bedient sich sogenannter Mustererkennungsrezeptoren, die evolutionär konserviert sind und stereotype mikrobielle Produkte oder Mikroben-assoziierte molekulare Muster wie Lipopolysaccharid (LPS) oder Peptidoglykane erkennen. Wichtige Mustererkennungsrezeptoren sind die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), deren Bindung eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert und letztendlich häufig in der Induktion von inflammatorischen Zytokinen, z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , resultiert. In der Abwesenheit von Pathogenen trägt die TLR-Interaktion mit kommensalen Mikroben zur

Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase bei [33]. CED-Patienten weisen Veränderungen in der TLR-Expression auf: TLR3 ist bei aktivem MC signifikant herunter reguliert, wohingegen TLR4 deutlich vermehrt exprimiert wird [34]. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und dendritische Zellen, erkennen durch dysfunktionale Mustererkennungsrezeptoren kommensale Mikroben und induzieren fälschlicherweise eine T-Helferzell (Th)1-getriebene Immunantwort [35]. Bei CED-Patienten finden sich zudem atypische Antigen-präsentierende Zellen wie Epithelzellen, die dann zu potenten T-Zell-Aktivatoren werden [36]. CED-Patienten haben defekte Beseitigungsmechanismen für über- oder autoreagible T-Zellpopulationen [37] und eine Dysbalance zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen in Richtung der pro-inflammatorischen Effektorzellen [38]. Ferner finden sich erhöhte Mengen an zirkulierenden B-Zellen und Autoantikörpern bei CED-Patienten [39].

Makrophagen in der intestinalen Entzündung

Makrophagensubtypen

Makrophagen (von altgriechisch μακρός = “groß” und φάγειν = “essen”) sind Zellen des angeborenen Immunsystems aus der myeloiden Reihe der Leukozyten, die Bestandteil des mononukleären Phagozyten-System (MPS) sind und diverse Funktionen zur Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus erfüllen, zum Beispiel Pathogen-Elimination, Phagozytose von Zelldetritus oder Wundheilung [40]. Sie stellen darüber hinaus als potente antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Verbindung zum erworbenen Immunsystem dar. Vorläuferzellen des mononukleären Phagozyten-System sind zirkulierende charakteristischerweise *cluster of differentiation* (CD)14⁺-Monozyten [28, 41]. Diese werden im Knochenmark aus myeloischen Vorläuferzellen gebildet und zirkulieren einige Tage im Blut, bis sie durch entsprechende Stimuli, die Chemokine, aus dem Gefäßsystem ins Gewebe gelockt werden (Extravasation), um dort je nach Gewebs-spezifischem Zytokin-Milieu in Makrophagen auszudifferenzieren [28]. Neben diesem aus Monozyten stammenden Makrophagen-Pool sind auch gewebsresidente Makrophagen beschrieben, die nicht von zirkulierenden, aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgegangenen Monozyten, sondern aus embryonalem Gewebe, zum Beispiel dem Dottersack, abstammen [42].

Makrophagen wurden - ursprünglich angelehnt an die Klassifikation der T-Zellen – in verschiedene Subpopulationen mit jeweils charakteristischen Funktionen grob in zwei Subtypen eingeteilt: zum einen pro-inflammatorische, sogenannte M1-Makrophagen, und zum anderen regulatorische, sogenannte M2-Makrophagen [41, 43-45]. Die aktuelle Makrophagen-Nomenklatur ist dabei nicht ganz einheitlich, was zum einen an unterschiedlichen Klassifizierungsstrategien liegt, zum anderen aber auch an der ausgeprägten funktionellen Plastizität, die die Makrophagen je nach umgebenden Mikromilieu aufweisen und die es ihnen erlaubt, sich optimal an die jeweilige Umgebung anzupassen. Die Unterteilung in M1- und M2-Makrophagen ist damit deutlich vereinfacht, es muss vielmehr von einem breiten Spektrum von unterschiedlichen Makrophagen-Subtypen ausgegangen werden, bei dem die M1- und M2-Makrophagen die beiden Extreme darstellen. In dieser Arbeit soll dennoch von den beiden Extremformen ausgegangen werden, die daher im Folgenden auch als M1 und M2 bezeichnet werden.

Durch Stimulation unter anderem mit LPS und Interferon (IFN)- γ wird ein M1- Phänotyp favorisiert (**Abbildung 1**) [46]. Diese M1-Makrophagen sind involviert in die akute Entzündungsreaktion, die Pathogen- und Tumor-Abwehr, die Anlockung weiterer Leukozyten, wie z.B. neutrophiler Granulozyten, und führen zu einer Gewebszerstörung. Sie sind befähigt zur Phagozytose und Antigenpräsentation, produzieren charakteristischerweise große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen, unter anderem TNF α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-12 und IL-23, Effektormoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS), und aktivieren die Immunantwort durch Th1-Zellen [41].

M2-Makrophagen hingegen spielen eine Rolle in der chronischen Entzündung und der Gewebserneuerung durch extrazelluläre Matrixproteine. Eine Polarisierung in die M2-Richtung wird z.B. durch IL-4 und IL-13 begünstigt [46]. Aufgrund ihrer proliferativen Wirkung üben sie auch einen tumorpromovierenden Effekt aus; so ist ihr Auftreten mit einer schlechteren Prognose bei z.B. Melanomen [47] oder Brustkrebs [48] verbunden. Bei intestinalen Tumoren scheinen Tumor-assoziierte Makrophagen, die dem M2-Phänotyp ähneln, jedoch einen inversen Effekt zu haben. So sind sie mit einer besseren Prognose beim Kolon- [49] und Magen-Karzinom [50] assoziiert. Sie exprimieren vorrangig anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, außerdem Scavenger-, Mannose- und Galactose-Rezeptoren und aktivieren die Immunantwort durch T-Helferzellen Typ 2

(Th2) [41]. Da die M2-Makrophagen ein breites Spektrum an Aktivierungsgraden aufweisen, wurde ihre weitere Unterteilung in M2a, b und c vorgeschlagen [46]. Demnach üben M2a-Makrophagen vorrangig eine reparierende und zellproliferative Wirkung aus, M2b-Makrophagen weisen einen vermehrt pro-inflammatorischen Phänotyp auf, und M2c-Makrophagen sind durch ihre ausgeprägte Endozytose-Fähigkeit vor allem für das Abräumen von Zell- und Matrixtrümmern zuständig. Auch hier ist die pragmatische Unterteilung in die verschiedenen Subtypen vor dem Hintergrund einer vereinfachten *in-vitro*-Forschung zu werten, wobei die Subtypen *in vivo* vielmehr einem breiten Spektrum entsprechen und eine enorme biologische Plastizität und Wandelbarkeit aufweisen.

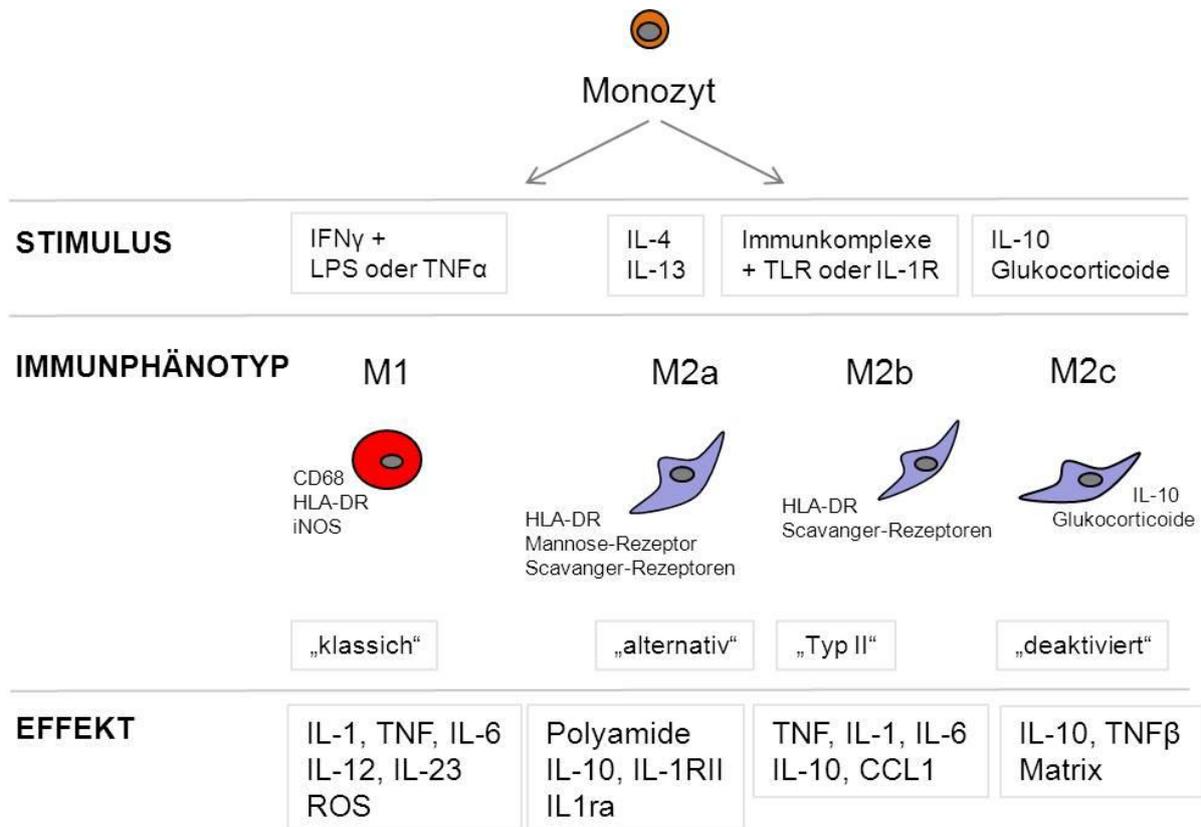


Abbildung 1. Makrophagen-Klassifikation.

Aus den undifferenzierten Monozyten entstehen – je nach Stimulus im umgebenden Milieu – verschiedene Makrophagen-Subpopulationen, die anhand der Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokin-Produktion unterschieden werden können. Innerhalb des M2-Phänotyps unterscheidet man drei Untertypen (M2a, b und c). CCL = CC-Chemokinligand, CD = *Cluster of differentiation*, HLA = humanes Leukozytenantigen, IL = Interleukin, INF = Interferon, iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase, LPS = Lipopolysaccharid, ROS = *reactive oxygen species*, TNF = Tumor Nekrose Faktor, TLR = *Toll-like*-Rezeptor, Nach: Martinez et al [46].

Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Im gesamten GI-Trakt aller Säugetiere finden sich auch im nicht-entzündeten Stadium Makrophagen; diese befinden sich sowohl in der Mukosa als auch in der Submukosa [51]. Sie sind essentiell für Aufrechterhaltung der lokalen Homöostase und der Balance zwischen symbiotischem Mikrobiota und Organismus. Im Rahmen einer intestinalen Entzündung verändert sich jedoch der Phänotyp der residenten intestinalen Makrophagen dramatisch: Sie weisen eine höhere Expression von TLR, CD14, kostimulatorischen Molekülen und anderen pro-inflammatorischen Rezeptoren auf [52, 53]. Die phagozytäre und bakterizide Fähigkeit der Zellen wird durch Faktoren aus dem umgebenden Stroma erhöht [52]. Diese Makrophagen sind auch in der Lage, große Mengen an Entzündungsmediatoren, also TNF α , IL-1, IL-6, NO, ROS und Metalloproteasen, zu sezernieren [54-56]. Somit scheinen inflammatorische Makrophagen und hier insbesondere das Gleichgewicht der Makrophagen-Subtypen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der CED zu spielen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer gestörten Makrophagen-Polarisierung in Richtung M2-Phänotyp eine deutlich höhere Suszeptibilität gegenüber einer Natrium-Dextransulfat (DSS)-induzierten Colitis aufweisen als gesunde Mäuse [57]. Infolgedessen führt eine Re-Injektion von *in-vitro* generierten murinen M2-Makrophagen wieder zu einer Verbesserung der chemisch induzierten Colitis [58]. Auch humane Untersuchungen weisen auf eine bedeutende Rolle der Makrophagen-Polarisation hin: Die klinisch erfolgreich eingesetzten TNF α -Antikörper Infliximab und Adalimumab führen *in vitro* zu einer Induktion des regulatorischen M2-Phänotyps [59]. Folglich findet man auch *in vivo* bei mit diesen mit Antikörpern behandelten CED-Patienten eine Induktion der M2-Polarisation, verglichen mit dem Zeitpunkt vor der Therapie, insbesondere bei Patienten mit mukosaler Heilung [60, 61].

Das Inflammasom in der intestinalen Entzündung

Aufbau und Aktivierungsmechanismen

Ein weiterer CED-relevanter Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das Inflammasom (**Abbildung 2**). Als Inflammasom wird ein intrazellulärer Proteinkomplex bezeichnet, der nach Aktivierung durch verschiedene Mechanismen die Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 nach sich zieht [62]. Die Prozessierung geschieht dabei Caspase-abhängig. Caspasen sind Cysteinproteasen, die an verschiedenen zellulären Signalwegen (z.B. Apoptoseinduktion oder Inflammation) beteiligt sind. Die Caspase-1 gehört (neben Caspase-4 und -5) beim Menschen zu den pro-inflammatorischen Typen. Diese Enzyme werden als Zymogen synthetisiert, d.h. erst durch proteolytische Spaltung wird das Enzym aktiv. Diese Spaltung wird in der Zelle streng kontrolliert; im Fall der Caspase-1 geschieht dies durch das Inflammasom. Inflammasome bestehen aus mehreren selbst-oligomerisierenden Proteinen, deren exakte Komposition bei den verschiedenen Inflammasom-Subtypen variiert. Das am besten charakterisierte Inflammasom ist das NLRP3-Inflammasom, welches aus dem NLRP3 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*)- Protein, dem ASC (*apoptotic speck-like protein containing a CARD*)- Adaptor, und der Pro-Caspase-1 besteht.

Die Aktivierung geschieht durch zwei verschiedene Signale. Das erste Signal, das durch TLRs als Antwort auf Mustererkennung von Pathogenen oder auch durch IL-1 β selber ausgelöst werden kann, führt über NF- κ B zu Transkription und Translation der inaktiven Zytokin-Pro-Formen. Diese werden dann durch das zweite Signal in die aktiven Formen gespalten.

Da das Inflammasom eine Komponente des angeborenen Immunsystems darstellt, kommt es vor allem in Zelllinien der myeloiden Reihen vor, z.B. in Makrophagen und dendritischen Zellen [63, 64]. Es gibt jedoch auch andere Zellpopulationen, die ein funktionstüchtiges Inflammasom enthalten, etwa Keratinozyten [65], intestinale Epithelzellen [66] und Adipozyten [67].

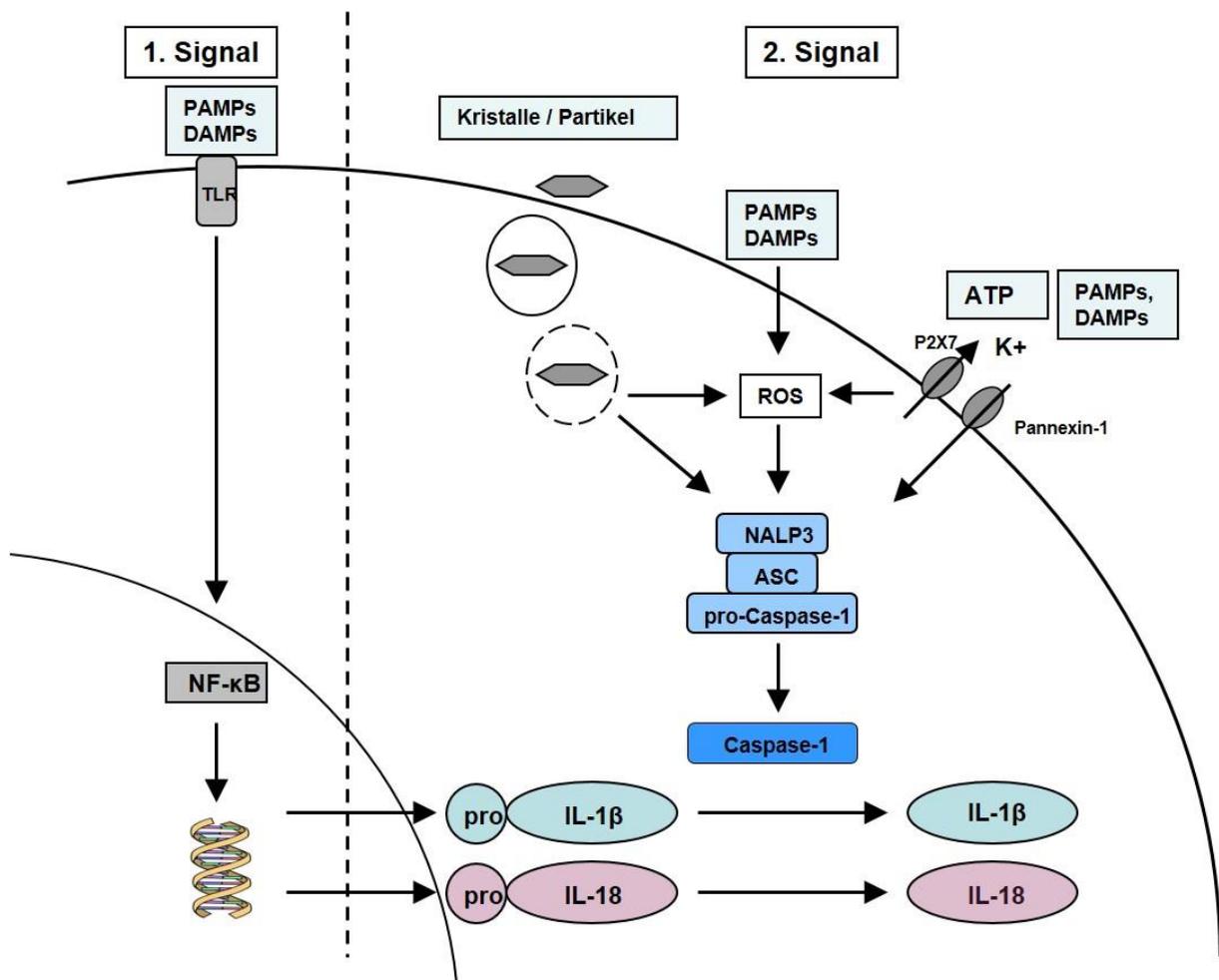


Abbildung 2. Modell und Aktivierungsmechanismen des Inflammasoms.

Für die Aktivierung des Inflammasoms sind zwei Signale notwendig. Das erste kann über *pathogen-* oder *danger-associated molecular pattern* (PAMPs oder DAMPs) über *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) ausgelöst werden und führt NF-κB-abhängig zur Transkription und Translation von pro-IL-1β und pro-IL-18. Das zweite Signal kann über viele Mechanismen (ATP: Adenosin-Triphosphate; PAMPs, DAMPs, Kristalle, Partikel, ROS: *reactive oxygen species*) ausgelöst werden und führt zur Maturation/Spaltung von pro-IL-1β und pro-IL-18 in die aktiven Formen. Aus: Lissner D., Siegmund B: The multifaceted Role of the Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease. WJG, 2011 [68]

Inflammasom bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Verschiedene Daten weisen auf eine Rolle des Inflammasoms in der intestinalen Inflammation hin [68]. In Genomweiten Assoziationsstudien wurden Mutationen im NLRP3- Gen mit der Suszeptibilität für MC in Zusammenhang gebracht [69]. Frühere Studien identifizierten Mutationen im IL-18-Gen selber [70] oder im korrespondierenden Rezeptor [71] als CED-Risikolocus. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für ein erhöhtes CED-Risiko bei hypofunktionalem Inflammasom, was wiederum an ein anderes Suszeptibilitäts-Gen für MC, nämlich die NOD2/CARD15 *loss-of-function* Mutation, erinnert. Beide Rezeptoren gehören zur selben NLR-Familie und sind intrazelluläre Mustererkennungsrezeptoren, bei denen inadäquates Erkennen von Mikroben mit chronisch intestinaler Entzündung vergesellschaftet ist.

Lange vor Erstbeschreibung des Inflammasoms wurden die Effektorzytokine IL-1 β und IL-18 als relevant für die Pathogenese der CED eingeschätzt. In der aktiv entzündeten Mukosa von CED-Patienten wurde eine deutlich erhöhte Expression der beiden Zytokine festgestellt, wobei das Ausmaß der Erhöhung mit dem Entzündungsgrad korrelierte [72-74]. *In vitro* konnte eine verminderte Expression von verschiedenen *tight junction*-Proteinen durch IL-1 β nachgewiesen werden [75]. *In-vivo*-Studien mit neutralisierenden Antikörpern konnten diese Beobachtungen zunächst bestätigen: Effektive Inhibition von IL-1 β [76], IL-18 [77-79] oder Caspase-1 [80, 81] führten zu einer deutlichen Verbesserung der Colitis im Mausmodell. Allerdings zeigten *in-vivo* Studien mit Knock-out-Mäusen dann einen genau gegenteiligen Effekt: Tiere mit einer Defizienz für IL-18, IL-18-Rezeptor, IL-1, IL-1-Rezeptor, NLRP3, ASC oder Caspase-1 [66, 82-86] zeigten alle eine dramatisch erhöhte Colitis-Aktivität und -Mortalität im Vergleich zu gesunden Mäusen. Interessanterweise trifft dies auch bei Transplantation von Wildtyp-Knochenmark in NLRP3^{-/-}-Mäuse zu, so dass die NLRP3-Expression in nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Epithelzellen, kritisch zu sein scheint. NLRP3^{-/-} Mäuse ohne DSS-Behandlung entwickeln keine Colitis, was impliziert, dass eine Inflammasom-Defizienz alleine nicht in einer Dysbalance der intestinalen Homöostase resultiert. Vielmehr ist dieser Signalweg in der Rekonstruktion der Homöostase involviert, wenn ein vorangegangener Schaden bereits aufgetreten ist. Hierbei ist der exakte zelluläre Mechanismus noch unklar. IL-18 ist in der Lage, die IFN γ -Produktion in T-Zellen zu induzieren [87], wodurch die Epithelzell-Proliferation und somit die

Regeneration der epithelialen Barriere stimuliert werden [88]. Ob auch andere Kaskaden eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt.

Epitheliale Barriere

Tight junction-Proteine

Die epitheliale Barriere entsteht durch einen polarisierten Monolayer von kolumnalen Epithelzellen, welche durch interzelluläre Verbindungen, die *tight junctions* (TJ), abgedichtet werden [89]. Dies sind Membranproteine, die im apikalen Teil der Epithelzellen lokalisiert sind und die Zellen fest miteinander verbinden. Sie bilden so eine parazelluläre Barriere zwischen lumenalem Darminhalt und dem Körper und erhalten gleichzeitig die Polarität der Epithelzelle [90].

