

**Dibenzazepin assoziierte sekretorische Transformation
und Bakterizidie enterozytärer Zellen**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Danika Weisner

aus Dortmund

Berichter: Univ. Prof. Dr. med. Nikolaus Gaßler
Prof. Dr. rer. nat. Christian Liedtke

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2022

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online
verfügbar.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1 Der menschliche Gastrointestinaltrakt	4
1.2 Aufbau und Funktion der Darmschleimhaut	6
1.3 Der Notch Signalweg	9
Die Rolle des Notch Signalweges in der Pathogenese verschiedener Darmerkrankungen.....	11
1.4 Aufbau und Funktion des γ -Sekretase-Inhibitors (GSI).....	12
1.5 Die Apoptose als Form des Zelltodes durch Caspase8 reguliert	13
1.6 Das kolorektale Karzinom	15
1.7 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	16
1.7.1 Colitis ulcerosa	17
1.7.2 Morbus Crohn (Enterocolitis regionalis).....	18
1.8 Abwehrmechanismen des Darms	19
1.8.1 Das angeborene Immunsystem.....	20
1.8.2 Das adaptive Immunsystem	21
1.8.3 α -Defensin	21
1.9 Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Chemikalien.....	26
2.1.3 Verbrauchsmittel	27

2.1.4 Reagenzien	28
2.1.4.1 Medien, Puffer, Lösungen	28
2.1.4.1.1 Medien für die Zellkultur	28
2.1.4.1.2 Medien für die Bakterienkultur	29
2.1.4.1.3 Medien für die Weiser-Methode	29
2.1.5 Zelllinien	30
2.1.6 Versuchstiere	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Zellkulturtechnik	31
2.2.1.1 Kultivierung und Passage von humanen Zelllinien	31
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
2.2.1.3 Behandlung von Zellen mit dem γ -Sekretase Inhibitor Dibenzazepine (DBZ)	32
2.2.2 Tierexperimentelle Methoden	33
2.2.2.1 Haltung von Versuchstieren	33
2.2.2.2 Behandlung mit Dibenzazepin (DBZ)	33
2.2.2.3 Euthanasierung und Organentnahme	33
2.2.2.4 Kryptenisolation an murinem Dünndarm (Weiser Methode)	33
2.2.2.5 Herstellung von Paraffingewebsschnitten	34
2.2.2.6 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)	35
2.2.3 Bakterizitätsassay	35
2.2.3.1 Herstellung der LB-Agar-Platten	35
2.2.3.2 Methoden der Quantifizierung von bakteriellem Wachstum	36
2.2.3.2.1 Messung der optischen Dichte (OD)	36
2.2.3.2.2 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums durch Bestimmung der <i>colony forming units</i> (CFUs)	36
2.2.3.3 Durchführung des Bakterizitätsassays an Zellkulturproben	36
2.2.3.4 Durchführung des Bakterizitätsassays an murinen Proben	36
2.3.4 Statistische Auswertung	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Bakterizitätsassay mit Proben der Zellkulturexperimente	38

3.1.1 Inkubationszeit-abhängige Induktion von Bakterizidie in CaCo2 ^{ΔCasp8} und wt durch DBZ Behandlung.....	38
3.1.2 Fehlende Induktion von Bakterizidie durch DBZ Behandlung im Colo320 Zellkulturmodell	43
3.2 Die erfolgreiche Etablierung der Weiser Methode.....	46
3.3 Auswertung des Bakterizitätsassays mit den Proben des Mausmodells.....	48
3.3.1 Unterschiede der antimikrobiellen Funktion von Darmepithel nach DBZ Behandlung entlang der Krypten-Zotten-Achse.....	48
4. Diskussion	51
4.1 Bakterizidie der Darmschleimhaut	51
4.2 Modellierung von intestinalem Epithel mittels Zellkulturmodellen	54
4.3 Die Rolle von Caspase8 in der Bakterizidie des Darmepithels	56
4.4 Auswirkung der Transfektion auf das Zellkulturmodell.....	59
4.5 Interaktion von Notch in der Bakterizidie intestinalen Epithels	60
4.6 Die Rolle der Notch Inhibition als reverse Modulation bei Caspase8 Verlust	63
4.7 Inhibierung von Notch als therapeutischer Ansatz	65
5. Zusammenfassung.....	69
6. Summary	70
7. Abbildungsverzeichnis	71
8. Literaturverzeichnis	72
9. Danksagung.....	80

10. Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung.....	81
11. Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung	82
12. Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase 10
AMP	Antimikrobielle Peptide
Apc	Adenomatous-polypsis-coli-Protein
Atoh1	Atonal homologue 1
BMP	bone morphogenic protein
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
Casp8	Caspase8
CFU	colony forming units
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CSL	DNA-Bindungsprotein
DBZ	Dibenzazepin
DED	death receptor domain
DISC	death inducing signaling complex
DLL	Delta-like Liganden
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Echeria coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor

FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
F. prausnitzii	Faecalibacterium prausnitzii
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FKS	Fetales oder Fötales Kälberserum
GSI	γ -Sekretase-Inhibitor
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animal Science
HE	Hämatoxylin-Eosin
HD	Human Peditid
Herp/Hey	Hes-related repressor proteins with Y-box
Hes1	Hairy enhancer of split
IBD	Inflammatory bowel disease
JAG	Serrate-like Liganden
LB	lysogeny broth
Math1	Mous homologue of Atonal
Mash	Mouse homologue of Achat/Scute
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
M. Crohn	Morbus Crohn
NEXT	Notch extracellular trunction
NICD	intracellular domain of the notch protein
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OD	Optical density/ optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
RIP3	receptor-interacting protein 3
RNA	Ribonukleinsäure

siRNA	Small/short Ribonukleinsäure
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TGF-beta	transforming growth factor- β
TNF	tumor necrosis factor receptor
wt	Wildtyp
Δ	knockout

1. Einleitung

1.1 Der menschliche Gastrointestinaltrakt

Der menschliche Verdauungstrakt besteht aus verschiedenen Abschnitten. Vom Rachen aus beginnend unterteilt man ihn in Speiseröhre, Magen und Darm. Der Darm ist wiederum gegliedert in den Dünndarm und in den Dickdarm (Lüllmann-Rauch 2009). Während der frühen embryonalen Entwicklung entstehen drei Abschnitte des Verdauungstraktes. Der vordere Anteil entwickelt sich zum Rachen, der Speiseröhre und dem Magen. Aus dem mittleren Anteil bildet sich der Dünndarm und der hintere Anteil entwickelt sich zum Dickdarm. Die primäre Aufgabe des menschlichen Verdauungstraktes besteht in der Verdauung von Nahrung, die Aufnahme von Nährstoffen und Wasser und der zellulären Abwehr gegen Pathogene und Mikroorganismen (Vooijs et al. 2011). Die Nahrungsaufnahme erfolgt über den Mund. Dort wird sie zerkleinert und mit Speichel vermengt. Dies dient einerseits der besseren Gleitfähigkeit, andererseits enthält der Speichel das Enzym Amylase, welches Kohlenhydrate spaltet. Durch den Rachen gelangt der Speisebrei in die Speiseröhre und von dort aus in den Magen. In den nachfolgenden Abschnitten des Verdauungstraktes findet die enzymatische Aufspaltung der Nahrung in Aminosäuren, Zucker und Lipide statt. Diese werden mit Wasser und Ionen resorbiert. Im Magen (*Gaster*) wird der Nahrungsbrei weiter zerkleinert und homogenisiert. Dies geschieht durch den Magensaft, der Salzsäure (pH 1-1,5), Wasser, Elektrolyte und verschiedene schleimbildende Substanzen und Proteine enthält. Täglich werden etwa 1-3l des Magensaftes sezerniert. Außerdem besitzt der Magen eine Reservoirfunktion und entleert portionsweise Speisebrei in den Dünndarm (*Intestinum tenue*). Dieser reicht vom Magenpförtner (*Pylorus*) bis zur Bauhinschen Klappe (*Ostium ileale*) und ist 3-5m lang. Der Dünndarm gliedert sich in drei Abschnitte. Im Anschluss an den Magen beginnt der C-förmige Zwölffingerdarm (*Duodenum*). Durch die gemeinsamen Ausführungsgänge von Leber und Pankreas im Duodenum und durch die sich im Duodenum befindlichen Brunner Drüsen wird dem Speisebrei alkalisches Sekret beigegeben und somit neutralisiert. An das Duodenum schließen sich der Leerdarm (*Jejunum*) und der Krummdarm (*Ileum*) an. Diese werden oft gemeinsam als Dünndarmkonvolut bezeichnet. Im Dünndarm findet der größte Anteil der enzymatischen Spaltung