Die TJ sind strukturell aus vier verschiedenen integralen Membranproteinen zusammengesetzt: Dem Occludin, den Claudinen, dem Tricellulin und den *junctional adhesion molecules* (JAM) [89]. Insbesondere die Familie der Claudine ist von entscheidender Bedeutung bei der Erhaltung der epithelialen Barriere. Die Transmembranproteine mit einer Größe von 20-17 kDa sind die bislang am besten untersuchten TJ-Proteine. Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 haben verschließende Wirkung [91-93], wohingegen Claudin-2, -10b oder -15 als parazelluläre Kanäle wirken und so die Passage von selektiven Ionen bewirken können [94, 95]. JAM-1, das erste beschriebene TJ-Protein der JAM-Familie, reguliert ebenfalls die junctionale Integrität und Permeabilität bei Epithel- und Endothelzellen [96]. Zonula occludens (ZO) ist ein Protein, das auf der zytoplasmatischen Seite der Epithelzellen lokalisiert ist und dort mit Occludin und den Claudinen sowie mit dem Zytoskelett verbunden ist und so zur Stabilität der Zelle beiträgt [97]. Die Isoformen ZO-1, -2 und -3 sind beschrieben.

Die Familie der Cadherine besteht ebenfalls aus transmembranen Glykoproteinen aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle, die in Desmosomen und *adherens junctions* vorkommen. Die membranständigen Desmosomen dienen dem verbesserten mechanischen Zell-Zell-Zusammenhalt durch Verbindung der zellulären Intermediärfilamente (im Falle der Epithelzellen meist Keratin-Filamente); *adherens junctions* stärken ebenfalls den interzellulären Zusammenhalt durch mechanische Verbindungen zwischen den Aktin-Filamenten der Epithelzellen unterhalb der TJ-

Ebene. E-Cadherin (E-Cad) ist das am besten beschriebene Cadherin und kommt vor allem in Epithelzellen vor [98].

Epitheliale Barriere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Dysfunktion der epithelialen Barriere ist ein charakteristisches Merkmal sowohl beim MC als auch bei der UC. Aus der erhöhten Permeabilität resultiert einerseits eine Leckflux-Diarrhö, andererseits können Noxen und Antigene leichter in die Mukosa translozieren und so die Entzündungsreaktion weiter unterhalten. Die epitheliale Barriestörung bei CED kommt sowohl durch quantitative als auch qualitative Veränderungen an den epithelialen TJ zustande. Beim MC werden die verschließenden Proteine Claudin-3, -5 und -8 sowie Occludin vermindert, Claudin-2 jedoch vermehrt exprimiert; Claudin -5 und -8 werden außerdem von der TJ weg ins Zytoplasma relokalisiert [99]. Ähnliche Beobachtungen existieren für die CU, sowohl quantitativ als auch strukturell [100, 101]. Zusätzlich treten bei beiden Erkrankungen Leckagen aufgrund von epithelialen Apoptosen auf [102, 103].

Pro-inflammatorische Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der epithelialen Barriestörung. So haben z.B. die Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ oder IL-13, die im aktiv entzündeten Darm bei CED-Patienten massiv erhöht sind, *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell einen vergleichbar verheerenden Effekt auf die epitheliale Barriere, und zwar sowohl auf die Dysregulation der TJ als auch auf die Apoptose-Induktion [100, 104]. Diese Zytokine führen zudem zu einer erhöhten bakteriellen Translokation in Zellkultur-Modellen [105, 106].

Ferner wurden bei CED-Patienten genetische Mutationen in Assoziation mit der epithelialen Barriere beschrieben. PARD3 (*partitioning defective 3*) und MAGI2 (*membrane-associated guanylate kinase inverted 2*) zum Beispiel spielen beide eine Rolle beim Zusammenbau der TJ. Mutationen in für diese Proteine kodierenden Genen sind mit der Entstehung der Zöliakie und der CU assoziiert [107]. Ebenso wird HNF4 α , welches für den Transkriptionsfaktor „*hepatocyte nuclear factor 4 α* “ kodiert und in der Regulation von Claudin-2, Claudin-15, Adhäsionsverbindungen und Desmosomen involviert ist, als Risiko-Gen für die Entwicklung einer UC angesehen [108].

Zusammenfassend scheint die Dysfunktion der epithelialen Barriere bei CED also ein Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition und einem veränderten Zytokinmilieu darzustellen, das wahrscheinlich durch übersteigerte Immunantwort auf das Mikrobiom oder ein pathologisch verändertes Mikrobiom entsteht. Als Konsequenz

beobachtet man eine erhöhte Permeabilität, wodurch die so ermöglichte Translokation von Bakterien und luminalen Antigenen den Kreislauf der chronischen Entzündung in Gang hält.

Fragestellung

Für die Pathogenese der CED sind zwei wesentliche Merkmale charakteristisch: Zum einen führt eine Dysregulation von Zellen des angeborenen Immunsystems, zum Beispiel durch defekte intrazelluläre Mustererkennungsrezeptoren, zu einer inadäquaten Stimulierung der intestinalen Immunantwort. Andererseits trägt die Dysfunktion der epithelialen Barriere, entweder Zytokin-vermittelt oder durch genetische Defekte hervorgerufen, durch die so ermöglichte Translokation immunogener luminaler Bestandteile zur Chronifizierung der intestinalen Entzündung bei. Daher sollten in dieser Arbeit Makrophagen-Subtypen – als essentieller Bestandteil des potentiell dysregulierten angeborenen Immunsystems – funktionell charakterisiert und deren direkte Auswirkung auf die Integrität der epithelialen Barriere analysiert werden. Dabei sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Welche der beiden Makrophagen-Subpopulationen finden sich in der Lamina propria des entzündeten Darms bei den beiden CED-Entitäten MC und CU?
- Welche pro- bzw. anti-inflammatorischen Eigenschaften weisen die *in-vitro*-generierten Makrophagen-Subpopulationen auf?
- Kann durch Etablierung eines passenden Modells der spezifische Effekt der *in-vitro*-generierten Makrophagen-Subpopulationen auf die epitheliale Barriere charakterisiert werden?
- Welche Mechanismen liegen einer Makrophagen-induzierten epithelialen Dysfunktion zugrunde und gibt es Möglichkeiten, diesen Effekt medikamentös zu antagonisieren?

Materialien und Methoden

Materialien

Chemikalien, Lösungen und Kits

Alle verwendeten Chemikalien, Lösungen und Kits hatten den höchstmöglichen Reinheitsgrad.

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.

| Produkt | Hersteller |
|--|--|
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Acrylamid (30%) | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Adenosin 5`-Triphosphat (ATP) | Carl Roth |
| Aqua dest. | Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland) |
| Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) | Biochrom (Berlin, Deutschland) |
| Bisacrylamid (1,5%) | Carl Roth |
| Bromphenolblau | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Citronensäure | Carl Roth |
| <i>Cytometric Bead Arrays (CBA): Human Inflammatory Flex Sets</i> | |
| humanes IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα | BD Bioscience (San Diego, USA) |
| ELISA Kit: humanes IL-1β | R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) |
| Entwicklungsreagenz für Chemilumineszenz ECL <i>Western Blotting Detection Reagents</i> | GE Healthcare (Buckinghamshire, Großbritannien) |
| Entwicklungsreagenz für ELISA Opt EIA TMB Substrate Reagent Set | BD Bioscience |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Serva (Heidelberg, Deutschland) |
| Esenserum | Dianova (Hamburg, Deutschland) |
| Ethanol (96%, 80% und 70) vergällt mit 1- prozentigem Methylethylketon | Carl Roth |
| Ethanol (absolut) | Merck |
| Fötales Rinderserum (FBS) | Linaris (München, Deutschland) |
| Glycin | Carl Roth |
| Glycerin | Carl Roth |
| Grundmedium: RPMI1640; mit Phenolrot; #E15- 039 | PAA Laboratories (Pasching, Österreich) |

| | |
|---|--|
| Größenmarker <i>Protein-Standard Page Ruler</i> <i>Prestained Protein Ladder</i> | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Harnstoff | Carl Roth |
| HCl | Merck |
| Hematoxylin-Lösung; Meyers Hämatoxylin | Merck |
| Heparin (25000 IE/mL); steril | B. Braun (Melsungen, Deutschland) |
| KCl | Merck |
| KH ₂ PO ₄ | Merck |
| L-Glutaminlösung (200 mM); steril | PAA Laboratories |
| Lipopolysaccharid (LPS), aus <i>E. coli</i> | Invivogen (Toulouse, Frankreich) |
| <i>MicroBeads:</i> | |
| - humanes CD14 | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Methanol | J.T. Baker (Deventer, Niederlande) |
| Na ₂ HPO ₄ | Carl Roth |
| NaCl | Sigma |
| NaOH | Merck |
| Natriumcitrat | Carl Roth |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Carl Roth |
| Penicillin (10.000 U/mL) / Streptomycin (10.000 µg/mL)-Lösung; steril | PAA Laboratories |
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ ; pH 7,4 (PBS) | PAA Laboratories |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) | Sigma |
| Ponçeau S | Merck |
| Propidiumiodid | MP Biomedicals (Ilkirch, Frankreich) |
| Pralnacasan | Merck |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma |
| Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase | Dako (Glostrup, Dänemark) |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Carl Roth |
| Tris-HCl | Merck |
| Trypanblaulösung (0,5%); steril | Biochrom |

| | |
|---|---|
| Trypsin (0,5%)/EDTA (0,2%)-Lösung; steril | PAA Laboratories |
| Xylol | Carl Roth |
| Zähl-Beads; Calibrite | BD Biosciences |
| 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) | Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland) |

Materialien und Geräte

Tabelle 2. Verwendete Materialien und Geräte

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| Analysenwaage; BP210D | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Autoklav; Varioklav 500E | H+P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland) |
| Axiolmager Z1, <i>Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast</i> | Zeiss (Berlin, Deutschland) |
| Begasungsbrutschrank; Heraeus 150 | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Chemilumineszenzdetektor LAS-4000 mit Programm Image Reader | Fujifilm (Tokyo, Japan) |
| Durchflusszytometer; FACSCanto™ II mit Software FACSDiva™ (Version 6.1.3), CellQuest™ Pro (Version 5.2.1) und FCAP Array™ (Version 1.0.1) | Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) |
| Eisbereiter, AF100 | Scotsman (Bettolino di Poliano, Italien) |
| Elektroden zur Rt-Messung STX-2 mit epitheliale Voltohmmeter | World Precision Instruments (Sarasota, USA) |
| ELISA-Reaktionsplatten MaxiSorb mit 96 Vertiefungen und flachem Boden | Thermo Fisher Scientific |
| Filter zur Epithelzellkultur; PCF Filter (0,4 µm) | Merck Millipore (Billerica, USA) |
| Gel-Blotting-Papier | Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland) |
| Kammer für vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell mit Gießeinrichtung | Bio-Rad Laboratories |
| Kammern für horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese Perfect Blue Mini M/ L | Peqlab (Erlangen, Deutschland) |
| Konfokales <i>Laser Scanning Microscope</i> (LSM) | Zeiss |
| Kühlschrank, 4 °C | Liebherr (Biberach, Deutschland) |
| Kühlzentrifuge; Biofuge fresco | Heraeus |
| Kühlzentrifuge; Eppi und Heraeus Fresco | Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| Impedanz-Messgerät | Institut für klinische Physiologie, CBF, Berlin, DE |
| Magnetrührer; Ikamag RH | IKA (Staufen, Deutschland) |
| Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser | Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland) |

| | |
|---|--|
| Mixer; Vortex Reax 2000 | Heidolph (München, Deutschland) |
| pH-Meter; 766 Calimatic mit Einstab-Messelektrode | Knick (Berlin, DE) |
| Photometer für Mikrotiterplatten mit Software Easy-WinFitting (Version 6.0 a) | Tecan, Crailsheim, DE |
| Säulen für MACS®; LS-Säule | Miltenyi Biotec |
| Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom; Herasafe 1.8 | Kendro (Langensfeld, Deutschland) |
| Tiefkühlschrank -20 °C | Liebherr |
| Tiefkühlschrank -80 °C | SANYO Component Europe GmbH (München, Deutschland) |
| Wasserbad, Isotemp 210 | Fisher Scientific |
| Western-Blot-PVDF-Membran Immobilon-P | Carl Roth |
| Porengröße 0,45 µm | |
| Zählkammer nach Neubauer | Brand (Wertheim, Deutschland) |
| Zellkulturplatte: 6/12/24-Well | BD Biosciences |
| Zellkulturflaschen BD Falcon 75 cm ² , 150 cm ² | BD Bioscience |
| Zellscraper | Sarstedt (Newton, USA) |

Gele, Puffer- und Standardlösungen

Tabelle 3. Gele, Puffer- und Standardlösungen

| <i>Gele, Puffer- und Standardlösungen</i> | <i>Zusammensetzung</i> |
|--|--|
| Citratpuffer, 100 mM | 4,94 l Aqua dest, 10,5 g Citronensäure-Monohydrat 60 ml 2M NaOH pH 6,0 |
| MACS-Puffer | 450 ml PBS 50 ml BSA 5% |
| PBS | 11,6 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl auf 10 l Aqua dest. pH 6,5–7,0 |
| PBS-Tween | 2 l PBS 1 ml Tween 20 |
| TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) | 4,25 g TRIS HCl 4,5 g TRIS Base 43,9 g NaCl auf 5 l Aqua dest. pH 7,4 – 7,6 |

TBS-T

5 l TBS
5 ml Tween 20

SDS-PAGE und Western Blot

| | |
|-------------------------------------|--|
| Elektrophorese-Laufpuffer (10-fach) | 144 g Glycin 30 g Tris 10 g SDS auf 1 l Aqua dest. |
| Polyacrylamid-Sammelgel | 600 µl Acrylamid 30%/Bisacrylamid 1,5% 250 µl Spacerpuffer 25 µl 10% SDS 1,5 ml 8M Urea 75 µl APS 2,5 µl TEMED |
| Polyacrylamid-Trenngel (12,5%) | 5,2 ml Acrylamid (Stock 25%) 2,0 ml Resolving-Puffer 0,1 ml 10% SDS 3,0 ml 8M Urea 225 µl APS 10 µl TEMED |
| Ponçeau-Färbelösung | 0,1% Ponçeau S 5% Essigsäure in Aqua dest. |
| Probenpuffer | 5,0 ml 8 M Harnstoff 2,0 ml Spacer-Puffer 1,0 ml 20% SDS 0,5 ml β-Mercaptoethanol 1,5 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau |
| Resolving-Puffer | 181,5 g Tris 240 ml 1N HCl auf 500ml Aqua dest. |
| Spacer-Puffer | 36,6 g Tris auf 500 ml Aqua dest. pH 6,7 |
| Transferpuffer | 3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol f.c. 20% auf 1 l Aqua dest. |

Medien, Antikörper, Zytokine und Zytokinblockade

Tabelle 4. Verwendete Medien

| Medium | Zusammensetzung |
|--|---|
| Medium für Monozyten, Makrophagen, Caco-2, T84 und HT29/B6 | RPMI1640 mit Phenolrot 10% FBS 2 mM L-Glutamin 1.000 U/ml Penicillin 1 mg/ml Streptomycin |

Tabelle 5. Verwendete Antikörper

| Antigen | Herkunft, Subtyp, Klon | Hersteller |
|---|-------------------------------|---|
| Immunhistochemie | | |
| CD163 | Maus, IgG1, 10D6 | Novocastra, Berlin, DE |
| CD68 | Maus, IgG1, PG-M1- | Dako |
| iNOS | Kaninchen, IgG, polyklonal | Abcam, Cambridge, UK |
| Stabilin 1 | Kaninchen, polyklonal | Sigma-Aldrich |
| TNF α | Maus, IgG1, P/T2 | Abcam |
| Durchflusszytometrie | | |
| CD14, Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelt | Maus, IgG1, κ , 61D3 | eBioscience, USA, jetzt Thermo Fischer Scientific |
| CD163, Phycoerythrin (PE) gekoppelt | Maus, IgG1, κ , GHI/61 | eBioscience, USA, jetzt Thermo Fischer Scientific |
| HLA-DR, Allophycocyanin (APC) gekoppelt | Maus, IgG2b, κ , LN3 | eBioscience, USA, jetzt Thermo Fischer Scientific |
| Immunfluoreszenz | | |
| Claudin-2 | Kaninchen, IgG1, polyklonal | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| JAM-1 | Kaninchen, IgG2b, polyklonal | Life Technologies |
| ZO-1 | Kaninchen, IgG1, polyklonal | Life Technologies |
| Sekundäre Antikörper | | |
| Maus / Kaninchen, AlexaFluor594 / AlexaFluor488-gekoppelt | Ziege | Life Technologies |
| Western-Blot | | |
| Humanes IL-1 β /IL-1F2 | Maus, IgG, polyklonal | R&D Systems |
| Sekundärer Antikörper | | |
| Maus | Kaninchen, IgG, polyklonal | Dako |

Tabelle 6. Verwendete rekombinante Zytokine

| Protein* | rekombinant aus | Spezifische Aktivität [U/mg]/ | Stamm-Konzentration [µg/mL] |
|-----------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| GM-CSF | <i>E. coli</i> | ≥1x10 ⁷ | ≤ 0,001 |
| M-CSF | <i>E. coli</i> | ≥2x10 ⁵ | ≤ 0,005 |
| IL-1β | <i>E. coli</i> | ≥1x10 ⁹ | ≤ 0,001 |

* Alle hergestellt von PeproTech, Rocky Hill, USA

Tabelle 7. Zytokinblockade

| Zielstruktur | Name, Funktionsweise | Hersteller |
|---------------------|--|---|
| TNF α | Infliximab (Remicade®) Chimärer human/muriner Antikörper gegen TNF α , IgG1 | MSD, Haar, Germany |
| IL-1 Rezeptor | Anakinra (Kineret®) IL-1 Rezeptorantagonist | Swedish Orphan Biovitrum GmbH, Langen, Germany |
| IL-18 | Monoklonaler muriner AK gegen IL-18, Maus, IgG1, κ , 125-2H | MBL, Nagoya, Japan |

Untersuchungsmaterial

Die Genehmigung für alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgte durch die Ethik-Kommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Ethikvotum: EA4/059/10).

Für die Immunhistochemie wurde aktiv entzündete Darmschleimhaut in Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Darm-Resektaten von CED-Patienten mit normaler, nichtdysplastischer Darmschleimhaut in Darm-Resektaten von Patienten mit Neoplasien als gesunde Kontrollen verglichen. Die Präparate stammten allesamt aus dem Archiv des Instituts für Pathologie, Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Nur Resektate mit aktivem ileozökalem (MC) oder Kolon-Befall (MC, CU) wurden in die Untersuchungen eingeschlossen.

Für die Isolierung der Monozyten und die Weiterverarbeitung in differenzierte Makrophagen wurde den freiwilligen, gesunden, volljährigen Probanden, die zuvor ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten, mit einer zuvor mit Heparin (25000 IE/ml)

benetzten Spritze ca. 50 ml Vollblut aus einer peripheren Vene abgenommen. Die Weiterverarbeitung erfolgte innerhalb von 4 Stunden.

Methoden

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde nach einem etablierten Schema durchgeführt [109, 110]. Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf einer Komplexbildung zwischen dem gesuchten Antigen und dem spezifisch bindenden Antikörper. Da Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung häufig zu einer Unzugänglichkeit der Antigene führen, wurden die Proben zunächst von Paraffin befreit und dann rehydriert. Dies geschieht durch das Auftragen der 2 µm dicken Schnitte auf spezielle Objektträger, Entparaffinisierung durch Xylol, anschließende Wässerung in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 70%), Rehydrierung in destilliertem Wasser sowie hitzeinduzierte Antigendemaskierung (5 min in Citratpuffer, 100 mM, pH 6). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers erfolgte dann eine Blockade mit 100 µl Eseserum, gefolgt von der Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper (verwendete Antikörperlösungen: 1:100 für TNF α , 1:200 für CD68 und Stabilin-1, 1:400 für CD163 und 1:500 für iNOS, jeweils mit TBS-Puffer verdünnt; Inkubationszeit 30 min bei CD163 bzw. 1 h bei CD68, Stabilin-1, TNF α und iNOS bei Raumtemperatur). Nach einem Waschschrift mit TBS-T wurde biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper (Verdünnung 1:200 in TBS-Puffer) für 30 min auf die Proben gegeben. Nun wurden die Schnitte nach erneutem TBS-T-Waschen für 30 min mit einer an Streptavidin gekoppelten alkalischen Phosphatase inkubiert und dann erneut gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit 100 µg Entwicklungsreagenz (nach Herstellerprotokoll) für weitere 30 min inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Schnitte wurden mit dem Axioimager-Z1-Mikroskop analysiert. Farbmarkierte Zellen wurden quantifiziert und jeweils zehn *high power fields* (hpf; 0.237 mm²) pro Probe ausgezählt.

Die immunhistochemischen Färbungen für CD68, Stabilin-1, CD163 und iNOS wurden bereits im Rahmen einer früheren Doktorarbeit aus unserer Arbeitsgruppe von Fr. Dr. Kredel [109] angefertigt und im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit nochmals mit anderem Fokus (Quantifizierung der Makrophagen in der Lamina propria) neu ausgewertet. Die immunhistochemische Färbung von TNF α wurde für die hier vorliegende Dissertation neu durchgeführt und ausgewertet.

Zellpräparation und Zellkultur

Monozyten-Isolierung und Makrophagen-Polarisierung

Monozyten-Isolierung und Makrophagen-Polarisierung erfolgten wie in der Literatur beschrieben [110, 111]. Heparinisiertes Vollblut wurde zu gleichen Teilen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gemischt. Nun erfolgte die vorsichtige Schichtung von 25 ml des Gemisches über 15 ml Biocoll-Trennlösung mit anschließender Zentrifugierung über 25 min bei 20 °C mit 1200 x g und kleinstmöglicher Bremsung. Die peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC), zu denen neben B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen auch die Monozyten gehören, wurden aus den mit Hilfe der Biocoll-Dichtegradienten-Zentrifugierung gewonnenen *buffy coats* unter sterilen Bedingungen abpipettiert und sofort zweimal mit jeweils 20 ml MACS-Puffer gewaschen. Durch Färbung der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau konnten die vitalen Zellen identifiziert und mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer quantifiziert werden.

Mittels nachfolgender magnetischer Zelltrennung (MACS) mit CD14-MicroBeads gemäß Herstellerangaben wurden die CD14⁺ Monozyten aus der Zellsuspension isoliert. Diese machen ca. 10% aller PBMCs aus. Die Effektivität der Zellaufreinigung wurde durchflusszytometrisch verifiziert. Die erhaltenen Zellsuspensionen enthielten typischerweise >98% CD14⁺ Zellen in der Durchflusszytometrie.

Die Zellen wurden anschließend in Standardmedium in 12-*well*-Zellkulturplatten in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro *well* bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 6% kultiviert. Die Zellkulturen erhielten zusätzlich entweder humanen *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (50 U/mL; GM-CSF) oder humanen *macrophage-colony stimulating factor* (50 ng/mL; M-CSF) für sechs Tage, um die Polarisierung in M1- oder M2-Makrophagen zu erreichen, oder sie wurden in Standardmedium ohne weitere Stimulation für 24 Stunden kultiviert, um unpolarisierte Monozyten (Mo) zu bewahren. Bei sechs-tägiger Kultivierung wurde das Medium nach jeweils drei Tagen zur Hälfte ausgetauscht. Die Zellen wurden, falls nötig, durch Inkubation mit Trypsin oder EDTA (je 5 ml, 15 Minuten Inkubation bei 37 °C) aus den Kulturgefäßen abgelöst und weiterverarbeitet.

Stimulation

Für die Versuche zur Induktion bzw. Inhibierung des Inflammasoms in Monozyten wurden die mit 3×10^5 pro *well* ausgesäten Zellen mit LPS (100 ng/ml) über 12 h, ggf. ATP 10 mM für 5, 10, 15, 20 oder 30 Minuten und ggf. zusätzlich Pralnacasan 10 μ M über den entsprechenden Zeitraum stimuliert. Pralnacasan wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen (Monozyten bzw. HT-29, ATCC HTB-38) ebenfalls in einer Dichte von 3×10^5 pro *well* ausgesät und entweder mit Medium (Kontrolle) oder LPS (100 ng/ml) für 4 h plus ggf. 1 mM ATP für 15 Minuten inkubiert.

Nach Beendigung der Stimulierung wurden die Überstände jeweils abpipettiert und dem ELISA (s.u.) zugeführt bzw. die Zellen lysiert (100 μ l Western Blot Puffer + 1 μ l Benzonase, Konzentration 1×10^4 Zellen/ μ l Lysat) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

Co-Kultur von Makrophagen mit Epithelzellen

Epithelzellen und Versuchsaufbau

Für die Co-Kultur von Monozyten bzw. Makrophagen wurden die folgenden Epithelzelllinien verwendet: HT-29/B6 Zellen (Subklone aus der humanen Kolon-Karzinom-Zelllinie HT-29) [112], Caco-2 (ATCC HTB-37) [113] und T84 (ATCC CCL-248) [114]. Die Co-Kultur der Monozyten bzw. Makrophagen und der Epithelzellen ist schematisch in **Abbildung 3** dargestellt. Sie fand in 12-*well*-Kulturplatten statt. Die Epithelzellen wurden auf Millicell PCF Filtern (0,4 μ m Dicke) mit einer durchschnittlichen Konzentration von 7×10^5 Zellen/cm² ausgesät und bis zur Konfluenz als hochdifferenzierter polarisierter Monolayer kultiviert. Nach 10 bis 14 Tagen nach Aussaat der Caco-2 und T84 Zellen bzw. nach 7 bis 9 Tagen nach Aussaat der HT-29/B6 Zellen wurden die Filter in die 12-*well*-Platten montiert. Am selben Tag wurden die Monozyten/Makrophagen in die basale Kammer in einer Konzentration von 3×10^5 pro *well* unter den Epithelfilter, jedoch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zu den Epithelzellen ausgesät. Das apikale Kompartiment wurde mit 500 μ l, das basale Kompartiment mit 2 ml Standardmedium gefüllt. Je nach Stimulationsmethode wurden zusätzlich LPS (100 ng/ml), Infliximab (10 μ g/ml), Anakinra (15 μ g/ml) oder ein monoklonaler Anti-IL-18- Antikörper (1 μ g/ml) in die basale Kammer hinzugefügt.

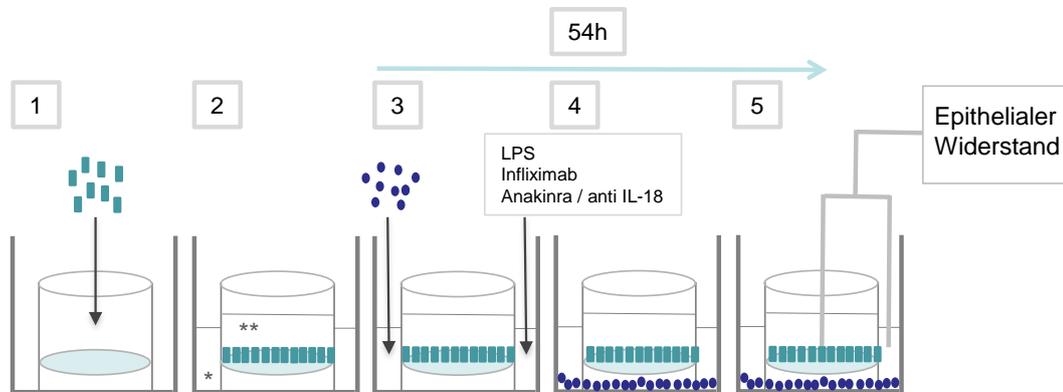


Abbildung 3. Co-Kultur von Makrophagen mit Epithelzellen.

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des Co-Kultur-Modells. (1) Die Epithelzellen (T84, Caco-2, HT-29/B6) werden auf Millipore PFC Filter ausgesät und bis zur Konfluenz und Ausbildung eines polarisierten Monolayers (2) kultiviert. In die basale Kammer (*) wird 2 ml Standardmedium, in die apikale Kammer (**) 500 µl Standardmedium eingefüllt. (3) Monozyten bzw. M1- oder M2-Makrophagen werden in das basale Kompartiment ausgesät und je nach Versuch mit Lipopolysaccharid (LPS), Infliximab, Anakinra oder einem IL-18 Antikörper kultiviert (4). Zu den Zeitpunkten 0, 6, 24, 30, 48 und 54 Stunden nach Zusammenführung der Zellen wird der epitheliale Widerstand als Ausmaß des epithelialen Integritätsverlustes gemessen (5).

Messung des transepithelialen Widerstandes

Der transepitheliale Widerstand (R_t) der Epithelfilter wurde wie zuvor beschrieben mithilfe speziell für die Messung an Zellfiltern entwickelten Chopstickelektroden (Ing. grad. D. Sorgenfrei) quantifiziert [115]. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten mit den zwei zuvor in 96%igem Ethanol sterilisierten, fixierten Elektrodenpaaren, an die ein Impedanz-Messgerät angeschlossen war, wobei die Tiefe des Einsenkens und die Position der Elektroden auf dem Filter mechanisch standardisiert wurden. Zur Messung wird die eine Elektrode außerhalb, die andere innerhalb des Filters von oben in das den Filter ausfüllende bzw. umspülende Medium eingetaucht. Der Widerstand wird anhand

der Spannungsabweichungen berechnet, die von der Durchströmung der epithelialen Zellschicht durch einen externen, rektangulären Strom ($\pm 10 \mu\text{A}$, 21 Hz) verursacht wurden. Die Widerstandsmessungen wurden hinsichtlich des zuvor quantifizierten Widerstandes des leeren Filters und der Lösung korrigiert. Der R_t wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 24, 30, 48 und 54 Stunden nach Zusammenführung der Zellen bestimmt.

Nach Beendigung des Experiments wurden die Überstände abpipettiert und im *Cytometric Bead Array* (CBA) weiter analysiert. Die Monozyten/Makrophagen wurden durch Trypsin oder EDTA von den *wells* abgelöst und die Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Epithelzell-Filter wurden zur weiteren Analyse (Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie) wie unten beschrieben weiterverarbeitet.

Bei der Aussaat und Kultivierung der Epithelzellen und der Messung des transepithelialen Widerstandes erhielt ich wertvolle praktische Hilfe durch Frau Claudia May (AG Schulzke/Schumann); alle anderen Schritte wurden vollumfänglich von mir ausgeführt.

Zytokinbestimmung

Cytometric Bead Array

Zur Zytokinbestimmung in den Überständen der verschiedenen Zellpopulationen aus den Co-Kultur-Versuchen wurde ein CBA verwendet. Unter *Beads* versteht man gefärbte Polysterol-Kügelchen mit spezifischer Fluoreszenzintensität, durch deren Einsatz simultan mehrere Zytokine im Überstand quantifiziert werden können. Die Zytokine werden hierbei über spezifische primäre Antikörper, welche auf den *Capture Beads* mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität gekoppelt sind, gebunden und über Polyethylen (PE)-gebundene Sekundärantikörper durchflusszytometrisch detektiert. Zur Zytokinbestimmung von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF α kamen entsprechende Flex Sets nach Herstellerangaben zum Einsatz. Standardreihen erfolgten durch Verdünnung mit Kompletmedium; die Höchstkonzentrationen betrug hierbei 5 ng/ml. Das Gemisch aus *Bead-Suspension* (4 μl *Capture Beads* und 20 μl Detektionsreagenz mit PE-markierten Sekundärantikörpern) und 20 μl Probe bzw. Standardverdünnung oder Kompletmedium als Negativkontrolle wurde für 2 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf einem Schüttler inkubiert und dann mit 2 ml im Set enthaltenen Waschpuffer

gewaschen. Nach Resuspension in 200 µl Puffer erfolgte die Messung am FACS-Canto II und die Auswertung über FCAP Array™.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Für die Bestimmung von IL-1β in den Überständen der Monozyten wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. So wird ein antikörperbasiertes Verfahren bezeichnet, mit dem Proteinkonzentrationen durch enzymatische Farbreaktionen gemessen werden können. Der primäre Antikörper (der sog. *capture antibody*) wird an eine feste Phase gekoppelt und bindet das nachzuweisende Eiweiß. Dieses bindet an einen zweiten Antikörper (den sog. *detection antibody*) an einem anderen Epitop. Über kovalent gebundenes Biotin kann dann mittels einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase das nachzuweisende Protein sichtbar gemacht werden.

Der ELISA wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde zunächst in eine Konzentration von 4 µg/ml (gelöst in PBS) verdünnt, je 100 µl in die präformierte 96-*well* Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl *Wash Buffer* (0,05% Tween 20/PBS) pro *well* erfolgte die Blockung mittels 300 µl *Reagent Diluent* (1% BSA/PBS) und die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte das Beladen mit je 100 µl der zu messenden Probe verdünnt mit *Reagent Diluent* bzw. der Standardverdünnungsreihe und die erneute Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Applikation des sekundären Antikörpers in einer Konzentration von 300 ng/ml (je 100 µl) und die Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden nun je 50 µl Streptavidin-HRP und *Reagent Diluent* zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde schließlich die enzymatische Färbereaktion durch Zugabe von je 100 µl fertig gemischtem TMB-Substrat (1:1) gestartet und eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln abgewartet, der Prozess wurde schließlich durch Zugabe von je 50 µl Fixierlösung (Schwefelsäure) gestoppt. Die fotometrische Messung erfolgte innerhalb der nächsten 30 min am *Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Korrekturwellenlänge von 560 nm.

Durchflusszytometrie zur Darstellung der Oberflächenantigene

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem in Suspension befindliche Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität einen Laserstrahl in unterschiedlicher Weise reflektieren und streuen und dadurch charakterisiert werden können. Durch zusätzliche Färbung mit intra- oder extrazellulären, fluoreszierenden Antikörpern, die von dem Laserstrahl angeregt werden, kann das Vorhandensein bestimmter Antigene geprüft werden. In diesem Fall wurden zur Darstellung der Oberflächenantigene extrazelluläre Antikörper verwandt und die Durchflusszytometrie nach einem etablierten Protokoll und nach Herstellerangaben durchgeführt [110]. Die Zellen wurden durch 5-minütige Inkubation mit Trypsin von den Kulturplatten abgelöst, zweimal mit MACS-Puffer gewaschen, quantifiziert und in einer Konzentration von jeweils $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (anti-CD14, anti-CD163 und anti-HLA-DR) nach Herstellerangaben auf Eis inkubiert. Nach 20 min erfolgte die Waschung mit 2 ml MACS-Puffer und die Messung von je $10^4\text{-}10^6$ Zellen am Durchflusszytometer unter Zuhilfenahme der FACS Diva™ Software des FACS Canto II. Tote Zellen wurden mittels Zugabe von $1\ \mu\text{g}$ Propidium-Iodid gefärbt und so exkludiert. Zur Auswertung der Daten diente die Software CellQuest™ Pro.

Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie

Die Immunfluoreszenz beruht auf dem Prinzip, dass Immunkomplexe aus dem nachzuweisenden Protein im Zellverband und dem dieses Protein spezifisch bindenden Erst-Antikörper durch Zweit-Antikörper sichtbar gemacht werden können. Die spezifisch an die Fc-Domäne des Erst-Antikörpers bindenden, fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörper können nach Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen ebenfalls Licht emittieren und so im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) detektiert werden, welches durch die Erzeugung von digitalen Bilddaten die Bildanalyse am Computer ermöglicht. Durch Doppelfärbungen kann die Lokalisation bestimmter Proteine im Zellverband ermöglicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Jena, bei exzitatorischen Wellenlängen von 543, 488 und 405 nm verwendet.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach einem etablierten Protokoll durchgeführt [116]. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Epithelfilter zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min in 2% Formaldehyd in PBS (pH 7,4) im Brutschrank inkubiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit PBS wurden die Zellen für fünf

Minuten in 25 mM Glycin in PBS inkubiert und nach zwei weiteren Waschschritten durch 15-minütige Zugabe von 0,3% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, erfolgte die Inkubation mit 1% Trockenmilchpulver und Ziegenserum. Die Zellen wurden dann für 60 min bei 4 °C mit den entsprechenden Erst-Antikörpern (Claudin-2, ZO-1, JAM-1) bzw. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) inkubiert und zweimal mit Ziegenserum gewaschen. Zur Doppelfärbung wurde nun analog der zweite Erstantikörper inkubiert. Zur Schonung der fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörper erfolgten die nächsten Schritte im Dunkeln. Die Zellen wurden zunächst mit dem ersten Zweit-Antikörper (Goat-Anti-Rabbit 594 1:500) für 60 Minuten bei 37 °C in 0,5% Ziegenserum, nachfolgend mit dem zweiten Zweit-Antikörper (Goat-Anti-Mouse 488 1:500) inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte das Spülen mit Aqua bidest. und absolutem Alkohol und Eindecken mit ProTags Mount Fluor. Nun folgte das Aushärten bei Raumtemperatur unter Abschirmung von Licht und im letzten Schritt die Analyse am LSM, wie oben beschrieben.

Bei der Färbung zur Immunfluoreszenz erhielt ich wertvolle praktische Hilfe durch Frau Claudia May (AG Schulzke/Schumann); die Analyse und Auswertung erfolgte durch mich.

Western Blot

Die Western Blot-Analyse ist ein Verfahren, bei dem man Proteine nach Auftrennung durch Elektrophorese und Blotten (Übertragen) auf eine Nitrozellulosefolie durch die Bindung spezifischer Antikörper sichtbar machen kann. Zu diesem Zweck wurde ein SDS (Natriumlaurylsulfat) Polyacrylamid-Gel (bestehend aus Trenngel und Sammelgel) nach dem in **Tabelle 3** aufgeführten Protokoll gegossen. Die Zellen (Monozyten bzw. HT-29/B6 Zellen) wurden in Probenpuffer lysiert und bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt. Äquivalente Mengen jeder Probe sowie des Größenmarkers wurden auf das Gel aufgetragen. Die SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V in Elektrophorese-Laufpuffer für ca. 1,5 h, bis die Lauffront am Ende des Gels angekommen war. Die aufgetrennten Proteine wurden für 55 min bei 250 mA in Transferpuffer auf den Nitrozellfilter übertragen, für 60 min mit 5% Trockenmilch-PBS-T blockiert, dreimal mit ca. 20 ml PBS-T gewaschen und mit dem primären Antikörper (IL-1 β , Konzentration 2 μ g/ml) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nun erfolgten nach erneuter Waschung die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten

Sekundärantikörper (Anti-Maus, 1:2000 verdünnt), ein erneuter Waschgang und die Zugabe der ECL-Reagenzien für eine Minute nach Herstellerangaben. Die Intensität der Banden wurde durch Chemilumineszenz visualisiert.

Statistik

Die Ergebnisse sind, wenn keine Normalverteilung vorlag, als Median dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde bei zwei Vergleichsgruppen durch den Student's t-Test für normalverteilte Daten und den Mann-Whitney-U-Test für nicht normal verteilte Daten ermittelt. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% festgelegt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Alle statistischen Berechnungen sowie die Erstellung der Graphiken wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.00; GraphPad Software, La Jolla, USA) vorgenommen.

Ergebnisse

Charakteristika der Patientenproben

Die Kontrollgruppe bestand aus vier Patienten. Elf Patientenproben von Patienten mit aktivem, ileozökalem oder kolonischem MC bzw. acht Patientenproben von Patienten mit therapierefraktärer CU wurden untersucht.

Makrophagen in der Lamina propria bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Makrophagen-Subtypen

Sowohl in den Darmpräparaten von gesunden Kontrollen als auch bei CED-Patienten fanden sich CD68⁺-Zellen direkt subepithelial in der Lamina propria. CD68⁺ ist ein genereller Oberflächenmarker für residente intestinale Makrophagen. Allerdings war die Anzahl der CD68⁺-Zellen bei Patienten mit MC – und etwas weniger ausgeprägt auch bei Patienten mit CU – deutlich höher als bei gesunden Kontrollen. Zudem verloren sie in der Entzündung ihr striktes Vorkommen direkt unter dem Epithel. Weitere Färbungen zeigten, dass die residenten Makrophagen im gesunden Darm CD163⁺ und Stabilin-1⁺ sind. Beides sind Oberflächenmarker, die für den anti-inflammatorischen M2-Phänotyp charakteristisch sind und zu den *scavenger*-Rezeptoren zählen [117], was eine konstante Präsenz der regulatorischen M2- Makrophagen in der Lamina propria des nicht-entzündeten Darms belegt (**Abbildung 4**). Bei CED-Patienten (sowohl MC als auch CU) waren diese Zellen ebenfalls erhöht. Jedoch fand sich nur im entzündeten Darm und hier insbesondere bei Patienten mit MC eine massive Akkumulation von sowohl iNOS⁺- ($p < 0,001$) als auch TNF α ⁺- ($p < 0,001$) Makrophagen. Eine Invasion von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen in dieses Kompartiment tritt also bei Patienten mit einer CED auf (**Abbildung 5**).

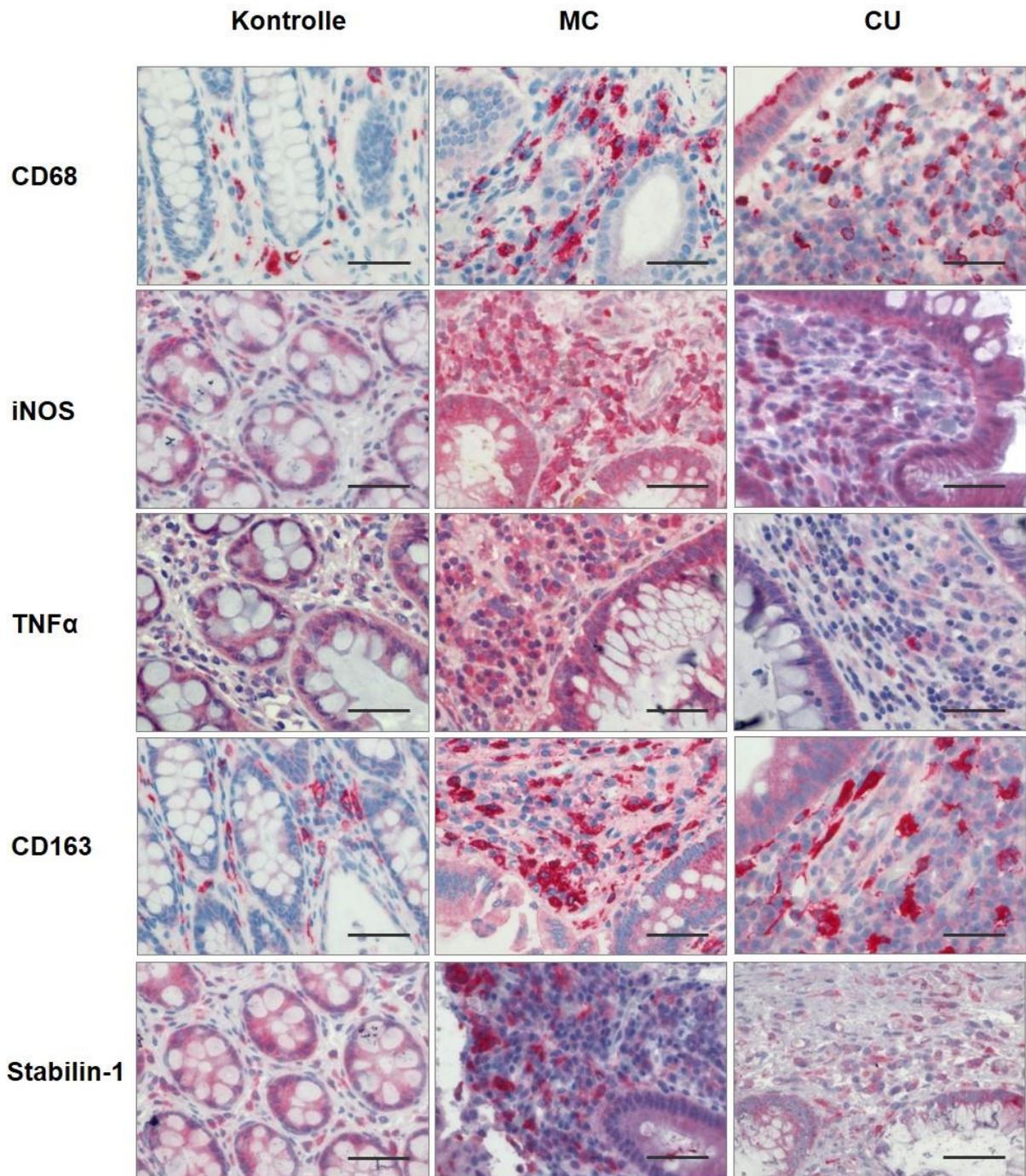


Abbildung 4. Makrophagen-Subpopulationen in der Lamina propria - Immunhistochemie.

Intestinale Resektionspräparate von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollen wurden immunhistochemisch mit CD68 als genereller Makrophagen-Marker, iNOS und TNF α als M1-Marker sowie CD163 und Stabilin-1 als M2-Marker gefärbt. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Immunhistochemie in 400-facher Vergrößerung; die Striche repräsentieren 50 μ m.