der Nahrung statt (Aumüller 2010). Diese beginnt im Lumen, der letzte Spaltungsschritt und die Resorption der Bestandteile übernimmt die Schleimhaut (Lüllmann-Rauch 2009). Zusätzlich wird im Dünndarm ein großer Anteil des im menschlichen Körper verfügbaren Wassers gespeichert. Durch die Bauhinsche Klappe gelangt der Speisebrei in den Dickdarm (*Intestinum crassum*). Dieser wird wiederum in Blinddarm (*Caecum*) mit Wurmfortsatz (*Appendix vermiformis*), Grimmdarm (*Colon*, Kolon), Mastdarm (*Rektum*) und Analkanal (*Canalis analis*) eingeteilt und ist etwa 1,3m lang. Im Dickdarm erfolgt die Rückresorption von Wasser aus dem Speisebrei, wodurch eine Eindickung bezweckt wird. Zur besseren Gleitfähigkeit werden zusätzlich Muzine sezerniert. Weiterhin befinden sich im Dickdarm verschiedene anaerobe Bakterien, die die noch enthaltenen Nahrungsbestandteile weiter aufspalten. Das Kolon wird in vier Abschnitte gegliedert, Kolon ascendens, Kolon transversum, Kolon descendens und Kolon sigmoideum (Sigma). An das Kolon schließen sich Rektum und Analkanal an. Diese dienen der gemeinsamen Aufgabe der Stuhlausscheidung (*Defäkation*) (Aumüller 2010). Der Wandaufbau gliedert sich in allen Abschnitten des Verdauungstraktes gleich. Von innen nach außen findet man die Schleimhaut (*Mukosa*), die *Submukosa*, die *Muskularis* mit Ring- und Längsmuskelschicht, und *Subserosa und Serosa* bei Peritonealüberzug oder bei fehlendem Peritonealüberzug die *Adventitia* (Lüllmann-Rauch 2009).