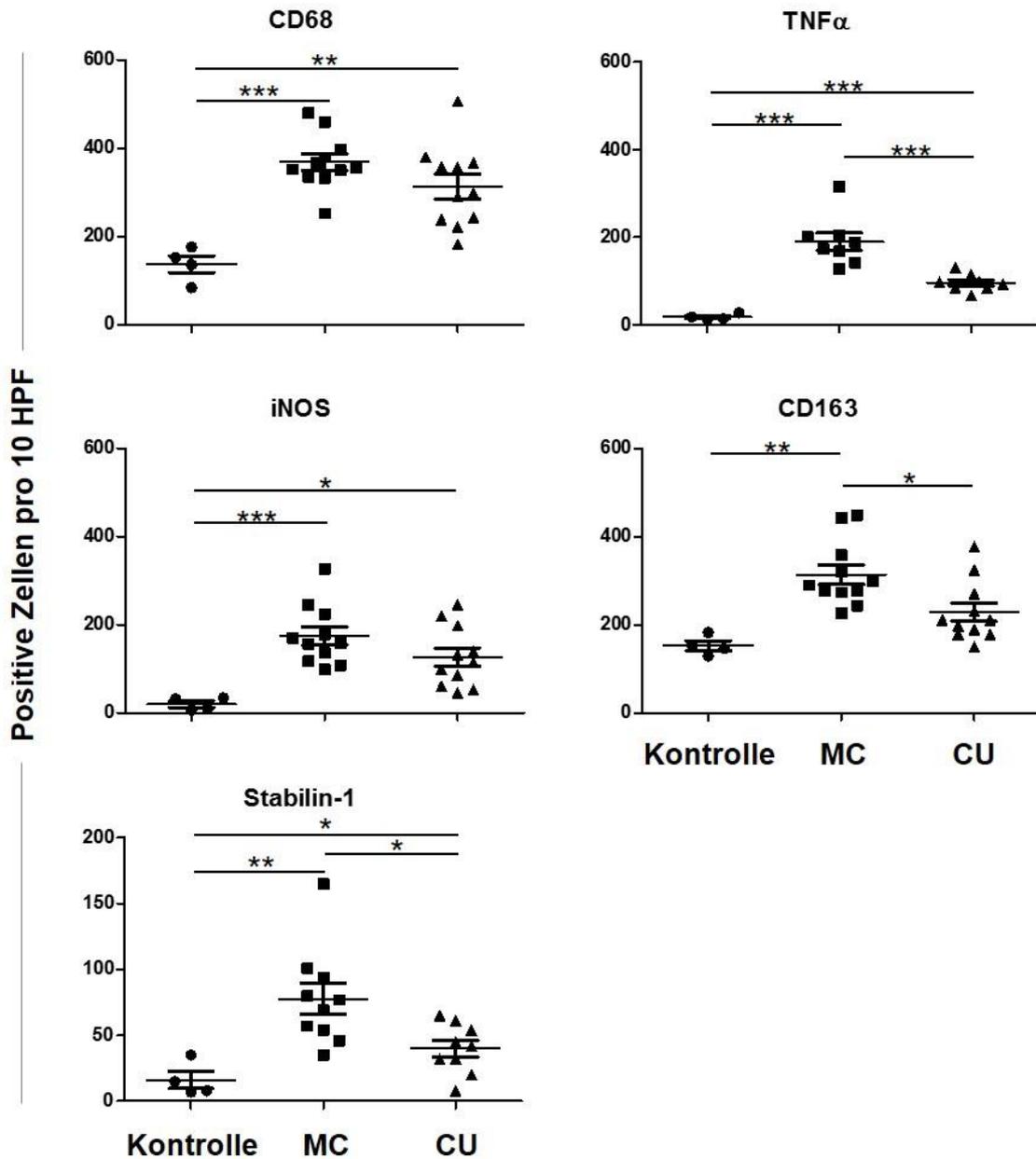


Abbildung 5. Makrophagen-Subpopulationen in der Lamina propria - Auswertung. Die Abbildungen zeigen die Auszählung der Immunhistochemie-Schnitte von Kontrollen und Patienten mit Morbus Crohn (MC) sowie Colitis ulcerosa (CU) bezüglich CD68⁺, iNOS⁺, TNF α ⁺, CD163⁺ und Stabilin-1 aus 10 *high power fields* (HPF), n=4-11; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen

Entscheidend für die intestinale Homöostase ist das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zellen. Im Falle der CED ist dieses Gleichgewicht verschoben: Die iNOS⁺/CD163⁺-Ratio lag bei MC-Patienten ($p < 0,001$) und CU-Patienten ($p < 0,01$) verglichen mit gesunden Kontrollen deutlich verschoben in Richtung der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen (**Abbildung 6**).

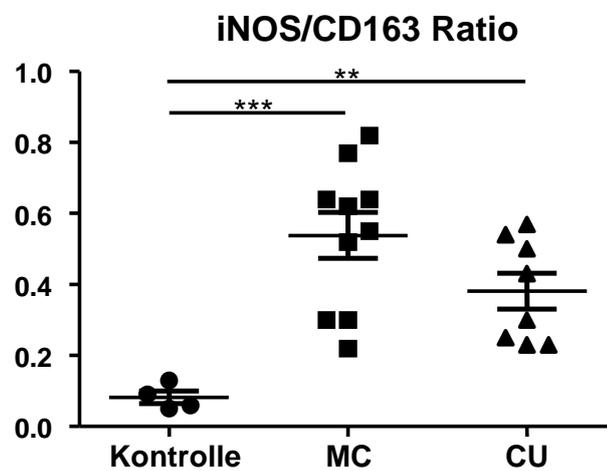


Abbildung 6. iNOS/CD163-Ratio. Die Abbildung zeigt die Ratio von iNOS⁺ zu CD163⁺ Zellen aus 10 *high power fields* (HPF); n=4-11; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

***In-vitro* generierte Monozyten und Makrophagen**

Morphologie

Die Monozyten bzw. Makrophagen-Subtypen unterschieden sich morphologisch nach ein- bzw. sechstägiger Kultur deutlich voneinander (**Abbildung 7**). Monozyten waren kleiner und wiesen eine rundliche Form auf. M1-Makrophagen waren ebenfalls rundlich, aber deutlich größer und mit typischer spiegelei-ähnlicher Morphologie [118]. M2-Makrophagen besaßen längliche Ausläufer, hatten eine Spindel-Konfiguration und erinnerten in ihrem Aussehen an Fibroblasten.

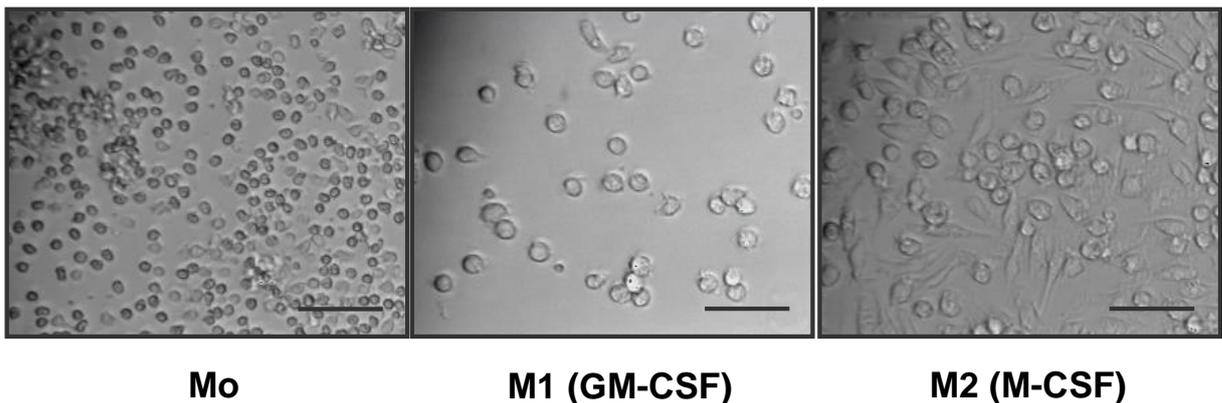


Abbildung 7. *In-vitro*-polarisierte Makrophagen-Subtypen - Morphologie.

Die Abbildung zeigt repräsentative Phasenkontrast-Mikroskopie-Bilder von kultivierten Monozyten (Mo), M1- oder M2-Makrophagen (Vergrößerung 40-fach). GM-CSF = *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, M-CSF = *Macrophage-colony stimulating factor*. Die Striche repräsentieren 100 µm.

Oberflächenmarker

Auch anhand der Oberflächenmarker ließen sich die verschiedenen Zellpopulationen gut voneinander unterscheiden (**Abbildung 8**). Monozyten waren naturgemäß CD14⁺, außerdem CD163⁻. M1-Makrophagen zeichneten sich durch eine hohe Expression von HLA-DR aus, wohingegen ein CD163^{high}CD14^{high}-Phänotyp charakteristisch für M2-Makrophagen war.

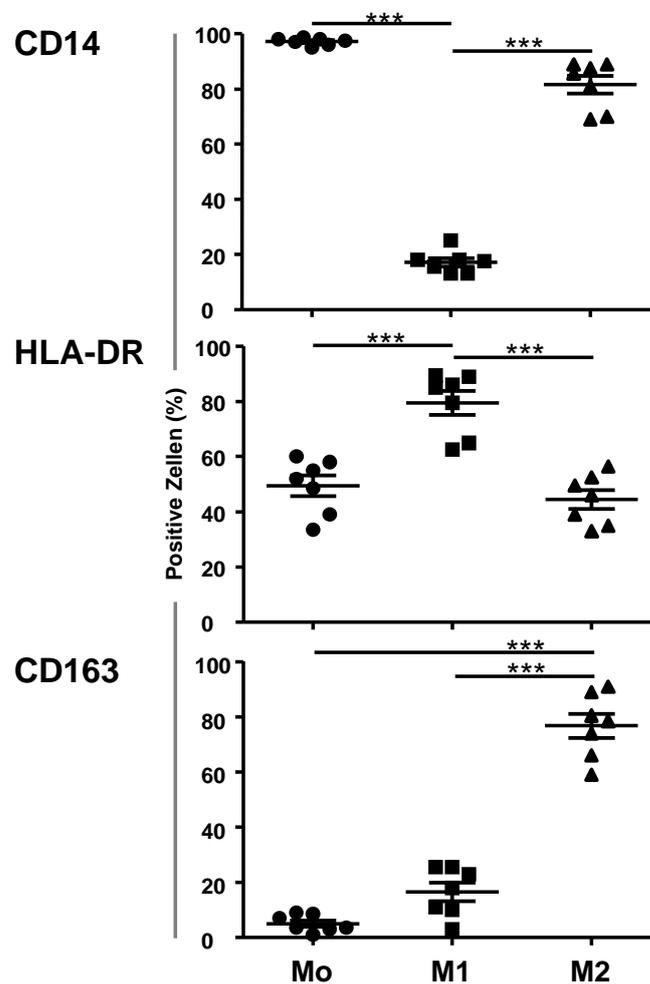


Abbildung 8. *In-vitro*-polarisierte Makrophagen-Subtypen - Oberflächenprofil.

Die Abbildung zeigt die Expression der Oberflächenmarker CD14, HLA-DR und CD80 in der Durchflusszytometrie; n=7; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Inflammasom in Monozyten

Nur Monozyten exprimieren große Mengen des Inflammasom-abhängigen Zytokins IL-1 β . Die vorbekannte Abhängigkeit der Inflammasom-Aktivierung durch zwei erforderliche Schritte bestätigte sich: Durch die Kombination eines ersten Signals durch LPS (TLR-Stimulation) mit einem zweiten Signal durch Adenosintriphosphat (ATP) (Caspase-Aktivierung) steigerte sich die IL-1 β -Sekretion von Monozyten zeitabhängig drastisch (**Abbildung 9**). Durch die Zugabe von Pralnacasan, einem Caspase-1-Inhibitor, wurde die Produktion von IL-1 β durch die Monozyten erfolgreich verhindert, was an der deutlich niedrigeren IL-1 β -Konzentration im Überstand sichtbar wird. **Abbildung 10** zeigt die korrespondierenden Western Blots der Monozyten-Zelllysate desselben Versuches: Durch LPS wird intrazellulär vermehrt pro-IL-1 β produziert (dickere Bande in Höhe von 35 kDa). Durch Zugabe von ATP, insbesondere zeitabhängig nach einer Inkubation von 20 bzw. 30 Minuten, wird pro-IL-1 β in aktives IL-1 β (Bande bei 17kDa) gespalten. Dieser Effekt wird durch die Zugabe des Caspase-Inhibitors Pralnacasan erfolgreich inhibiert.

In **Abbildung 11** zeigt im Western Blot ebenfalls die bekannte zweisechrittige Inflammasom-Aktivierung in Monozyten: Pro-IL-1 β (bei 35 kDa) wird vermehrt in denjenigen Monozyten nachgewiesen, die mit LPS stimuliert wurden. Und nur nach dem *second hit* mit ATP sieht man hier eine Prozessierung zu aktivem IL-1 β (17 kDa). Außerdem wird durch diesen Blot deutlich, dass in HT-29-Zellen durch Stimulation mit LPS oder die Kombination LPS/ATP keine (pro-)IL-1 β -Expression zu induzieren war.

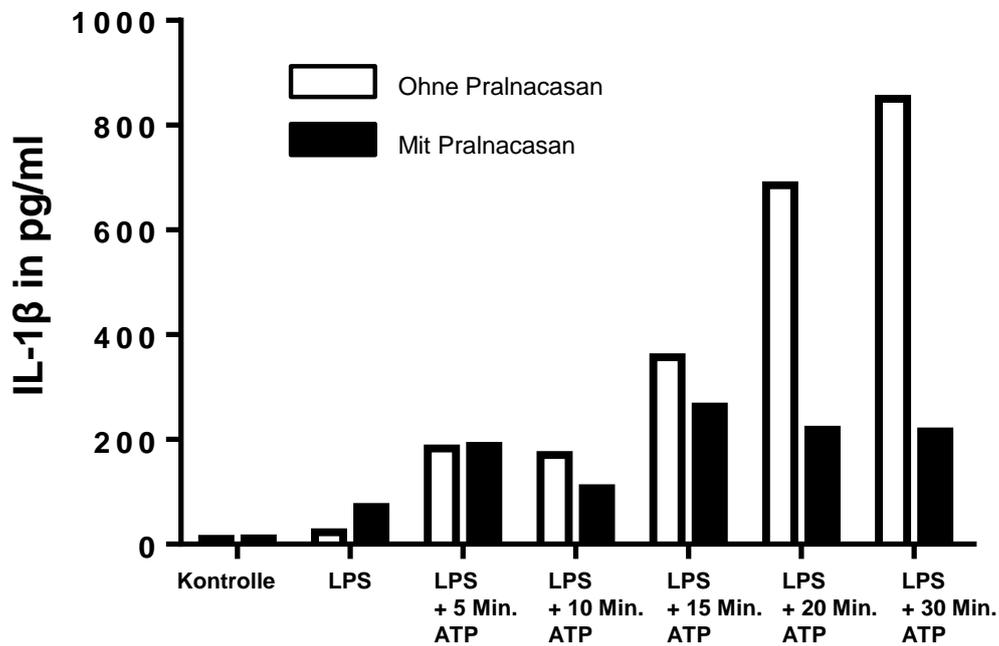


Abbildung 9. Inflammasom-abhängige Produktion von IL-1 β durch Monozyten *in vitro* - ELISA.

Die Abbildung zeigt die IL-1 β -Konzentration im Überstand von Monozyten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) für 12 h und ggf. ATP (10 mM) für 5, 10, 15, 20 oder 30 Minuten und ggf. Zugabe von Pralnacasan, einem Caspase-1-Inhibitor (10 μ M). n=1.

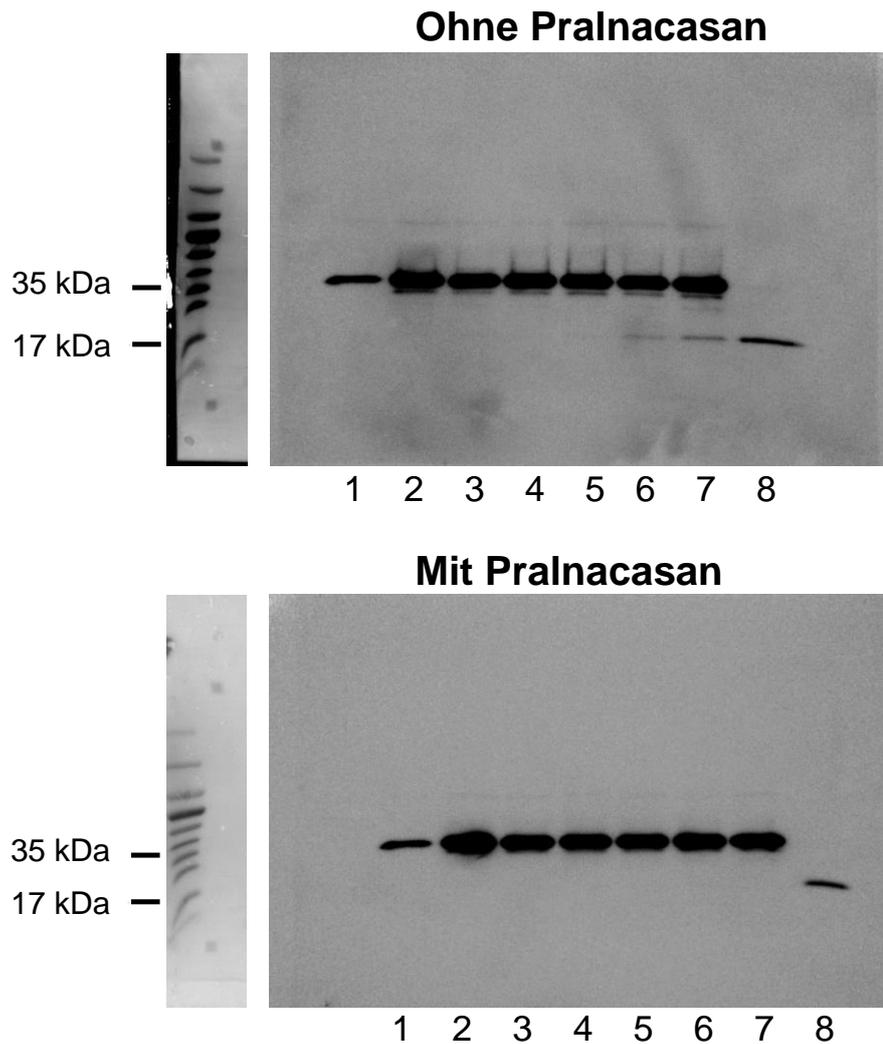


Abbildung 10. Inflammasom-abhängige Produktion von IL-1 β durch Monozyten *in vitro* - Western Blot. Die Abbildung zeigt Western Blots aus Monozyten-Lysaten nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) für 12h und ggf. ATP (10 mM) für 5, 10, 15, 20 oder 30 Minuten, ggf. mit Zugabe von Pralnacasan, einem Caspase-1-Inhibitor (10 μ M). Die Bande von pro-IL-1 β zeigt sich bei 35 kDa, die Bande von aktivem IL-1 β bei 17 kDa.

Legende:

- 1: Kontrolle
- 2: LPS
- 3: LPS + 5 Min. ATP
- 4: LPS + 10 Min. ATP
- 5: LPS + 15 Min. ATP
- 6: LPS + 20 Min. ATP
- 7: LPS + 30 Min. ATP
- 8: Kontrolle rekombinantes humanes IL-1 β

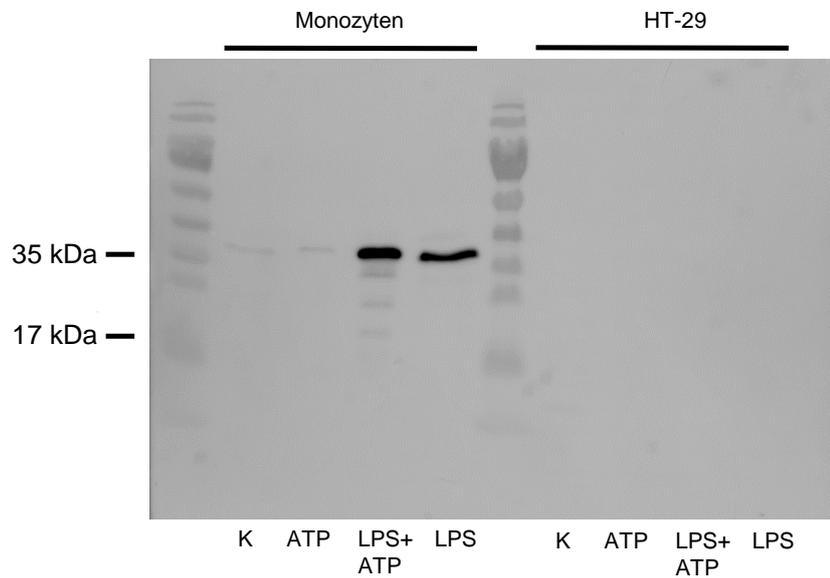


Abbildung 11. Inflammasom-abhängige Produktion von IL-1 β durch Monozyten und HT-29 *in vitro* - Western Blot.

Die Abbildung zeigt Western Blots aus Monozyten- bzw. HT-29-Lysaten ohne Stimulation (K = Kontrolle) bzw. nach Stimulation mit ATP (10 mM) für 15 Minuten und ggf. mit LPS (100 ng/ml) für 4 h. Die Bande von pro-IL-1 β zeigt sich bei 35 kDa, die Bande von aktivem IL-1 β bei 17 kDa.

Makrophagen-Subtypen und Effekt auf die epitheliale Barriere

Epitheliale Integrität

Um den Effekt der verschiedenen Zellpopulationen auf die epitheliale Barriere zu untersuchen, wurden Mo, M1- oder M2-Makrophagen mit verschiedenen Epithelzelllinien co-kultiviert. Hierbei ist der gemessene transepitheliale Widerstand R_t ein Marker für die epitheliale Integrität. Beginnend 24 h nach gemeinsamer Inkubation, verursachten M1-Makrophagen einen massiven Abfall im Widerstand R_t des T84-Zellrasens verglichen mit Kontrollen und Monozyten bzw. M2-Makrophagen (**Abbildung 12**). Der Effekt war nach 54 h am stärksten ausgeprägt (M1-Makrophagen *versus* Kontrolle $p < 0,001$, *versus* Monozyten $p < 0,001$ und *versus* M2-Makrophagen $p < 0,05$), so dass dieser Zeitpunkt für alle weiteren Untersuchungen ausgewählt wurde. Die Inkubation von M1-Makrophagen mit Caco-2 Zellen resultierte in ähnlichen Widerstandsverlusten ($p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,01$ im Vergleich zu Mo oder M2-Makrophagen, **Abbildung 13**). Dieser Effekt war durch Makrophagen-Stimulation mit LPS noch deutlich verstärkt. Bei HT29/B6-Zellen war der Widerstandsverlust nur nach LPS-Stimulation der Makrophagen nachweisbar und hier besonders deutlich sichtbar bei Monozyten ($p < 0,01$) und M1-Makrophagen ($p < 0,05$). Der gravierende Effekt durch LPS-Stimulation war bei allen Epithelzelllinien in einem geringeren Ausmaß auch für die Monozyten und die M2-Makrophagen zu erkennen. LPS alleine hatte jedoch keinen Einfluss auf den epithelialen Widerstand.