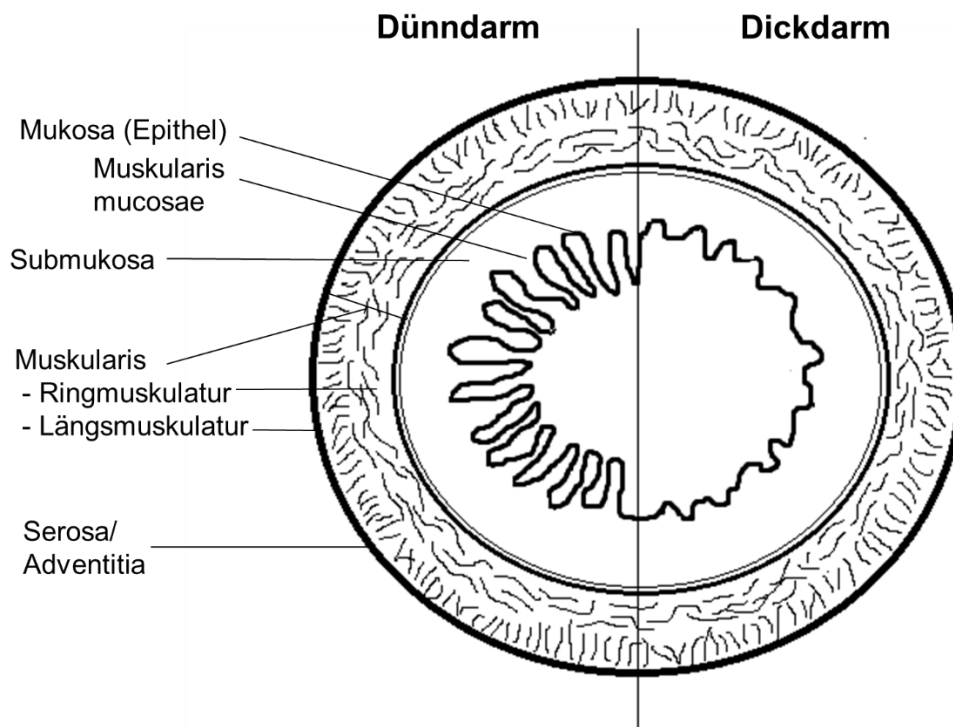


Abb. 1 Schematischer Aufbau der Darmwand (vgl. Lüllmann-Rauch 2009)

1.2 Aufbau und Funktion der Darmschleimhaut

Die Schleimhaut (*Mukosa*) des Darms besteht aus einem einschichtigen Zylinderepithel. Sie dient als Barriere eines kontrollierten transzellulären und auch extrazellulären diffusionsartigen Transportes, die u.a. durch *tight* und *adherens junctions* (diese beinhalten z.B. Cadherine, Catenine, Occludine, Desmogleine) aufrechterhalten wird (Jeon et al. 2013). Die Funktionen der Barriere sind regionär deutlich verschieden. Die Oberfläche der Schleimhaut des Dünndarms ist durch Falten, Zotten und Mikrovilli stark vergrößert (etwa 200m²). Die Mukosa bildet fingerförmige Ausstülpungen, die Zotten (*Villi intestinales*) und Krypten (*Cryptae intestinales*, *Lieberkühn-Krypten*) genannt werden. Die Zotten, lumenwärts gerichtete, apikale Ausstülpungen der Schleimhaut, haben vor allem die Funktion der Resorption (Lüllmann-Rauch 2009). Sie bilden sich bereits ab dem 15. Tag der Embryonalentwicklung aus, wohingegen die Krypten durch Invagination erst nach dem 7. postnatalen Tag entstehen (Crosnier et al. 2006). Die Schleimhaut des Darms wird aus vier wesentlichen Zelltypen gebildet. Der Hauptanteil dieser Zellen sind Enterozyten (etwa 80%). Es handelt sich hierbei

um hochprismatische Zellen, die apikal einen Bürstensaum aus Mikrovilli besitzen und vornehmlich absorptiv aktiv sind. Zu den sekretorischen Zellen zählen Becherzellen, Panethzellen und enteroendokrine Zellen. Becherzellen (etwa 5% der Deckzellen) produzieren Schleim (*Mukus*), der als Barriere gegen den Darminhalt fungiert. Histologisch sind diese Zellen durch Mukuseinschlüsse im Zytoplasma erkennbar, die zu einer basalen Verlagerung des Zellkerns führen. Sie haben einen Lebenszyklus von etwa drei Tagen. Die Panethzellen sind hochprismatische Zellen mit apikal lokalisierten Granula und einem Lebenszyklus von etwa 20 Tagen. Sie liegen in den basalen Krypten der Dünndarmschleimhaut und produzieren antimikrobielle Peptide (insbesondere Defensine und Lysozym). Enteroendokrine Zellen sind vergleichsweise kleine konfigurierte Zellen mit basal lokalisierten Granula und werden in unterschiedliche Subtypen eingeteilt. Sie produzieren Hormone, die unter anderem die Mobilität des Gastrointestinaltraktes beeinflussen (Crosnier et al. 2006, de Santa Barbara et al. 2003, Lüllmann-Rauch 2009). Die Schleimhautarchitektur des Dickdarms unterscheidet sich von der des Dünndarms durch die Abwesenheit der Zotten (Crosnier et al. 2006) und durch die Bildung von Falten (*Plicae semilunares*) zur Vergrößerung der Oberfläche. Diese sind nicht dauerhaft vorhanden, sondern entstehen durch Kontraktionen der *Muskularis propria*. Die Krypten des Dickdarms sind im Vergleich zum Dünndarm dichter und tiefer. Das Epithel ist ebenfalls einreihig und hochprismatisch. Es besteht vor allem aus den Enterozyten (sog. Kolonozyten), die von zahlreichen Becherzellen und einzelnen weiteren Zelltypen durchsetzt sind. Die Anzahl der Becherzellen nimmt in Richtung aboral zu. Im Analkanal geht das Drüsenepithel in das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel, das sog. Anoderm über (Lüllmann-Rauch 2009).

Alle vier Zelltypen der Dünndarmschleimhaut gehen aus adulten, multipotenten intestinalen Stammzellen hervor. Die Proliferation und Differenzierung aus Stammzellen beginnt in den basalen Krypten. Innerhalb von 2-7 Tagen erfolgt eine Migration entlang der Krypten-Zotten-Achse in Richtung Lumen. Eine Ausnahme bilden die sich differenzierenden Panethzellen, die abwärts in die Krypten migrieren (van Es et al. 2010). Jede Krypte enthält 4-6 langlebige Stammzellen (van Es et al. 2010). Man unterscheidet zwischen einem basalen,

proliferativen Segment in den Krypten und einem differenzierten und funktionalen Segment in den Zotten. Um den vielfältigen Anforderungen gerecht zu werden besitzt das gastrointestinale Epithel eine hohe Teilungsrate. In durchschnittlich 60h erfolgt eine komplette Selbsterneuerung des Epithels (Vooijs et al. 2011). Gewebe, welche wie die Darmschleimhaut eine hohe Rate an Proliferation, Selbsterneuerung, Migration und Zelltod (Apoptose) aufweisen, unterliegen einer strengen Regulation. Dass die zelluläre Regeneration der Darmschleimhaut in einem Gleichgewicht ist, erfolgt durch strenge Regulation mittels verschiedener Signalwege wie Notch, Wnt, Hippo, TGF- β (transforming growth factor- β)/ BMP (bone morphogenic protein) und Hedgehog (Jeon et al. 2013, Riccio et al. 2008). Durch diese Signalwege werden unterschiedliche Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose gesteuert (de Santa Barbara et al. 2003).