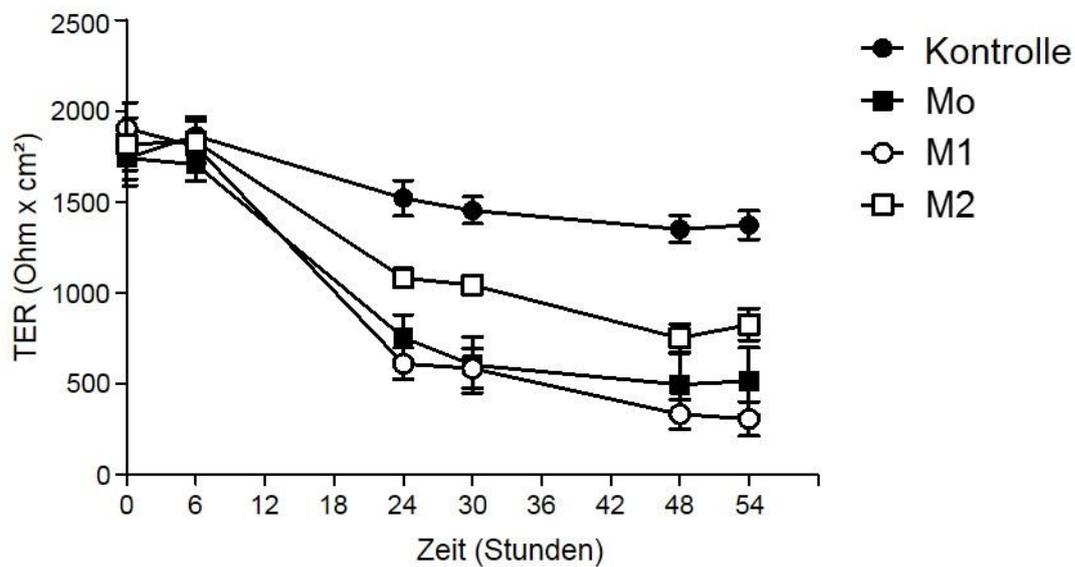


Abbildung 12. Effekt von Makrophagen-Subtypen auf die epitheliale Barriere – zeitlicher Verlauf.

Monozyten (Mo), M1- und M2-Makrophagen wurden mit T84-Epithelzellen co-kultiviert. Die Abbildung zeigt den Effekt der Co-Kultur mit LPS (100 ng/ml) auf den Widerstand (TER = *transepithelial resistance*) der Epithelzellen nach 0, 6, 24, 30, 48 und 54 h. Der TER ist als Absolutwert ausgedrückt. n=8-22; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

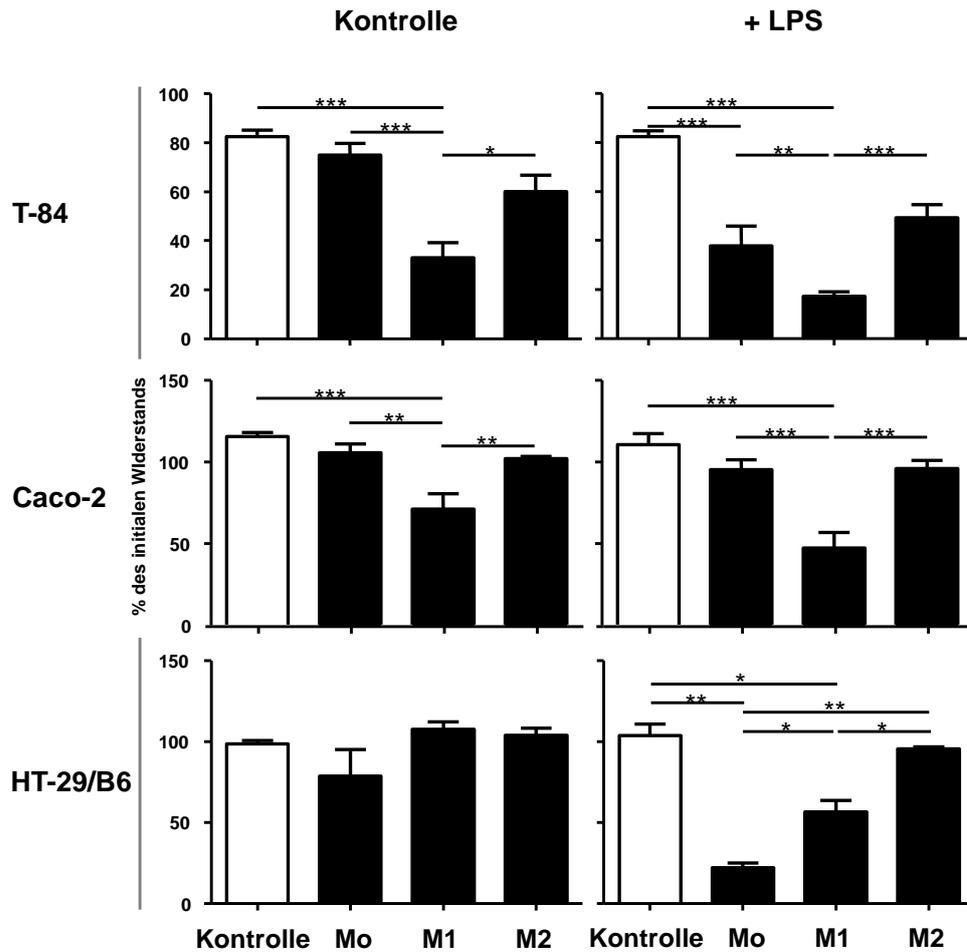


Abbildung 13. Effekt von Makrophagen-Subtypen auf die epitheliale Barriere nach 54 h.

Monozyten (Mo), M1- und M2-Makrophagen wurden mit verschiedenen Epithelzelllinien (T84, Caco-2, HT-29/B6) co-kultiviert. Die Abbildung zeigt den Effekt der Co-Kultur mit oder ohne LPS (100 ng/ml) auf den transepithelialen Widerstand der Epithelzellen nach 54 h, der in Prozent des initialen Widerstandes ausgedrückt ist. T84, Caco-2: n=8-22; HT-29/B6: n=3; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Analyse der Makrophagen vor und nach Co-Kultur

Zytokine im Überstand

Da es keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Immunzellen und Epithelzellen gab, lag ein Zytokin-vermittelter Effekt nahe. **Abbildung 14** zeigt die Messungen der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 und IL-10 im Überstand der Co-Kulturen. Die Zellpopulationen unterschieden sich bezüglich ihres Zytokinprofils deutlich, sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulation. Sehr hohe $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen fanden sich im Überstand der M1-Makrophagen und in etwas geringerem Ausmaß auch im Mo-Überstand. Im Gegensatz dazu war das dominante Zytokin der M2-Makrophagen IL-10 .

Oberflächenmarker

Um zu verstehen, welchen Einfluss die Co-Kultur mit den Epithelzellen auf die Monozyten bzw. Makrophagen hatte, wurden vor und nach dem Experiment die Oberflächenmarker der Immunzellen durchflusszytometrisch bestimmt (**Abbildung 15**). Hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Expression, was eine stabile Polarisierung unterstreicht.

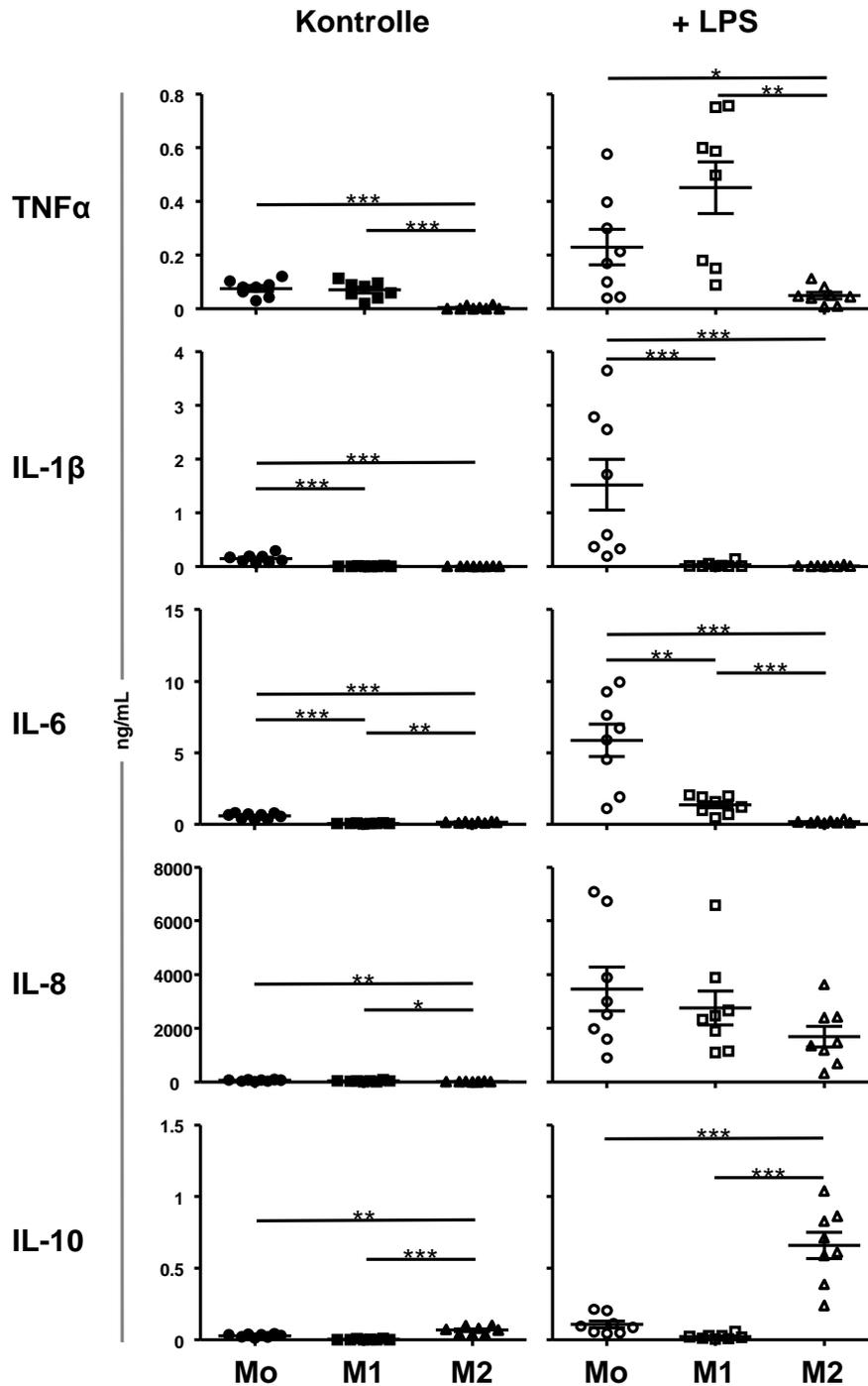


Abbildung 14. Zytokinprofil von Monozyten und Makrophagen *in vitro*.

Die Abbildung zeigt die Zytokinkonzentration in den Überständen der Co-Kulturen mit Monozyten (Mo), M1- und M2-Makrophagen, gemessen im *cytometric bead array*. n=8-10; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

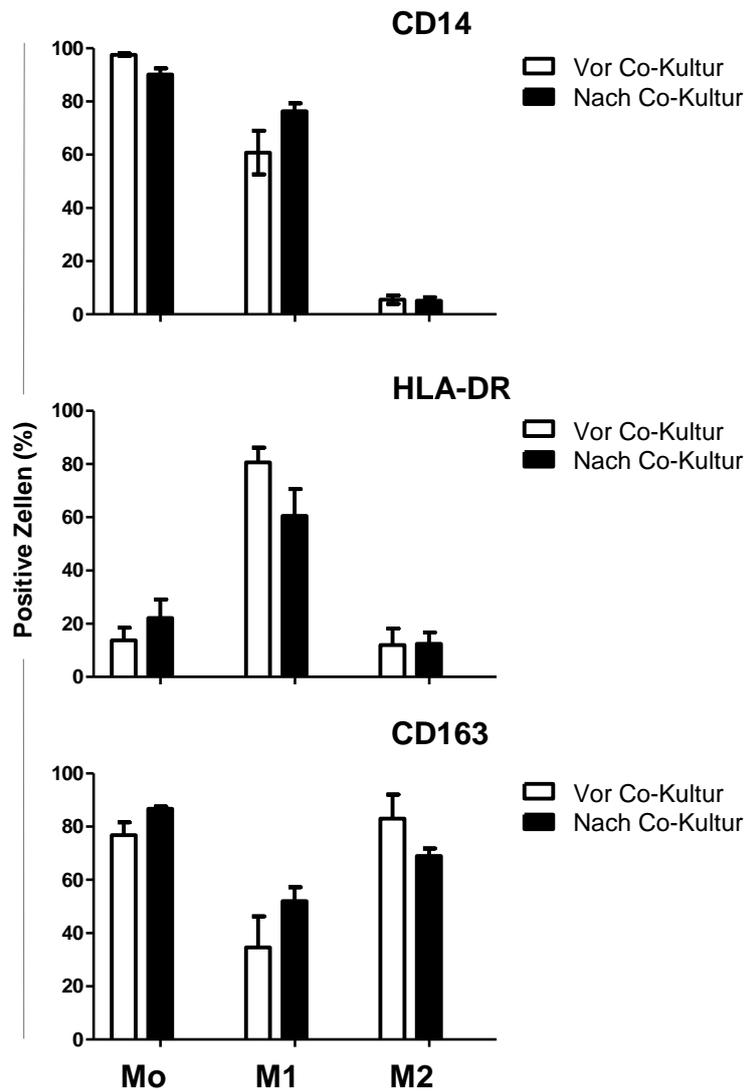


Abbildung 15. Effekt der Co-Kultur auf die Makrophagen-Polarisierung

Die Abbildung zeigt die Expression der Oberflächenmarker CD14, HLA-DR und CD80 in der Durchflusszytometrie vor und nach Co-Kultur mit der Epithelzelllinie T84 nach Stimulation mit LPS. n=4

Deregulation von Tight Junction-Proteinen

Um zu evaluieren, ob die Zerstörung der epithelialen Barriere durch Leckage aufgrund von deregulierten TJ-Proteinen bzw. Adhäsionsproteinen zustande kommt, wurden Claudin-2, JAM-1 und ZO-1 mittels Immunfluoreszenz-Färbung untersucht.

Die Claudin-2-Färbung zeigte, dass dieses Protein im Zytoplasma der nicht-behandelten, aber auch der Mo-exponierten Epithelzellen lokalisiert war. Nur nach Co-Kultur mit M1-Makrophagen und geringer mit M2-Makrophagen wurde dieses Protein an der Zellmembran exprimiert, das heißt, nur in diesen Konditionen kam der Poren-bildende Effekt zum Tragen (**Abbildung 16**).

Die Immunfluoreszenz-Visualisierung von ZO-1 zeigte eine Herunterregulation dieses Proteins in den Epithelzellen, die mit Mo oder M1-Makrophagen co-kultiviert wurden. M2-Makrophagen übten diesen Effekt jedoch nicht aus (**Abbildung 16** und **17**). Interessanterweise fand in allen Konditionen außer der Kontrolle eine Redistribution von JAM-1 in Vesikeln ins Zytoplasma statt, was normalerweise an der Zelloberfläche vorkommt (**Abbildung 17**). Die Visualisierung des epithelialen Zellrasens zeigte eine reguläre, ebene Oberfläche mit einer homogenen Verteilung von ZO-1 und JAM-1 vor allem an der luminalen Seite der Kontroll-Epithelzellen (**Abbildung 17**). Diese ebenmäßige Architektur war jedoch zerstört in jenen Zellen, die mit Mo und M1-Makrophagen co-kultiviert worden waren. Hier zeigte sich eine deutlich irregulär geformte Oberfläche mit inhomogener Proteinexpression und Redistribution an basolaterale Anteile der Epithelzelle.

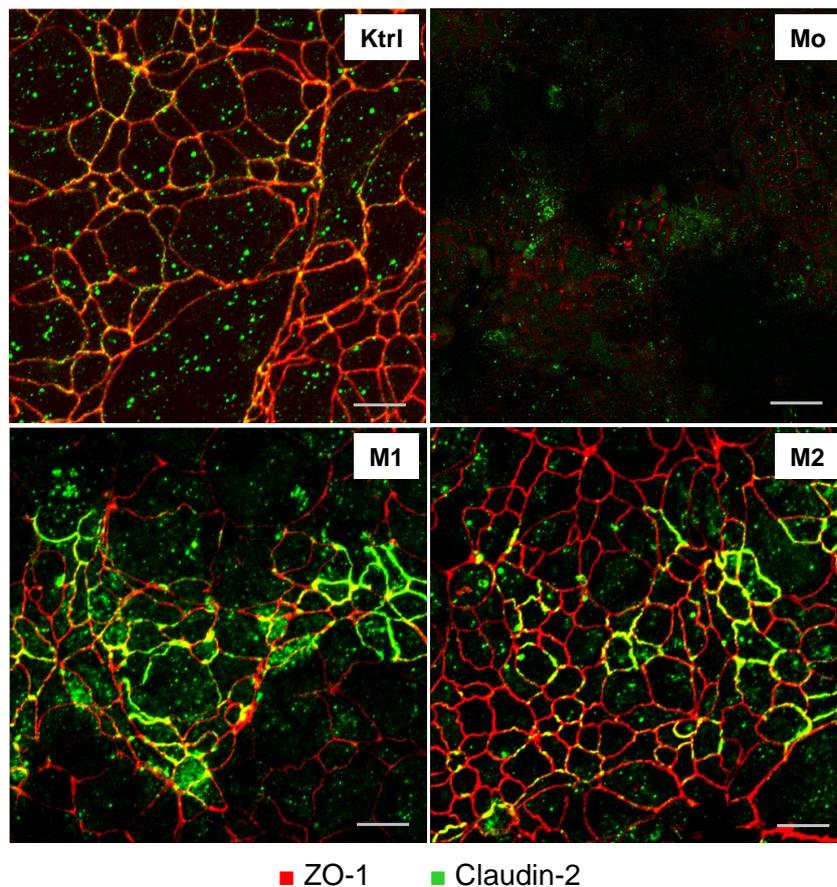


Abbildung 16. Effekt der Monozyten und Makrophagen auf die Expression von ZO-1 und Claudin-2.

Die Abbildung zeigt die Expression von Zonula occludens-1 (ZO-1, rot) und Claudin-2 (grün) nach Co-Kultur mit Monozyten (Mo), M1- bzw. M2-Makrophagen oder ohne Zellen (Kontrolle, Ktrl) in der Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt sind repräsentative Bilder, n=4. Vergrößerung 40-fach; die Striche repräsentieren 10 µm.

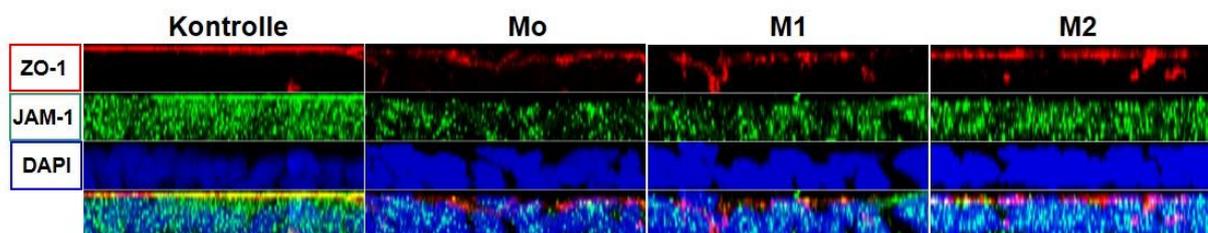
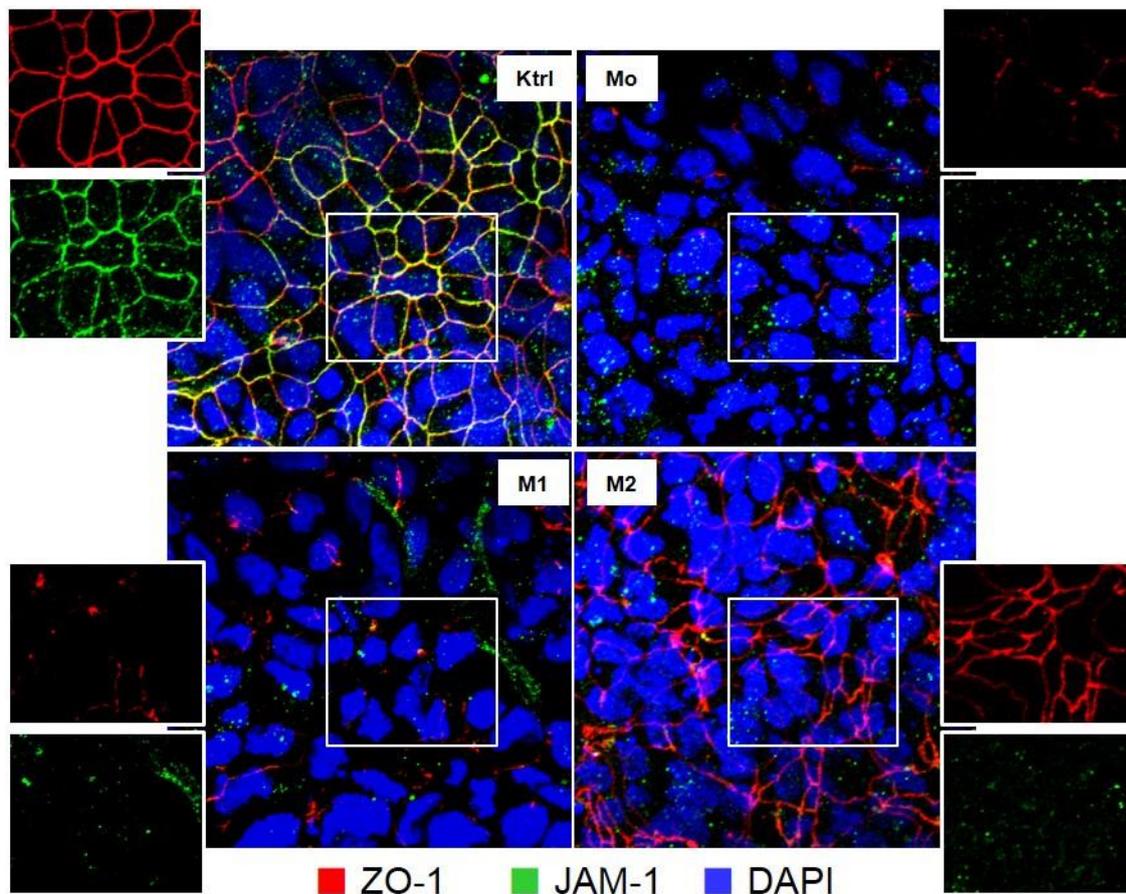


Abbildung 17. Effekt der Monozyten und Makrophagen auf die Expression von ZO-1 und JAM-1.