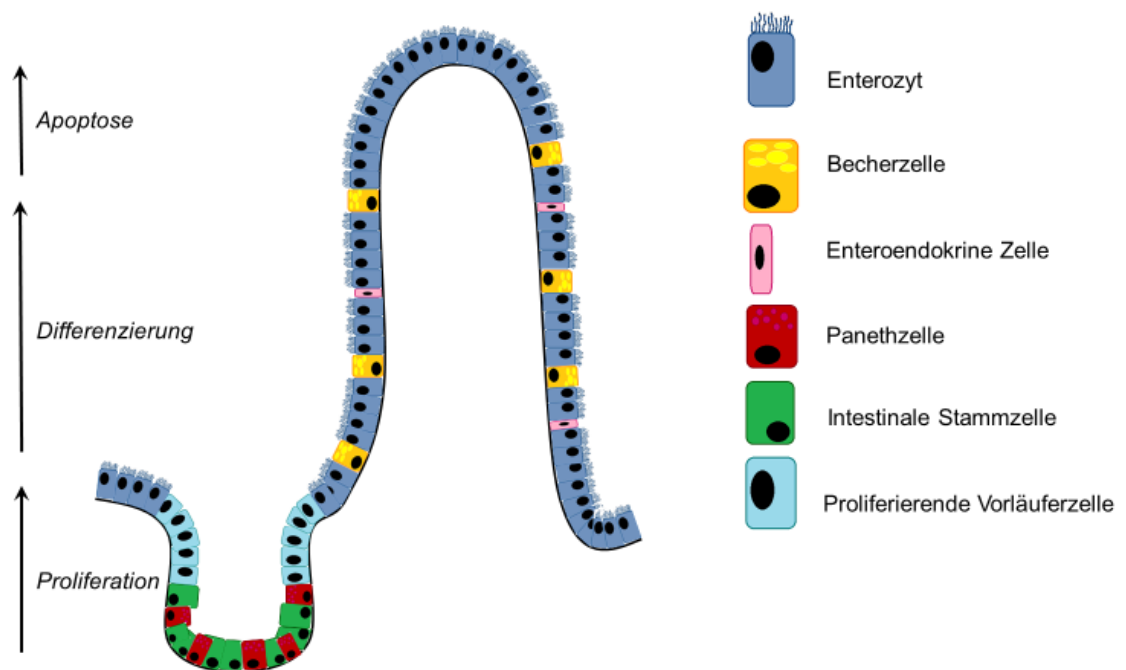


Abb. 2 schematische Darstellung des Dünndarmepithels entlang der Krypten-Zotten-Achse (modifiziert nach Jeon et al. 2013)

1.3 Der Notch Signalweg

Der Notch Signalweg ist ein proteolysebasierter Signalweg und als Kommunikationsmechanismus in allen mehrzelligen Lebewesen zu finden (Vooijs et al. 2011). In Säugetieren kommt er in unterschiedlichen Gewebearten wie dem Gastrointestinaltrakt, der Haut, der Leber, den Nieren, dem Nervensystem und in Knochen und Muskulatur vor. Die genauen Auswirkungen des Notch Signalweges sind abhängig vom Zelltyp, dem Zellstatus und der Art der Kommunikation. Im Darm reguliert der Notch Signalweg Differenzierung und Proliferation von intestinalen Stammzellen zugunsten der absorptiven Zellen (Enterozyten). Bei Aktivierung des Notch Signalweges findet eine verminderte Differenzierung der sekretorisch aktiven Zellen (Becherzellen, Panethzellen, enteroendokrine Zellen) statt (VanDussen et al. 2012). Durch das Notch Signalling wird offenbar die Richtung der Zelldifferenzierung entscheidend beeinflusst (Pantanowitz et al. 2012). Der Notch Signalweg ist nach einer in Säugetieren vorkommenden Familie von Rezeptorproteinen (Notch-1 bis -4) benannt, welche die Kommunikation zwischen den benachbarten Zellen ermöglichen (Vooijs et al. 2011). Die Notch Rezeptoren sind Typ 1 transmembrane Rezeptoren, deren extrazelluläre Domäne aus drei cysteinreichen Lin12-Notch Wiederholungen (Lin12-Notch *repeats*) und der Domäne für Heterodimerisierung gebildet wird. Zusammen bilden sie die negativ regulatorische Region (*negative regulatory region*), die ohne Beisein eines Liganden den Rezeptor blockiert. Zu der extrazellulären Domäne gehören zusätzlich 29-36 EGF Wiederholungen. Transmembran befindet sich eine einzelne Domäne (*single transmembrane domain*), gefolgt von einer großen intrazellulären Einheit (RBPjk assoziierte Einheit, *nuclear localization signals*, sieben Ankyrin Wiederholungen und der PEST Domäne).

Die Aktivierung des Notch Signalweges erfolgt durch die Bindung eines Liganden, der durch eine Nachbarzelle präsentiert wird. Typische Liganden sind Typ 1 Transmembranproteine wie Delta-like Liganden (Dll 1,3,4) oder Serrate-like Liganden (Jagged 1 und 2/JAG1 und JAG2). Die Bindung eines Liganden bewirkt die Entfaltung von ADAM10, einer Protease die Notch spaltet. Durch diese Spaltung entsteht NEXT (*notch extracellular trunction*), welches ein direktes Substrat für eine weitere wichtige Protease im Notch Signalweg ist, die

γ -Sekretase. Die γ -Sekretase ist eine in der Membran verankerte Spaltungseinheit, die die intrazelluläre Domäne von Notch (*NICD*) freisetzt. Ohne weitere Zwischenschritte transloziert die *NICD* in den Zellkern. Dort bindet sie das DNA-Bindungsprotein CSL (CBF-1 in Menschen, RBPjk in Mäusen) und induziert die Transkription der Zielgene von Notch. Die am besten charakterisierten Zielgene von Notch sind Hes1 (*hairy enhancer of split*) und Herp/Hey (*Hes-related repressor proteins with Y-box*). Sie gehören der Familie der basic Helix-Loop-Helix Transkriptions Repressor Proteine an, die die Aktivität verschiedener Gene, beispielsweise Math1 (*mouse homologue of Atonal*) und Mash (*mouse homologue of Achat/Scute*), unterdrücken (Vooijs et al. 2011). Im Gastrointestinaltrakt reguliert der Notch Signalweg die Differenzierung und Proliferation von intestinalen Stammzellen (VanDussen et al.). Diese Regulierung geschieht in Vorläuferzellen im basalen, proliferativen Segment der Krypten (Ahmed et al.). Gleichzeitig hat Notch auch Auswirkungen auf die Regeneration und die Barrierefunktion der Darmschleimhaut (Jeon et al. 2013). Es ist davon auszugehen, dass die Dysregulation von Notch mit der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn vergesellschaftet ist (Jeon et al. 2013). Im Mausmodell mit Mutation des *Apc* Tumorsuppressorgens bewirkt die Hemmung von Notch eine vermehrte Differenzierung von sekretorisch Zellen. Andere Erkrankungen, die mit Defekten des Notch Signalweges assoziiert sind, sind Multiple Sklerose, CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) und die T-ALL (T-Zell akute lymphatische Leukämie). Eine Störung der Balance der verschiedenen Signalwege, die an der Regulation des Darmepithels beteiligt sind, resultiert außerdem in entzündlichen Prozessen und autoimmun vermittelten Erkrankungen.

Die Architektur der Krypten-Zotten-Achse wird vornehmlich durch Wnt, Hedgehog und TGF- β /BMP reguliert, wohingegen die Kontrolle über das Schicksal der Stammzellen vor allem Wnt, Notch und Hippo obliegt (Jeon et al. 2013).

Die Rolle des Notch Signalweges in der Pathogenese verschiedener Darmerkrankungen

Der Notch Signalweg beeinflusst gemeinsam mit dem Wnt Signalweg die Regulation von Proliferation und Differenzierung im intestinalen Epithel und entscheidet über das Schicksal der Vorläuferzellen (Okamoto et al. 2009).

Solide Tumoren, wie das kolorektale Karzinom, sind der häufigste Tumortyp des Darmes. Ihr Malignitätspotential ist durch die erhöhte Proliferation, verringerte Apoptose und unzureichende zelluläre Differenzierung determiniert (Fernandez-Majada et al. 2007). In Studien konnte in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten eine erhöhte Aktivität des Notch Signalweges nachgewiesen werden. Feststellen lässt sich diese beispielsweise bei der akuten lymphatischen Leukämie mit T-zellulärer Ausprägung (T-ALL), dem kolorektalen Karzinom, in Medulloblastomen, in Ovarialkarzinomen, in Bronchialkarzinomen und in Mammakarzinomen. Eine Dysregulation des Notch Signalweges ist außerdem