Oben: Die Abbildung zeigt repräsentative *z-stack*-Projektionen (n=4). Die vergrößerten Areale zeigen Ausschnitte im Mono-Farben-Modus. Die Abbildung zeigt die Expression von Zonula occludens-1 (ZO-1, rot) und *junctional adhesion molecule-1* (JAM-1, grün) nach Co-Kultur mit Monozyten (Mo) oder M1- bzw. M2-Makrophagen oder ohne Zellen (Kontrolle, Ktrl) in der Immunfluoreszenzfärbung. In blau sind die Zellkerne durch Färbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Bilder, n=4. Vergrößerung 40-fach; die Striche repräsentieren 10 µm.

Unten: Die Verteilung der Proteine ZO-1 und JAM-1 sowie der Zellkerne (DAPI-Färbung) im Zellrasen ist durch überlappende frontale Schnitte der gefärbten T84-Filter dargestellt.

Zytokinblockade

Da die Immunzellen große Mengen an Zytokinen produzieren, lag ein Zytokin-vermittelter Epithelschaden nahe. Der durch LPS-Stimulation verstärkte Effekt des Monozyten- und Makrophagen-vermittelten Epithelschadens verstärkte diese Vermutung. Im Überstand der Co-Kulturen mit den drastischsten Effekten auf die epitheliale Barriere (M1 bzw. Mo) fanden sich die höchsten Konzentrationen von TNF α bzw. IL-1 β , sodass diese Zytokine für weitere Blockade-Strategien ausgewählt wurden.

Blockade von TNF α

Tatsächlich konnte der Epithel-zerstörende Effekt der M1-Makrophagen effektiv durch die TNF α -Blockade mittels des neutralisierenden Antikörpers Infliximab reduziert werden ($p < 0,01$, **Abbildung 18**). Gleiches traf auch auf den Effekt der Monozyten zu. Infliximab alleine übte keinen Einfluss auf den epithelialen Widerstand aus.

Blockade des Inflammasoms

Auch die Inflammasom-abhängigen Zytokine IL-1 β und IL-18 wurden durch entsprechende Antikörper blockiert. Durch diese Blockade konnte allerdings nur der Effekt der Monozyten effektiv antagonisiert werden. Sowohl Anakinra ($p < 0,05$), ein IL-1-Rezeptorantagonist, als auch ein spezifischer monoklonaler Anti-IL-18-Antikörper ($p < 0,001$) waren in der Lage, den Integritätsverlust zumindest teilweise aufzuheben (**Abbildung 18**). Der Effekt von polarisierten Makrophagen wurde hierdurch allerdings nicht beeinflusst. Ebenso hatten die Antikörper alleine keine Auswirkung auf den epithelialen Widerstand.

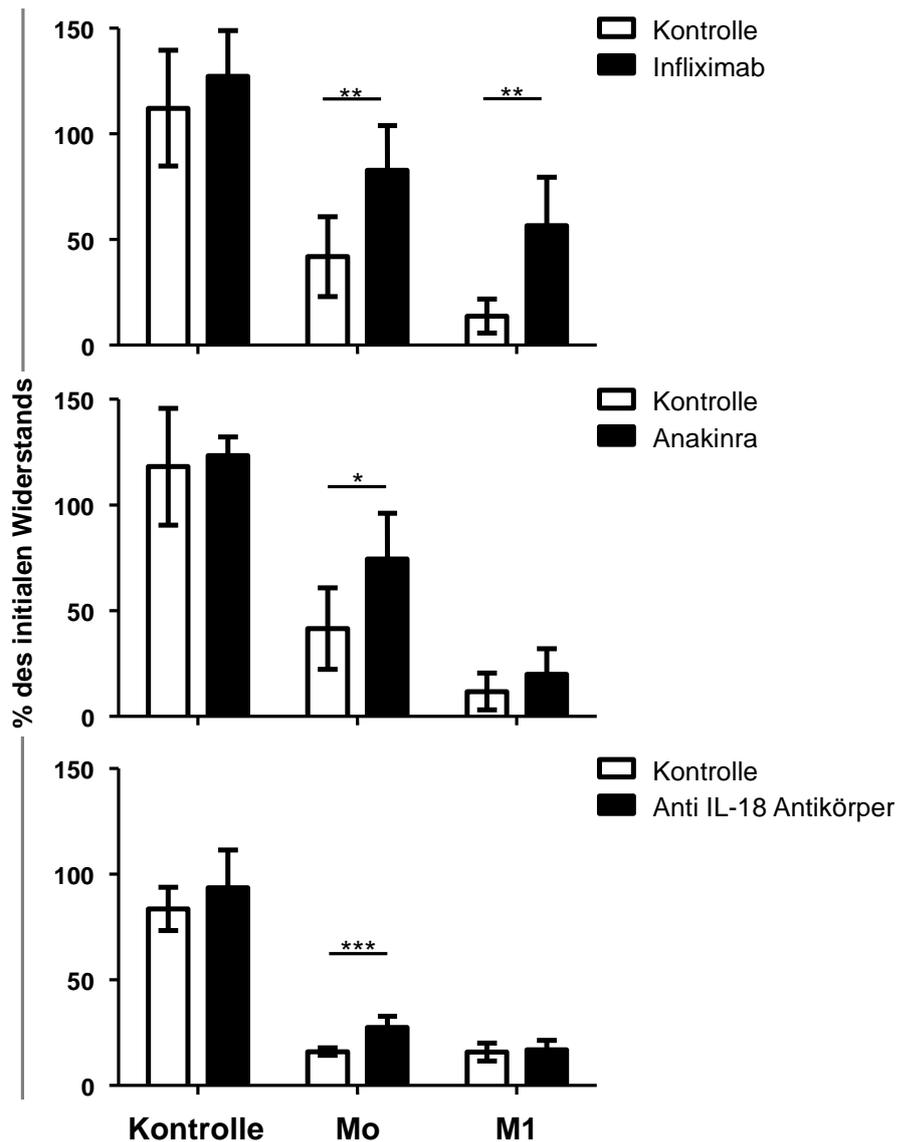


Abbildung 18. Effekt von Zytokin-Antagonisierung auf den Monozyten- / Makrophagen-vermittelten Epithelschaden.

Dargestellt ist der epitheliale Widerstand R^t des Epithelzellrasens nach 54 h Co-Kultur mit Monozyten (Mo) oder M1-Makrophagen, LPS (100 ng/mL) sowie der basolateralen Zugabe von entweder Infliximab (10 μ g/ml), Anakinra (15 μ g/ml) oder einem anti-IL-18-Antikörper (1 μ g/ml). Der epitheliale Widerstand ist als Prozent des initialen Widerstandes angegeben. n=5-12; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Diskussion

Die Präsenz von mukosalen mononukleären Phagozyten, also dendritischen Zellen, Monozyten und residenten Makrophagen, im gesamten Gastrointestinaltrakt des Menschen, auch oder gerade im entzündungsfreien Zustand, ist gut beschrieben [51]. Die residenten Makrophagen sind Schlüsselzellen beim Detektieren von pathologischen und kommensalen Mikroben und tragen zur Aufrechterhaltung der Integrität des Epithels bei [119, 120]. Im Rahmen einer intestinalen Entzündung können jedoch aus dem Knochenmark stammende Monozyten für eine weitere Infiltration von Makrophagen in die Mukosa sorgen [121]. Diese weisen verglichen mit den residenten Makrophagen einen differenten Phänotyp mit höherer Expression von co-stimulatorischen Molekülen, pro-inflammatorischen Rezeptoren sowie vermehrter pro-inflammatorischer Zytokin-Produktion auf [52-56]. Da die Störung der Epithelbarriere einen wichtigen Mechanismus im Rahmen der CED-Entstehung darstellt, beschäftigte sich diese Arbeit mit dem spezifischen Effekt dieser mukosalen pro-inflammatorischen Makrophagen auf die Integrität des Epithels. Die Hypothese hierbei lautete, dass pro-inflammatorische M1-Makrophagen die Barrierefunktion des Epithels durch ihre Zytokin-Produktion direkt stören und so zur intestinalen Entzündung beitragen.

Die *in-vivo*-Färbungen in dieser Arbeit zeigen, dass pro-inflammatorische iNOS⁺ und TNF α ⁺ M1-Makrophagen bei CED-Patienten, insbesondere beim MC, die Lamina propria des entzündeten Darms massiv infiltrieren und die regulatorischen Makrophagen verdrängen. Die Zytokinproduktion, insbesondere TNF α , IL-1 β und/oder IL-18, durch pro-inflammatorische M1-Makrophagen und Monozyten, führte in einem neu etablierten *in-vitro*-Modell aus mononukleären phagozytierenden Zellen und Epithelzellen zu einer signifikanten Störung der epithelialen Integrität, gemessen an einem Verlust des epithelialen Widerstandes. Mechanistisch geschah dies durch Induktion einer parazellulären Leckage durch deregulierte TJ-Proteine wie Claudin-2, ZO-1 und JAM-1. Konsequenterweise führte eine Blockade dieser Zytokine, insbesondere TNF α , zu einer signifikanten Regeneration des zerstörten Epithels, was eine weitere Erklärung für den Erfolg von TNF α -Inhibitoren bei CED-Patienten darstellt.

Makrophagen-Subpopulationen – alles nur Theorie?

In dieser Arbeit wurde die Einteilung in M1- und M2-Makrophagen gemäß früherer Publikationen gewählt [43, 44, 46, 111, 122]. Die Klassifikation von Makrophagen-Subpopulationen ist jedoch aus verschiedenen Gründen schwierig und die Terminologie in der Literatur demgemäß nicht einheitlich: Auf der einen Seite gibt es bei der Nomenklatur experimentell generierter Makrophagen (je nach verwendeten Kultur-Bedingungen, Oberflächenmarkern und Zytokinen) verschiedene, sich teilweise überlappende, teilweise divergente Begriffsdefinitionen der verschiedenen Arbeitsgruppen. Die Vielzahl der Definitionen wächst zudem aufgrund des technischen Fortschritts mit der Möglichkeit, durchflusszytometrisch immer mehr Oberflächenmoleküle auf einmal zu detektieren, weiter an. Auf der anderen Seite sind dichotome Einteilungen aufgrund der ausgeprägten biologischen Plastizität und ständigen Wandelbarkeit von Makrophagen naturgemäß nicht in der Lage, das breite Spektrum biologischer Funktionen dieser Zellen abzubilden.

Verglichen mit anderen Geweben ist eine Besonderheit des Makrophagen-Kompartiments im Darm die Zusammensetzung aus residenten und „mobilen“ Makrophagen: In der fetalen und neonatalen Periode besiedeln embryonale Vorstufen von Makrophagen den Darm (und andere Organe) und zeigen eine ausgeprägte *in situ* Proliferation [28]. Diese Zellen stammen aus dem Dottersack und/oder der fetalen Leber und behalten ihre embryonale Signatur in Leber, Lunge, Milz, Nieren und Gehirn lebenslang bei. Im Darm jedoch persistieren sie nicht bis ins Erwachsenenleben, sondern werden im Verlauf immer wieder durch Ly6C^{high}-Monozyten (teil)ersetzt, die aus dem Blut einwandern und lokal im Darm in mature F4/80^{high}CX3CR1^{high}MHCII⁺ Makrophagen ausreifen [28]. Dieser Prozess ist abhängig vom Chemokin-Rezeptor CCR2 sowie ganz entscheidend auch von der Besiedlung des Darmes durch die Mikrobiota. Ausgereifte Makrophagen behalten zwar teilweise ihre Fähigkeit zur Zellteilung, dieser Mechanismus trägt jedoch nur unwesentlich zur Aufrechterhaltung der Zellpopulation bei; dies geschieht vielmehr durch die konstante Infiltration von Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Blut, was nahelegt, dass der Makrophagen-*turn-over* im Darm deutlich höher ist als in anderen Organen. Die Ausreifung dieser Zellen in Makrophagen-Subtypen geschieht im Darm [28]. Die strikte und sehr grobe Klassifizierung in M1- oder M2-Makrophagen ist eine theoretische Einteilung, die auf einen Vorschlag Anfang der 2000er Jahre von Mills und Kollegen zurückzuführen ist

[122]. Die Arbeitsgruppe wählte diese dichotome, an T-Zellen orientierte Einteilung aufgrund ihrer Erkenntnisse über den Arginin-Metabolismus muriner Makrophagen aus C57BL/6 und Balb/c Mäusen, da sie diesen Effekt gleichermaßen in Th1- und Th2-Zellen derselben Stämme finden konnte. Demgemäß sei der Wechsel zwischen „Entzündungs“- (M1) und „Wundheilungs“-Makrophagen (M2) unabhängig vom erworbenen Immunsystem und geschehe sehr früh in der Evolution [122]. Bezugnehmend auf diese und folgende Arbeiten entstand unser experimenteller Ansatz mit Auswahl der entsprechenden Polarisierungsbedingungen, Oberflächenmarker und Zytokine. Tatsächlich wird diese Einteilung in jüngerer Zeit in der Literatur kritisch gesehen. Eine zwischenzeitlich entdeckte, den Arginin-Transport betreffende genetische Mutation in der *Slc7a2*-Promotorregion in C57BL/6 Mäusen stellt die Einteilung basierend auf dem Arginin-Metabolismus in Frage [123]. Ferner ist eine Makrophagen-Polarisierung unabhängig vom erworbenen Immunsystem fraglich, da Lymphozyten durch ihre Sekretion von Zytokinen wie IFN γ und IL-4 den Aktivierungsstatus von Makrophagen maßgeblich beeinflussen [45]. Für die heterogene Gruppe der M2-Makrophagen wurden in den folgenden Jahren weitere Unterteilungen in M2a-, b- und c-Makrophagen vorgeschlagen [110]. Definitionen anderer Arbeitsgruppen bezogen sich auf die Kultivierungsbedingungen, z.B. M1 für in GM-CSF-1 kultivierte und M2 für in CSF-1 kultivierte Makrophagen [124].

Die uneinheitliche Terminologie und fehlende Standards bezüglich der Generierung und Aktivierung von Makrophagen im experimentellen Setting machten eine neue Nomenklatur notwendig. Murray und Kollegen fordern daher eine Benennung der Makrophagen je nach ihrem Stimulierungsmechanismus, z.B. M(IL-4) für mit IL-4 stimulierte Makrophagen oder M(IFN γ) für durch IFN γ stimulierte Makrophagen usw., so dass eine klar nachvollziehbare Definition die bislang zu uneinheitlich genutzten Begriffe M1- und M2-Makrophagen ersetzen könnte [45]. Dieser Klassifikation zufolge ließen sich die Begriffe M(GM-CSF) für unsere M1- und M(M-CSF) für unsere M2-Makrophagen verwenden. Die Autoren schlagen ferner vor, den bisweilen für M2-Makrophagen verwendeten Begriff „regulatorische“ Makrophagen zu streichen, da alle Makrophagen-Subtypen mehr oder weniger regulatorische Fähigkeiten besitzen. An diese Überlegung angelehnt lässt sich auch erklären, warum der von uns für die M2-Makrophagen verwendete Oberflächenmarker CD163 - ein *scavenger*-Rezeptor, der u.a. für die Phagozytose von Makromolekülen gebraucht wird – mittlerweile als Pan-Makrophagen-Marker angesehen wird [125], da verschiedene Zellfunktionen eben in

allen Makrophagen-Aktivierungsstufen vorkommen können. Bezüglich der Verwendung von Oberflächenmarkern als Definitionshilfe favorisiert die Gruppe die Verwendung einer Kombination mehrerer Marker, da sich diese - anders als bei T-Zellen – je nach spezifischem Stimulus schnell und substantiell ändern können und sich manche Marker auf unterschiedlich aktivierten Makrophagen finden lassen. Ein Beispiel wäre hier neben CD163 auch Arginase-1 als Marker für M2, den man jedoch auch auf M1 und auf manchen residenten Makrophagen finden kann [126]. Dem Anspruch, eine Kombination an Oberflächenmarkern zu verwenden, entspricht unser experimenteller Ansatz.

Letztlich scheint die zu einem gegebenen Zeitpunkt präsente biologische Funktion der unterschiedlich und reversibel aktivierten Makrophagen entscheidend zu sein. Auf der Grundlage dieser Überlegungen lässt sich anhand unserer Ergebnisse sagen, dass ein funktionell pro-inflammatorischer Makrophagen-Subtyp, der sich durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β auszeichnet, vermehrt zum Zeitpunkt der intestinalen Entzündung in den Darm einwandert und durch seine Zytokinproduktion direkt zur Störung der Barrierefunktion beiträgt, wohingegen der funktionell anti-inflammatorische, IL-10-produzierende Subtyp eher in der gesunden Mukosa auftritt und zur Homöostase beiträgt. Die Benennung M1- und M2-Makrophage ist dabei von pragmatischer Bedeutung und fasst trotz der angesprochenen Variabilität die funktionellen Gemeinsamkeiten der Subtypen nicht zuletzt zur Ermöglichung experimenteller Forschungsansätze grob zusammen.

Makrophagen und epitheliale Dysfunktion – was kommt zuerst?

Fraglich ist, ob die Akkumulation der pro-inflammatorischen – und potentiell hyperreagiblen – Makrophagen in der Mukosa von CED-Patienten ein primäres Phänomen ist und dann durch den zytokinbedingten Einfluss auf das Epithel die Entzündungsreaktion erst in Gang bringt, oder ob Makrophagen dieses spezifischen Subtyps erst sekundär zum Ort der Entzündung kommen, nachdem der Epithelschaden schon aufgetreten ist.

Unterstützende Beweise für die erste Theorie kommen von mehreren genetischen Studien, die primäre Defekte in der angeborenen Immunantwort in CED-Patienten beschreiben, wie zum Beispiel die NOD2/CARD15-Mutation [11], Mutationen im Inflammasom [127, 128] oder in TLR-Rezeptoren [35, 129]. Diese Daten suggerieren ein Modell, in dem Makrophagen als prominente Vertreter des angeborenen

Immunsystems eine gestörte Immunantwort auf harmlose Darmflora mit unangemessener Aktivierung des NF- κ B -Weges aufweisen und so eine Dysfunktion der epithelialen Barriere nach sich ziehen. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, da hier der Epithelschaden erst sekundär durch lösliche Mediatoren aus den pro-inflammatorischen Makrophagen auftrat. Eine gestörte Makrophagen-Polarisation hin zum pro-inflammatorischen Subtyp ist in der Lage, die intestinale Entzündungsreaktion weiter zu begünstigen. Die dargestellten Daten zeigen eine klare Verschiebung in Richtung des pro-inflammatorischen M1- Subtyps in der Lamina propria in MC- und CU-Patienten. Ob das durch einen primären Defekt in zellulären Differenzierungsprogrammen von CED-Patienten oder aufgrund des lokalen Mikromilieus sekundär zustande kommt, lässt sich anhand unserer Daten nicht abschließend beurteilen. Für letzteres spricht jedoch eine Studie unserer Arbeitsgruppe, die zeigt, dass regulatorische M2- Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe um den entzündeten Darm herum wesentlich durch das umgebende Zytokin- und Adipokinmilieu beeinflusst werden [110].

Für einen primären Defekt der epithelialen Barriere sprechen auf der anderen Seite Erkenntnisse über Mutationen in Autophagie-Genen wie *ATG16L1* [130] oder *IRGM* [130, 131], die durch Stress des endoplasmatischen Retikulums in den Epithelzellen Barrieredefekte nach sich ziehen. Außerdem sind Dysfunktionen der Paneth-Zellen, die normalerweise die Integrität des intestinalen Epithels aufrechterhalten, mit MC assoziiert [14]. Auch genetische Veränderungen in den TJ-Proteinen selber bzw. deren Regulationsmechanismen [107, 108] sowie eine veränderte Mukusproduktion [32] wurden im Zusammenhang mit CED beschrieben.

Wahrscheinlich ist sowohl die eine als auch die andere Theorie richtig: CED sind keine monogenetischen Erkrankungen, bei denen bei jedem Patienten dieselbe Pathophysiologie zugrunde liegt. Die Vielzahl der in den letzten Jahren beschriebenen Mutationen, die mit einem erhöhten CED-Risiko assoziiert wurden, spiegelt vielmehr wider, wie heterogen die Gruppe der CED-Patienten tatsächlich ist. Wahrscheinlich müssen je nach zugrundeliegendem Defekt mehrere Subgruppen von Patienten unterschieden werden, wobei die einen eher einen primären Epitheldefekt, die anderen hyperreagible Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lamina propria aufweisen, und eine dritte Gruppe möglicherweise einen ganz anderen Mechanismus. Dazu

passend führen verschiedene (sehr seltene) monogenetische Immundefekte zu einer intestinalen Entzündung ganz ähnlich jener bei CED, wobei diese Defekte sowohl primär die intestinale Barrierefunktion als auch primär myeloide Zellen des angeborenen oder erworbenen Immunsystems betreffen können, in der Konsequenz jedoch jeweils ein fast identes klinisches Erscheinungsbild bewirken [132].

Zusätzlich gibt es durch die in den letzten Jahren wachsende Verfügbarkeit großer metagenomischer Analyseverfahren immer mehr Evidenz für die Rolle eines pathologisch veränderten Mikrobioms mit einer Dysbiose zwischen protektiven und pathologischen Bakterienstämmen bei CED-Patienten [133]. Sie weisen, verglichen mit gesunden Kontrollen, eine veränderte Zusammensetzung der Mikrobiota auf [30], insbesondere eine allgemein verminderte Biodiversität und eine Verminderung von *Firmicutes* zugunsten einer Zunahme von *Enterobacteriaceae* [134, 135]. Hinweise auf die Rolle von Mikroorganismen ergeben sich auch durch die Tatsache, dass Schübe der CED durch vorangegangene infektiöse Gastroenteritiden induziert werden können [136]. Trotz dieser Erkenntnisse ist die Datenlage bezüglich der Effektivität einer fäkalen Mikrobiota-Transplantation mit potentiell „gesünderer“ Mikrobiota-Zusammensetzung zur Behandlung der CED bislang nicht eindeutig [137], was möglicherweise (auch) an mangelhaftem und nicht einheitlichem Studiendesign liegt.

Ganz entscheidend ist auch die initiale Entwicklung des Makrophagen-Kompartiments in der Darmmukosa in hohem Maße abhängig von der Kolonisierung des Darms mit der Mikrobiota: Im Kolon keimfrei aufgezüchteter Mäuse findet man signifikant weniger ausgereifte (regulatorische) Makrophagen verglichen mit konventionell gezüchteten Mäusen [28], was wiederum vereinbar ist mit der Theorie, dass exzessive Hygienemaßnahmen mitverantwortlich für die steigende Inzidenz der CED in Industrienationen sein könnten [19].

Zusammenfassend kann das diffizile Zusammenspiel zwischen Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, Epithelzellen und dem Mikrobiom an verschiedenen Stellen gestört sein, was sich in der pathophysiologisch heterogenen Patientengruppe widerspiegelt.

In-vitro Co-Kultur-Modell

Um dieses diffizile Zusammenspiel verschiedener, anatomisch nah beieinander liegender Zellen im menschlichen Körper besser zu verstehen, sind *in-vitro* Co-Kultur-Modelle notwendig, die die körpereigenen morphologischen und funktionellen Verhältnisse möglichst naturgetreu nachbilden. Co-Kultur-Modelle von Immunzellen und Epithelzellen wurden durch andere Gruppen bereits durchgeführt: So berichten Satsu und Kollegen über eine Co-Kultur von THP-1-Zellen mit Caco-2-Epithelzellen [138]. Die THP-1-Zelllinie stellt eine Monozyten-Tumorzelllinie aus einem Leukämie-Patienten dar [139], welche in diesem Modell durch Inkubation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zur Ausdifferenzierung in Makrophagen-artige Zellen gebracht wurde. Ein Co-Kultur-Modell mit primären humanen Zellen war bislang jedoch nicht etabliert, ferner gab es kein Modell mit polarisierten Makrophagen, was aber – nicht zuletzt gemäß den immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit – die wesentlichen Aspekte der mukosalen Zellzusammensetzung viel genauer reflektieren würde.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Co-Kultur-Modell etabliert, welches humane, polarisierte, primäre monozytische Zellen verwendet, die – ähnlich der morphologischen Verhältnisse in der Mukosa – direkt unter einem konfluenten Epithelrasen aus HT-29/B6-, Caco-2- oder T48-Zellen kultiviert werden. So konnten spezifische Effekte dieser primären Zellen auf das intestinale Epithel untersucht werden, wobei Effekte anderer Immunzellen der Lamina propria ausgeschlossen werden konnten. Das Modell fokussiert auf lösliche Faktoren aus den frisch isolierten monozytischen Zellen und übersetzt nicht nur die Erkenntnisse des beschriebenen THP-1-Modells auf primäre humane Zellen [138], sondern erweitert sie um das Verständnis spezifischer Effekte polarisierter Makrophagen-Subtypen. Im THP-1-Modell wurde ein TNF α -vermittelter Epithelschaden durch Apoptose-Induktion beschrieben. Eine Untersuchung der TJ-Proteine wurde dort im Unterschied zu unserer Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Limitationen unseres Modells sind einerseits die Verwendung von Tumor-Epithelzelllinien, andererseits ein zweidimensionales, da nur zwei Zelltypen nachbildendes System. Ideal wäre daher perspektivisch die Entwicklung eines dreidimensionalen Modells ausschließlich mit primären (Patienten-)Zellen, in das weitere relevante Zelltypen wie T-Zellen sowie die Interaktion mit der luminalen Mikrobiota Eingang finden.

Epithelzelllinien und die in vivo-Übertragbarkeit der Ergebnisse

Beobachtungen von im Labor kultivierten Zellen sind naturgemäß nicht 1:1 auf Zellen des lebenden Organismus übertragbar. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden jedoch an drei verschiedenen Epithelzelllinien verifiziert, was für eine hohe Belastbarkeit der Daten spricht. Alle drei Epithelzelllinien verhalten sich nach dem Kontakt mit den polarisierten Makrophagen in vergleichbarer Weise. Einzig die HT-29/B6-Zellen reagierten etwas weniger prompt und zeigten den signifikanten Widerstandsverlust nur nach einer Steigerung der Zytokinexpression durch LPS. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Anzahl der Experimente in dieser Zelllinie nur $n=3$ betrug, sodass angenommen werden kann, dass bei Erhöhung der Anzahl auch hier eine statistische Signifikanz in der Stimulation ohne LPS hätte beobachtet werden können. HT-29 ist eine weit verbreitete, nicht-polarisiert wachsende humane Zelllinie aus einem kolorektalen Adenokarzinom, die als "Wildtyp" käuflich erworben werden kann. Das Labor um Herrn Professor Schulzke aus dem Arbeitsbereich Ernährungsmedizin unserer Klinik hat einen Klon dieser Zellen, nämlich die HT-29/B6, hervorgebracht und charakterisiert. Dieser wächst im Gegensatz zur Wildtypzelle hoch differenziert und bildet polarisierte epitheliale Monolayer. Der Klon zeigt typische Eigenschaften von kolonischen Kryptenzellen, indem er Chlorid und Mucin sezerniert [112]. Die hier dargestellten Untersuchungen wurden mit diesem HT-19/B6-Klon durchgeführt, da Daten, die mit dieser Epithelzelllinie erhoben werden, sich aufgrund der typischen Eigenschaften von humanen Kolon-Epithelzellen als besonders gut übertragbar auf den Menschen auszeichnen. Die Mukus-Produktion der HT-29/B6-Zellen gibt eine Erklärung, warum diese Zellen weniger empfindlich auf die Zytokine der Monozyten und Makrophagen reagierten. In diesem experimentellen Ansatz trat die epitheliale Dysfunktion erst bei simultaner TLR4-Stimulation mit LPS auf, was eine entzündliche Situation nachahmt, in der der epitheliale Schaden schon stattgefunden hat.

Auch Caco-2-Zellen, die ursprünglich ebenfalls aus einem kolorektalen Adenokarzinom isoliert wurden, und T84-Zellen, initial aus einer Lungenmetastase eines Kolon-Karzinoms stammend, differenzieren und polarisieren sich unter Kulturbedingungen dahingehend aus, dass sie morphologisch und funktionell humanen Enterozyten entsprechen [140, 141]. Sie bilden Mikrovilli, TJ und charakteristische Enzyme und Transporter aus. Ihr Einsatz als polarisierter Monolayer ist weit verbreitet in

Permeabilitäts- und Absorptions-Versuchen, und die Korrelation zwischen den *in-vitro* erhobenen Daten und der *in-vivo* Bedeutung ist gut etabliert [142]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Epithelzelllinien den Zellen im menschlichen Organismus in höchstmöglichem Maße ähneln und eine *in-vivo*-Übertragbarkeit der Ergebnisse angenommen werden kann.

Verlust der epithelialen Integrität - Erklärungsmodelle

Mit der Verschiebung in Richtung des pro-inflammatorischen Makrophagen-Phänotyps zeigen unsere Ergebnisse gleichzeitig einen deutlichen Verlust der epithelialen Integrität als Resultat von fehlregulierten TJ-Proteinen, was bei CED-Patienten gehäuft auftritt [143-145]. Unsere Daten zeigen, dass Claudin-2 im M1- und Monozyten-exponierten Epithel deutlich vermehrt exprimiert wird. Dieses Claudin ist in der Lage, eine Pore zwischen den Zellen zu formen, sodass intraluminales Material die intestinale Barriere penetrieren kann. Dies steht im Einklang mit der bereits vorliegenden Literatur, in der der beeinträchtigende Effekt von TNF α auf die epitheliale Integrität durch Veränderung von Struktur und Funktion von TJ-Proteinen beschrieben wurde [115]. Die Induktion von Claudin-2 durch TNF α geschieht hierbei durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase Weg [146]. Außerdem zeigen unsere Daten, dass JAM-1 in der inflammatorischen Kondition in Vesikeln ins Zytoplasma der Zelle loziert wird, anstatt an der Zellmembran die abdichtende Funktion wahrnehmen zu können. Außerdem erscheint die eigentlich geordnete, klare Architektur des Zellrasens nach Kontakt mit Monozyten oder M1-Makrophagen deutlich gestört. Die im gesunden Zustand ebene Oberfläche wird zerrissen, „Löcher“ treten anstelle der apoptotischen Epithelzellen auf, und die normalerweise basolateral lokalisierten Zellkerne wandern nach oben.

Zusammenfassend stellen fehlregulierte TJ-Proteine, sowohl was deren quantitative Expression als auch deren Verteilung im Epithel angeht, einen Schlüsselmechanismus zur Erklärung unserer Beobachtungen dar.

Der Effekt von Infliximab auf die intestinale Entzündung

Unsere Daten zeigen, dass der Effekt auf die epitheliale Barriere durch selektive Zytokinblockade erfolgreich antagonisiert werden kann. Die TNF α -Inhibition durch Infliximab hebt den Effekt der Monozyten und M1-Makrophagen teilweise auf, was für eine maßgebliche Beteiligung dieses Zytokins am Epithelschaden spricht. Infliximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper, stellt eine etablierte und für eine Subgruppe

erfolgreich angewandte Therapieoption sowohl bei Patienten mit MC als auch bei solchen mit CU dar [147]. Der Wirkmechanismus beruht auf der spezifischen Bindung und Neutralisierung sowohl von löslichem als auch von membrangebundenem TNF α , dadurch erklärt sich der direkte Einfluss von Infliximab auf verschiedene Immunzellen. So wurde gezeigt, dass Infliximab den regulatorischen CD206⁺/CD68⁺-Makrophagen-Phänotyp *in vitro* und *in vivo* induzieren kann [59, 60]. Durch die TNF α -Neutralisation wird das Milieu dahingehend verändert, dass eine vermehrte Umpolarisierung in Richtung M2-Makrophagen stattfindet. Infliximab ist ferner in der Lage, Apoptose in Monozyten [148], Makrophagen [61] und T-Zellen [149] einzuleiten. Daher wäre eine weitere mögliche Erklärung für unsere Daten die Apoptose von Infliximab-exponierten Makrophagen. Diesbezüglich sahen wir jedoch keine Unterschiede, gemessen anhand der Anzahl lebender Zellen vor und nach Inkubation mit Infliximab, in den verschiedenen Konditionen. Infliximab alleine hatte keinen Effekt auf den epithelialen Widerstand, was gegen eine signifikante Apoptose-Induktion in den Epithelzellen spricht.

Der Effekt des Inflammasoms auf die intestinale Entzündung

Die Inhibition der Inflammasom-abhängigen Zytokine IL-1 β und IL-18 führte nur im Monozyten-vermittelten Verlust der epithelialen Integrität zur einer Restitution der Barrierefunktion, was dadurch zu erklären ist, dass nur diese Zellen eine konstitutiv aktive Caspase-1 besitzen. Polarisierete Makrophagen hingegen brauchen einen zweiten Stimulus zusätzlich zu LPS, um diese streng kontrollierten Zytokine sezernieren zu können [150]. Anakinra, ein rekombinanter, humaner IL-1-Rezeptorantagonist, ist für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen [151]. Die Daten für diese Strategie zur Behandlung der intestinalen Entzündung sind kontrovers [66, 83]. Für die Funktion im Intestinaltrakt scheint die Zellpopulation entscheidend zu sein, in der die Inflammasom-Aktivierung oder -Inaktivierung von statten geht,: Im Epithel ist die Expression und Aktivierung von IL-18 zwingend notwendig zur Induktion und Beibehaltung der intestinalen Homöostase. Daten aus Mausmodellen zeigen, dass Schlüsselschritte wie die Erkennung von kommensaler Mikrobiota sowie Abwehr pathogener Keime über diesen Signalweg ausgeführt werden. Wenn die epitheliale Barriere jedoch durchbrochen ist, so wie bei CED-Patienten, können Mikroben und Antigene in die Mukosa, Submukosa und in der Folge auch in den Blutstrom translozieren [152]. In diesem Fall hat die Inflammasom-Aktivierung in Makrophagen,

dendritischen Zellen und sogar Adipozyten einen fatalen Effekt auf die mukosale Entzündungsreaktion, vor allem durch die Maturation von IL-1 β [68]. Dies erklärt die Wirksamkeit der IL-1 β -Inhibition in unserer Zellkultur.

Zusammenfassung

Abbildung 19 zeigt das durch die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützte Modell, in dem eine ausgeprägte Verschiebung in Richtung pro-inflammatorischer Makrophagen in der Lamina propria von CED-Patienten zu einer Zunahme entzündungsfördernder Zytokine in diesem Kompartiment führt. Indem es eine trans- und parazelluläre Leckage induziert, resultiert dieses Zytokinmilieu in einem Verlust der epithelialen Integrität durch eine veränderte Expression der Adhäsions- und TJ-Proteine. Durch die erhöhte Permeabilität wird nun eine mukosale Invasion durch kommensale und pathogene Mikroben ermöglicht. Die Aktivierung lokaler Makrophagen und die daraus folgende Freisetzung von Chemokinen führt zur Infiltration weiterer Immunzellen, die in dem pro-inflammatorischen Milieu die Entzündung weiter unterstützen. Durch eine gezielte Neutralisation definierter pro-inflammatorischer Mediatoren kann es gelingen, das Milieu zu verändern und damit auch den Teufelskreis der chronischen Entzündung zu durchbrechen.

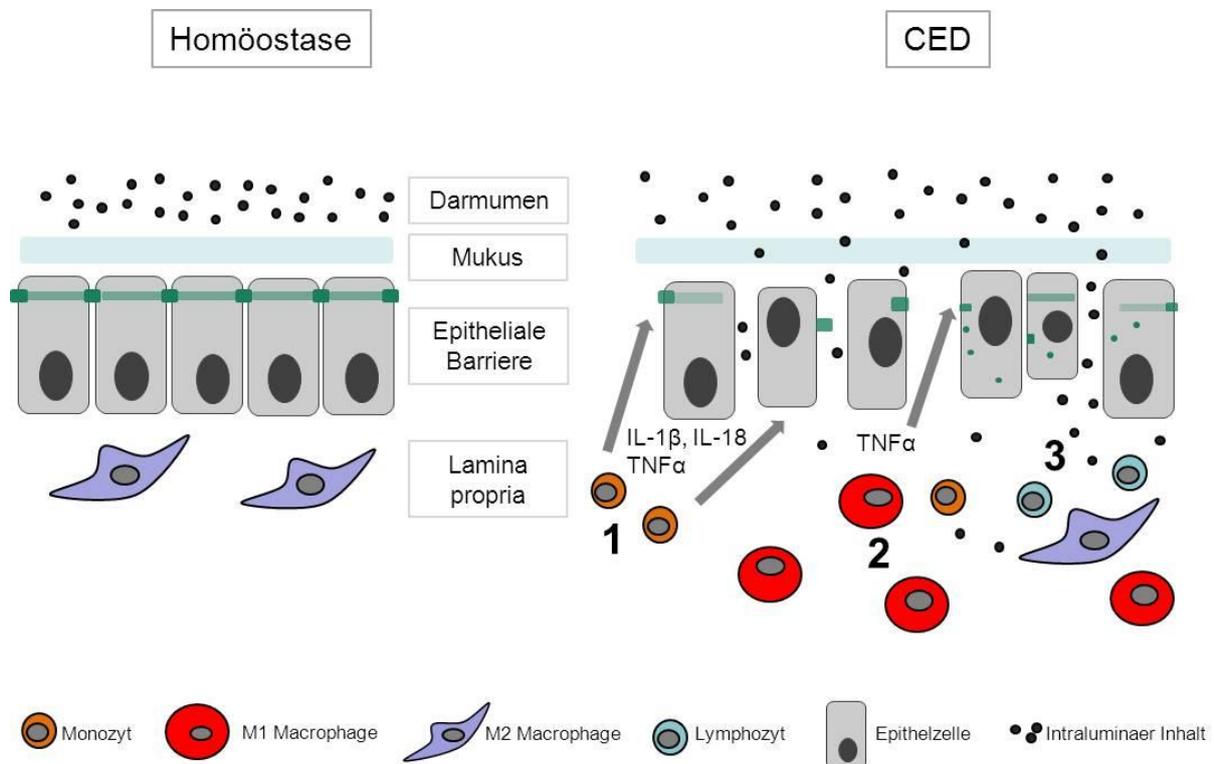


Abbildung 19. Modell der intestinalen Entzündung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Das linke Bild zeigt die Situation unter normalen Bedingungen, wo eine intakte epitheliale Barriere den intraluminalen Darminhalt von der Lamina propria trennt. Hier befinden sich subepitheliale anti-inflammatorische M2-Makrophagen, die zur Aufrechterhaltung der Homöostase beitragen. Das rechte Bild zeigt die Situation in der chronischen intestinalen Entzündung. Pro-inflammatorische Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, infiltrieren die Lamina propria und führen zur Dysregulation von *tight junction*-Proteinen (1). Durch die so gestörte epitheliale Barriere können luminal Antigenen in die Lamina propria translozieren (2). Monozyten infiltrieren das Gewebe und polarisieren vor Ort zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen. Deren pro-inflammatorisches Zytokinprofil trägt weiter zur Störung der Barriere bei. Durch sekundäre Aktivierung des angeborenen Immunsystems wird der Kreislauf der chronischen Entzündung weiter unterstützt (3).

Literaturverzeichnis

1. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M: **Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)**. *Gut* 1996, **39**(5):690-697.
2. Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagel S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt, C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC, Stallmach A: **[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]**. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2011, **49**(9):1276-1341.
3. Kaplan GG, Ng SC: **Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease**. *Gastroenterology* 2017, **152**(2):313-321 e312.
4. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, Villanacci V, Becheanu G, Borralho Nunes P, Cathomas G, Fries W, Jouret-Mourin A, Mescoli C, de Petris G, Rubio CA, Shepherd NA, Vieth M, Eliakim R: **European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease**. *J Crohns Colitis* 2013, **7**(10):827-851.
5. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM, 2nd, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML: **Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences**. *Gastroenterology* 1996, **111**(3):573-579.
6. Fielding JF: **The relative risk of inflammatory bowel disease among parents and siblings of Crohn's disease patients**. *J Clin Gastroenterol* 1986, **8**(6):655-657.
7. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP: **Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease**. *Gut* 1996, **38**(5):738-741.
8. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B: **Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking**. *Gut* 1988, **29**(7):990-996.
9. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ: **Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study**. *BMJ* 1996, **312**(7023):95-96.
10. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO: **Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study**. *Scand J Gastroenterol* 2000, **35**(10):1075-1081.
11. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G: **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease**. *Nature* 2001, **411**(6837):603-606.
12. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG: **Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations**. *Lancet* 2001, **357**(9272):1925-1928.
13. Weersma RK, van Dullemen HM, van der Steege G, Nolte IM, Kleibeuker JH, Dijkstra G: **Review article: Inflammatory bowel disease and genetics**. *Aliment Pharmacol Ther* 2007, **26** Suppl 2:57-65.
14. Stappenbeck TS, McGovern DP: **Paneth Cell Alterations in the Development and Phenotype of Crohn's Disease**. *Gastroenterology* 2017, **152**(2):322-326.
15. Sartor RB, Wu GD: **Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches**. *Gastroenterology* 2017, **152**(2):327-339 e324.
16. Uniken Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G, Weersma RK, Festen EA: **The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality**. *J Pathol* 2017, **241**(2):146-158.
17. Calkins BM: **A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease**. *Dig Dis Sci* 1989, **34**(12):1841-1854.

18. Desai HG, Gupte PA: **Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation?** *Indian J Gastroenterol* 2005, **24**(1):23-24.
19. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D: **Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy.** *Lancet* 1994, **343**(8900):766-767.
20. Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J: **Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 2006, **130**(6):1588-1594.
21. Godet PG, May GR, Sutherland LR: **Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease.** *Gut* 1995, **37**(5):668-673.
22. Riordan AM, Ruxton CH, Hunter JO: **A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars.** *Eur J Clin Nutr* 1998, **52**(4):229-238.
23. Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW: **Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet.** *Br Med J* 1979, **2**(6193):762-764.
24. Koletzko S, Sherman P, Corey M, Griffiths A, Smith C: **Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood.** *BMJ* 1989, **298**(6688):1617-1618.
25. Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJ: **Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study.** *Scand J Gastroenterol* 1987, **22**(8):1009-1024.
26. Baumgart DC, Carding SR: **Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology.** *Lancet* 2007, **369**(9573):1627-1640.
27. Shim JO: **Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease.** *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition* 2013, **16**(1):17-21.
28. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM: **Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice.** *Nat Immunol* 2014, **15**(10):929-937.
29. Sepehri S, Kotlowski R, Bernstein CN, Krause DO: **Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease.** *Inflammatory bowel diseases* 2007, **13**(6):675-683.
30. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR, Li E: **Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases.** *Inflammatory bowel diseases* 2011, **17**(1):179-184.
31. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H: **Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease.** *Lancet* 1993, **341**(8858):1437-1439.
32. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF: **NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression.** *Gut* 2004, **53**(11):1658-1664.
33. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R: **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** *Cell* 2004, **118**(2):229-241.
34. Cario E, Podolsky DK: **Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease.** *Infect Immun* 2000, **68**(12):7010-7017.
35. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P: **Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Gut* 2004, **53**(7):987-992.
36. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR: **Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation.** *Gut* 2004, **53**(5):678-684.
37. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, Imada A, Binion DG, Musso A, West GA, Dobrea GM, McCormick TS, Lapetina EG, Levine AD, Ottaway CA, Fiocchi

- C: Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance.** *J Immunol* 1999, **163**(2):1081-1090.
38. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, Lucas B: **Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo.** *J Immunol* 2004, **172**(6):3391-3398.
39. Levine AD, Fiocchi C: **Immunology of inflammatory bowel disease.** *Curr Opin Gastroenterol* 2000, **16**(4):306-309.
40. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J: **Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways.** *Cell Signal* 2014, **26**(2):192-197.
41. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A: **Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.** *J Immunol* 2006, **177**(10):7303-7311.
42. Guilliams M, van de Laar L: **A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System.** *Front Immunol* 2015, **6**:406.
43. Gordon S: **Alternative activation of macrophages.** *Nature reviews Immunology* 2003, **3**(1):23-35.
44. Mosser DM: **The many faces of macrophage activation.** *Journal of leukocyte biology* 2003, **73**(2):209-212.
45. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA: **Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines.** *Immunity* 2014, **41**(1):14-20.
46. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M: **Macrophage activation and polarization.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008, **13**:453-461.
47. Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Hoyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T: **Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, **27**(20):3330-3337.
48. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: **Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma.** *Cancer research* 1996, **56**(20):4625-4629.
49. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R: **High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(5):1472-1479.
50. Ohno S, Inagawa H, Dhar DK, Fujii T, Ueda S, Tachibana M, Suzuki N, Inoue M, Soma G, Nagasue N: **The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients.** *Anticancer research* 2003, **23**(6D):5015-5022.
51. Mowat AM, Bain CC: **Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation.** *Journal of innate immunity* 2011, **3**(6):550-564.
52. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM: **Intestinal macrophages and response to microbial encroachment.** *Mucosal immunology* 2011, **4**(1):31-42.
53. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G: **Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation.** *Gastroenterology* 2002, **122**(7):1987-2000.
54. Mahida YR, Wu KC, Jewell DP: **Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory bowel disease.** *Gut* 1989, **30**(10):1362-1370.
55. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H: **Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 1997, **112**(5):1493-1505.

56. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V: **Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa.** *Gastroenterology* 1998, **115**(2):357-369.
57. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T: **Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset.** *J Immunol* 2010, **184**(5):2671-2676.
58. Hunter MM, Wang A, Parhar KS, Johnston MJ, Van Rooijen N, Beck PL, McKay DM: **In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice.** *Gastroenterology* 2010, **138**(4):1395-1405.
59. Vos AC, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW: **Anti-tumor necrosis factor-alpha antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner.** *Gastroenterology* 2011, **140**(1):221-230.
60. Vos AC, Wildenberg ME, Arijs I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, Vermeire S, Rutgeerts P, van den Brink GR, Hommes DW: **Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro.** *Inflammatory bowel diseases* 2012, **18**(3):401-408.
61. Caprioli F, Bose F, Rossi RL, Petti L, Viganò C, Ciafardini C, Raeli L, Basilisco G, Ferrero S, Pagani M, Conte D, Altomare G, Monteleone G, Abrignani S, Reali E: **Reduction of CD68+ macrophages and decreased IL-17 expression in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease strongly correlate with endoscopic response and mucosal healing following infliximab therapy.** *Inflammatory bowel diseases* 2013, **19**(4):729-739.
62. Schroder K, Tschopp J: **The inflammasomes.** *Cell* 2010, **140**(6):821-832.
63. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J: **NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder.** *Immunity* 2004, **20**(3):319-325.
64. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM: **Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf.** *Nature* 2004, **430**(6996):213-218.
65. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD: **The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes.** *Current biology : CB* 2007, **17**(13):1140-1145.
66. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD: **The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis.** *Immunity* 2010, **32**(3):379-391.
67. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Müller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JW, Kanneganti T, Tack CJ, Netea MG: **The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity.** *Cell metabolism* 2010, **12**(6):593-605.
68. Lissner D, Siegmund B: **The multifaceted role of the inflammasome in inflammatory bowel diseases.** *TheScientificWorldJournal* 2011, **11**:1536-1547.
69. Schoultz I, Verma D, Halfvarsson J, Torkvist L, Fredrikson M, Sjoqvist U, Lordal M, Tysk C, Lerm M, Soderkvist P, Soderholm JD: **Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men.** *The American journal of gastroenterology* 2009, **104**(5):1180-1188.
70. Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T: **IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease.** *Journal of gastroenterology* 2002, **37 Suppl 14**:111-116.
71. Zhernakova A, Festen EM, Franke L, Trynka G, van Diemen CC, Monsuur AJ, Bevova M, Nijmeijer RM, van 't Slot R, Heijmans R, Boezen HM, van Heel DA, van Bodegraven AA, Stokkers PC, Wijmenga C, Crusius JB, Weersma RK: **Genetic analysis of innate immunity in**

- Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP.** *American journal of human genetics* 2008, **82**(5):1202-1210.
72. Mahida YR, Wu K, Jewell DP: **Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease.** *Gut* 1989, **30**(6):835-838.
73. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F: **IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells.** *Journal of immunology* 1999, **162**(11):6829-6835.
74. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Lizza F, Fusco A, Pallone F: **Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease.** *Journal of immunology* 1999, **163**(1):143-147.
75. Al-Sadi RM, Ma TY: **IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability.** *Journal of immunology* 2007, **178**(7):4641-4649.
76. Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M: **Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis.** *Gastroenterology* 1992, **103**(1):65-71.
77. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Sato T, Yamazaki M, Okamoto S, Ishii H, Totsuka T, Iiyama R, Okamoto R, Ikeda M, Kurimoto M, Takeda K, Akira S, Hibi T: **Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2001, **121**(4):875-888.
78. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, Dinarello CA, Endres S, Eigler A: **Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2001, **281**(4):R1264-1273.
79. Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, Garka K, Born TL, Derry JM, Viney JL: **Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage.** *Gut* 2002, **50**(6):812-820.
80. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA: **IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(23):13249-13254.
81. Loher F, Bauer C, Landauer N, Schmall K, Siegmund B, Lehr HA, Dauer M, Schoenharting M, Endres S, Eigler A: **The interleukin-1 beta-converting enzyme inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2004, **308**(2):583-590.
82. Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, Takeda K, Akira S, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: **Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice.** *Scandinavian journal of gastroenterology* 2003, **38**(8):837-844.
83. Lebeis SL, Powell KR, Merlin D, Sherman MA, Kalman D: **Interleukin-1 receptor signaling protects mice from lethal intestinal damage caused by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*.** *Infection and immunity* 2009, **77**(2):604-614.
84. Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, Herfarth HH, Jobin C, Ting JP: **The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer.** *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(5):1045-1056.
85. Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, Lam V, Potentier MS, Ng K, Bawa M, McCafferty DM, Rioux KP, Ghosh S, Xavier RJ, Colgan SP, Tschopp J, Muruve D, MacDonald JA, Beck PL: **NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis.** *Inflammatory bowel diseases* 2011, **17**(6):1359-1372.
86. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KS, McIntire CR, LeBlanc PM, Meunier C, Turbide C, Gros P, Beauchemin N, Vallance BA, Saleh M: **Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases.** *Immunity* 2010, **32**(3):367-378.

87. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K *et al*: **Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.** *Nature* 1995, **378**(6552):88-91.
88. Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A: **Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways.** *Immunity* 2010, **32**(3):392-402.
89. Hering NA, Fromm M, Schulzke JD: **Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics.** *The Journal of physiology* 2012, **590**(Pt 5):1035-1044.
90. Guillot C, Lecuit T: **Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis.** *Science* 2013, **340**(6137):1185-1189.
91. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M: **Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells.** *Cell and tissue research* 2005, **321**(1):89-96.
92. Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD, Fromm M: **Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation.** *Biochemical and biophysical research communications* 2009, **378**(1):45-50.
93. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: **Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice.** *The Journal of cell biology* 2002, **156**(6):1099-1111.
94. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M: **Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells.** *Journal of cell science* 2002, **115**(Pt 24):4969-4976.
95. Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, Muller D: **Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function.** *Journal of cell science* 2009, **122**(Pt 10):1507-1517.
96. Naik UP, Eckfeld K: **Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1).** *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2003, **17**(4):341-347.
97. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA: **Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia.** *The Journal of cell biology* 1986, **103**(3):755-766.
98. Takeichi M: **Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.** *Annual review of biochemistry* 1990, **59**:237-252.
99. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD: **Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease.** *Gut* 2007, **56**(1):61-72.
100. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD: **Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution.** *Gastroenterology* 2005, **129**(2):550-564.
101. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD: **Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 1999, **116**(2):301-309.
102. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M: **Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000, **14**(12):1749-1753.
103. Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, Mankertz J, Fromm M, Wagner S, Riecken EO, Schulzke JD: **Apoptosis and intestinal barrier function.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000, **915**:270-274.
104. John LJ, Fromm M, Schulzke JD: **Epithelial barriers in intestinal inflammation.** *Antioxidants & redox signaling* 2011, **15**(5):1255-1270.

105. Clark EC, Patel SD, Chadwick PR, Warhurst G, Curry A, Carlson GL: **Glutamine deprivation facilitates tumour necrosis factor induced bacterial translocation in Caco-2 cells by depletion of enterocyte fuel substrate.** *Gut* 2003, **52**(2):224-230.
106. Troeger H, Richter JF, Beutin L, Gunzel D, Dobrindt U, Epple HJ, Gitter AH, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD: **Escherichia coli alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation.** *Cellular microbiology* 2007, **9**(10):2530-2540.
107. Wapenaar MC, Monsuur AJ, van Bodegraven AA, Weersma RK, Bevova MR, Linskens RK, Howdle P, Holmes G, Mulder CJ, Dijkstra G, van Heel DA, Wijmenga C: **Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis.** *Gut* 2008, **57**(4):463-467.
108. Consortium UIG, Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, Wesley E, Parnell K, Zhang H, Drummond H, Nimmo ER, Massey D, Blaszczyk K, Elliott T, Cotterill L, Dallal H, Lobo AJ, Mowat C, Sanderson JD, Jewell DP, Newman WG, Edwards C, Ahmad T, Mansfield JC, Satsangi J, Parkes M, Mathew CG; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Donnelly P, Peltonen L, Blackwell JM, Bramon E, Brown MA, Casas JP, Corvin A, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Jankowski J, Markus HS, Mathew CG, McCarthy MI, Palmer CN, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Samani N, Trembath RC, Viswanathan AC, Wood N, Spencer CC, Barrett JC, Bellenguez C, Davison D, Freeman C, Strange A, Donnelly P, Langford C, Hunt SE, Edkins S, Gwilliam R, Blackburn H, Bumpstead SJ, Dronov S, Gillman M, Gray E, Hammond N, Jayakumar A, McCann OT, Liddle J, Perez ML, Potter SC, Ravindrarajah R, Ricketts M, Waller M, Weston P, Widaa S, Whittaker P, Deloukas P, Peltonen L, Mathew CG, Blackwell JM, Brown MA, Corvin A, McCarthy MI, Spencer CC, Attwood AP, Stephens J, Sambrook J, Ouwehand WH, McArdle WL, Ring SM, Strachan DP: **Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region.** *Nature genetics* 2009, **41**(12):1330-1334.
109. Kredel L-I: **Auswirkung von Adipokinen auf den Immunphänotyp von Makrophagensubpopulationen.** 2014.
110. Kredel LI, Batra A, Stroh T, Kuhl AA, Zeitz M, Erben U, Siegmund B: **Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease.** *Gut* 2012.
111. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH: **Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(13):4560-4565.
112. Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U: **Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6).** *The American journal of physiology* 1991, **261**(4 Pt 1):C574-582.
113. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD: **Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue.** *Gut* 2008, **57**(6):747-754.
114. Edens HA, Levi BP, Jaye DL, Walsh S, Reaves TA, Turner JR, Nusrat A, Parkos CA: **Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration.** *J Immunol* 2002, **169**(1):476-486.
115. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD: **Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 1):137-146.
116. Schumann M, Gunzel D, Buergel N, Richter JF, Troeger H, May C, Fromm A, Sorgenfrei D, Daum S, Bojarski C, Heyman M, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD: **Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease.** *Gut* 2012, **61**(2):220-228.

117. Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdt S: **Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2006, **10**(3):635-649.
118. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH: **Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation.** *Journal of leukocyte biology* 2006, **79**(2):285-293.
119. Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F: **The gut microbiota in IBD.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2012, **9**(10):599-608.
120. Joeris T, Muller-Luda K, Agace WW, Mowat AM: **Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes.** *Mucosal immunology* 2017.
121. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR: **Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors.** *Nature* 2015, **518**(7540):547-551.
122. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM: **M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** *Journal of immunology* 2000, **164**(12):6166-6173.
123. Sans-Fons MG, Yeramian A, Pereira-Lopes S, Santamaria-Babi LF, Modolell M, Lloberas J, Celada A: **Arginine transport is impaired in C57Bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of Slc7a2 (CAT2), and susceptibility to Leishmania infection is reduced.** *J Infect Dis* 2013, **207**(11):1684-1693.
124. Joshi S, Singh AR, Zulcic M, Bao L, Messer K, Ideker T, Dutkowski J, Durden DL: **Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo.** *PLoS One* 2014, **9**(4):e95893.
125. Lau SK, Chu PG, Weiss LM: **CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples.** *Am J Clin Pathol* 2004, **122**(5):794-801.
126. El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, Basaraba RJ, Konig T, Schleicher U, Koo MS, Kaplan G, Fitzgerald KA, Tuomanen EI, Orme IM, Kanneganti TD, Bogdan C, Wynn TA, Murray PJ: **Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens.** *Nat Immunol* 2008, **9**(12):1399-1406.
127. Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T: **IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease.** *Journal of gastroenterology* 2002, **37 Suppl 14**:111-116.
128. Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Baba N, Libioulle C, Belaiche J, Bitton A, Gaudet D, Cohen A, Langelier D, Fortin PR, Wither JE, Sarfati M, Rutgeerts P, Rioux JD, Vermeire S, Hudson TJ, Franchimont D: **Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility.** *Nature genetics* 2009, **41**(1):71-76.
129. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C: **Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism.** *Gastroenterology* 2004, **127**(1):365-366.
130. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S: **A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1.** *Nature genetics* 2007, **39**(2):207-211.
131. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG: **Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility.** *Nature genetics* 2007, **39**(7):830-832.

132. Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, Ouahed J, Wilson DC, Travis SP, Turner D, Klein C, Snapper SB, Muise AM; COLORS in IBD Study Group and NEOPICS: **The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 2014, **147**(5):990-1007 e1003.
133. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF: **Dysbiosis in inflammatory bowel disease.** *Gut* 2004, **53**(1):1-4.
134. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI: **Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.** *Cell Host Microbe* 2008, **3**(6):417-427.
135. Barnich N, Denizot J, Darfeuille-Michaud A: **E. coli-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients.** *Pathol Biol (Paris)* 2013, **61**(5):e65-69.
136. Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL: **The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease.** *Journal of gastroenterology* 2010, **45**(3):266-276.
137. Anderson JL, Edney RJ, Whelan K: **Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 2012, **36**(6):503-516.
138. Satsu H, Ishimoto Y, Nakano T, Mochizuki T, Iwanaga T, Shimizu M: **Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha.** *Experimental cell research* 2006, **312**(19):3909-3919.
139. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K: **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** *Int J Cancer* 1980, **26**(2):171-176.
140. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT: **Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.** *Gastroenterology* 1989, **96**(3):736-749.
141. Barrett KE: **Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells.** *The American journal of physiology* 1993, **265**(4 Pt 1):C859-868.
142. Artursson P, Karlsson J: **Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 1991, **175**(3):880-885.
143. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G: **Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases.** *Inflammatory bowel diseases* 2009, **15**(1):100-113.
144. Zeissig S, Bojarski C, Buergele N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD: **Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment.** *Gut* 2004, **53**(9):1295-1302.
145. Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M: **Epithelial tight junctions in intestinal inflammation.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, **1165**:294-300.
146. Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, Tavalali S, Fromm M, Schulzke JD: **TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling.** *Cell and tissue research* 2009, **336**(1):67-77.
147. Rutgeerts P: **Modern therapy for inflammatory bowel disease.** *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 2003(237):30-33.
148. Luger A, Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T: **Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway.** *Gastroenterology* 2001, **121**(5):1145-1157.
149. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ: **Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2003, **124**(7):1774-1785.
150. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA: **Differential requirement for the activation of the**

inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009, **113**(10):2324-2335.

151. Nikfar S, Saiyarsarai P, Tigabu BM, Abdollahi M: **Efficacy and safety of interleukin-1 antagonists in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis.** *Rheumatol Int* 2018, **38**(8):1363-1383.

152. Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C, Gazouli M: **Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease.** *PLoS One* 2017, **12**(1):e0170034.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, **Donata Clara Lissner**, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Effekt von Makrophagen-Subpopulationen auf die intestinale Barriere“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Donata Clara Lissner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1 (Originalarbeit):

Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kühl AA, Erben U, May C, Schulzke JD, Siegmund B. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases* 2015 Jun; 21(6):1297-305. doi: 10.1097/MIB.0000000000000384.

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und Durchführung der Experimente sowie Auswertung und Interpretation der Daten unter Supervision
- Aus den Ergebnissen der Experimente und der statistischen Auswertung durch die Promovendin sind die Abbildungen 1, 2 und 6 sowie alle supplementären Abbildungen der Publikation entstanden. Die Abbildungen 3, 4 und 5 entstanden aus den Experimenten und der statistischen Auswertung in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Schumann bzw. seiner MTA Claudia May.
- Die Promovendin hat das gesamte Manuskript geschrieben und nach kritischer Durchsicht der Co-Autoren erneut überarbeitet.

Publikation 2 (Review):

Lissner D, Siegmund B. The multifaceted role of the inflammasome in inflammatory bowel diseases. *ScientificWorldJournal*. 2011 Jul 28;11:1536-47. doi: 10.1100/tsw.2011.139. Review.

Beitrag im Einzelnen:

- Die Promovendin hat das gesamte Manuskript geschrieben, nach Supervision überarbeitet sowie alle Abbildungen gestaltet.
- Abbildung 2 aus der Veröffentlichung findet sich in etwas abgeänderter Form in dieser Monographie (Abbildung 2: Modell und Aktivierungsmechanismen des Inflammasoms).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind außerdem in Teilen auf folgenden Kongressen als Vortrag oder Poster vorgestellt und teilweise als Abstract veröffentlicht worden:

Lissner D, Schumann M, Kruis T, Stroh T, Kredel LI, Batra A, Kuehl AA, Zeitz M, Siegmund B. Macrophage subtypes disrupt the epithelium via deregulated tight junctions and induction of apoptosis. Congress of the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO), 20-22.02.2014, Copenhagen, Denmark.

Lissner D, Schumann M, Kruis T, Stroh T, Kredel LI, Batra A, Kuehl AA, Zeitz M, Siegmund B. Macrophage subtypes disrupt the epithelium via deregulated tight

junctions and induction of apoptosis. Digestive Disease Week (DDW), 03-06.05.2014, Chigaco, USA.

Lissner D, Batra A, Kredel LI, Schumann M, Kuehl AA, Siegmund B: Polarisation und Funktion von Makrophagen-Subtypen – Relevanz für CED? Z Gastroenterol 2013; 51 – K06

Lissner D, Schumann M, Stroh T, Kredel LI, Batra A, Kuehl AA, Zeitz M, Siegmund B: Disruption of the intestinal barrier through M1 macrophages – Relevance for IBD? Gastroenterology, 2012. 142(5): Supplement 1, p 887.

Lissner D. Macrophages subtypes in inflammatory bowel disease. Berlin Immunology Day, Research Center of Immunoscience. 12.11.2011, Berlin.

Kredel LI, Batra A, **Lissner D**, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B: Adipokines of the mesenteric fat tissue modulate the immune phenotype of resident macrophages. Congress of the European Crohn´s and Colitis Organization (ECCO), 24.-26.02.2011, Dublin, Ireland.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Lissner D, Sonnenberg E, Siegmund B. [Inflammatory bowel disease: cardinal signs and their diagnostics]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2018 Jul;113(13):937-944. doi: 10.1055/a-0612-3564. Epub 2018 Jul 4. Review.

Chaparro M, Verreth A, Lobaton T, Gravito-Soares E, Julsgaard M, Savarino E, Magro F, Avni Biron I, Lopez-Serrano P, Casanova MJ, Gompertz M, Vitor S, Arroyo M, Pugliese D, Zabana Y, Vicente R, Aguas M, Bar-Gil Shitrit A, Gutierrez A, Doherty GA, Fernandez-Salazar L, Martínez Cadilla J, Huguet JM, O'Toole A, Stasi E, Manceñido Marcos N, Villoria A, Karmiris K, Rahier JF, Rodriguez C, Diz-Lois Palomares M, Fiorino G, Benitez JM, Principi M, Naftali T, Taxonera C, Mantzaris G, Sebkova L, Iade B, **Lissner D**, Ferrer Bradley I, Lopez-San Roman A, Marin-Jimenez I, Merino O, Sierra M, Van Domselaar M, Caprioli F, Guerra I, Peixe P, Piqueras M, Rodriguez-Lago I, Ber Y, van Hoeve K, Torres P, Gravito-Soares M, Rudbeck-Resdal D, Bartolo O, Peixoto A, Martin G, Armuzzi A, Garre A, Donday MG, Martín de Carpi FJ, Gisbert JP.. Long-Term Safety of In Utero Exposure to Anti-TNF α Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Results from the Multicenter European TEDDY Study. *Am J Gastroenterol.* 2018 Mar;113(3):396-403. doi: 10.1038/ajg.2017.501. Epub 2018 Feb 20.

Lissner D, Glauben R, Allers K, Sonnenberg E, Loddenkemper C, Schneider T, Siegmund B. Pulmonary Manifestation of Crohn's Disease Developed Under Treatment With Vedolizumab. *Am J Gastroenterol.* 2018 Jan;113(1):146-148. doi: 10.1038/ajg.2017.395.

Lissner D, Siegmund B. Are Immunosuppressants Becoming Obsolete? *Dig Dis.* 2016;34 Suppl 1:56-60. doi: 10.1159/000447376. Epub 2016 Aug 22. Review.

Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kühl AA, Erben U, May C, Schulzke JD, Siegmund B. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Jun;21(6):1297-305. doi: 10.1097/MIB.0000000000000384.

Lissner D, Siegmund B. Ulcerative colitis: current and future treatment strategies. *Dig Dis.* 2013;31(1):91-4. doi: 10.1159/000347194. Epub 2013 Jun 17. Review.

Lissner D, Siegmund B. The multifaceted role of the inflammasome in inflammatory bowel diseases. *ScientificWorldJournal.* 2011 Jul 28;11:1536-47. doi: 10.1100/tsw.2011.139. Review.

Papay P, Reinisch W, Ho E, Gratzer C, **Lissner D**, Herkner H, Riss S, Dejaco C, Miehsler W, Vogelsang H, Novacek G. The impact of thiopurines on the risk of surgical recurrence in patients with Crohn's disease after first intestinal surgery. *Am J Gastroenterol.* 2010 May;105(5):1158-64. doi: 10.1038/ajg.2009.673. Epub 2009 Dec 15.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Professor Siegmund für ihre ansteckende Begeisterung für die experimentelle Forschung sowie ihre Unterstützung während der experimentellen Arbeit und des Schreibprozesses.

Ich danke der gesamten AG Siegmund, insbesondere Herrn Dr. Arvind Batra und Frau Inka Freise, für die praktische Unterstützung im Labor.

Mein Dank gilt auch der gesamten AG Schulzke, und hier im Besonderen Herrn Dr. Michael Schumann und Frau Claudia May, für die praktische Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der Co-Kulturen, der Epithelwiderstandsmessungen und der Immunofluoreszenzfärbungen.

Ich danke Frau Privatdozentin Dr. Anja Kühl und Frau Simone Spieckermann für die Hilfe bei den immunhistologischen Färbungen sowie Fr. Dr. Lea-Isabell Kredel für die Bereitstellung der im Rahmen ihrer Doktorarbeit angefertigten immunhistochemischen Färbungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für das Korrekturlesen, sowie ihnen und meinen Schwiegereltern für die Hilfe bei der Kinderbetreuung.