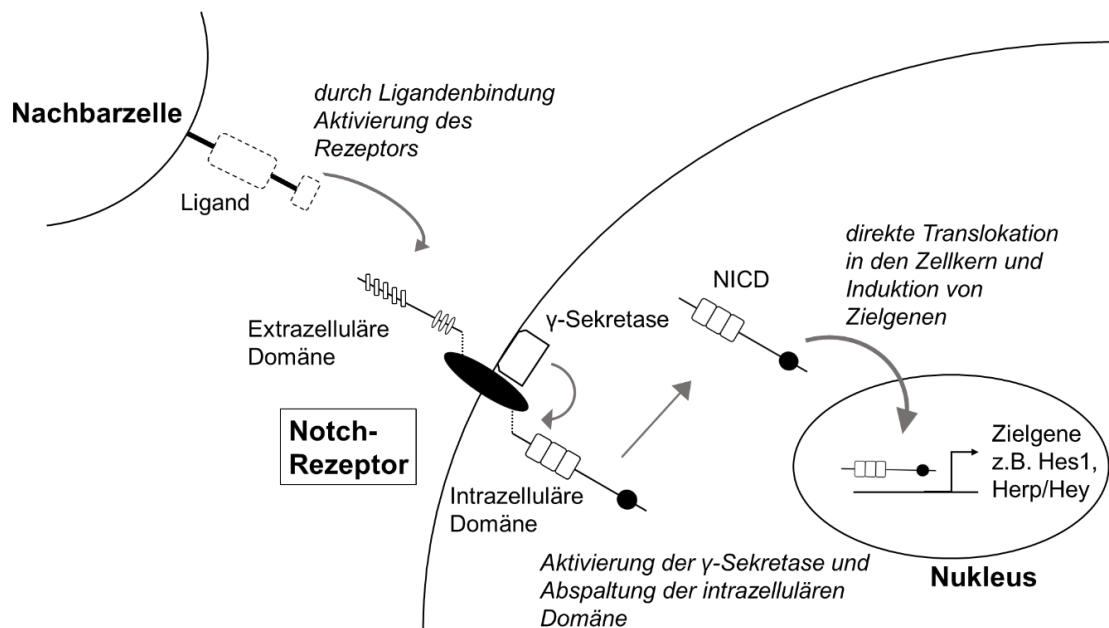


Abb. 3 Vereinfachte schematische Darstellung des Notch Signalweg (modifiziert nach Jeon et al. 2015) Die Ligandenbindung aktiviert die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors. Durch wiederholte Spaltungsprozesse wird die γ -Sekretase aktiviert, die die intrazelluläre Domäne (NICD) abspaltet. Diese kann direkt in den Zellkern translozieren wo sie die die Zielgene Notch Signalweges, bspw. Hes1, induziert.

mit der Entwicklung von Pankreastumoren assoziiert (Harper et al. 2003). Auch in den Zellen der intestinalen Metaplasie eines Barrett Ösophagus lässt sich eine erhöhte Aktivität des Notch Signalweges nachweisen (Menke et al. 2010). Um

die Notch Aktivität in kolorektalen Karzinomen zu messen wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Patienten mit kolorektalen Karzinomen zeigen beispielsweise den Verlust von Atoh1 (entspricht Math1), welches physiologisch Proliferation und Apoptose reguliert und als Tumorsuppressorgen fungiert (Bossuyt et al. 2009). Hes-1 hingegen, eines der Zielgene des Notch Signalweges, zeigt sich in vielen Neoplasien des Darms überexprimiert (Fernandez-Majada et al. 2007). Besonders in Adenomen und in den frühen Stadien von kolorektalen Karzinomen konnte eine Erhöhung der Aktivität des Notch Signalweges festgestellt werden (Sikandar et al. 2010), wohingegen im Krankheitsverlauf und bei metastasierten Erkrankungen die Aktivität des Notch Signalweges nicht erhöht ist. Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurden Studien konzipiert, welche die Inhibierung des Notch Signalweges zum Gegenstand haben. Ein molekularer Angriffspunkt ist die γ -Sekretase, für die Inhibitoren (GSI) entwickelt wurden (Veenendaal et al. 2008).

1.4 Aufbau und Funktion des γ -Sekretase-Inhibitors (GSI)

γ -Sekretasen sind Komplexe aus Aspartylproteasen, die in der Membran von Zellen, bspw. der Empfängerzelle liegen. Sie spalten Typ 1 Membranproteine wie beispielsweise den Notchrezeptor oder das Amyloid- β -Protein (A β). Aufgebaut sind sie aus vier Anteilen, Presenilin, Pen2, Nicastrin und Aph1, wobei die genaue Zusammensetzung dieser Proteine bislang nicht vollständig geklärt ist (Sato et al. 2007, Wong et al. 2004). In *in vivo* und *in vitro* Studien wurden verschiedene Inhibitoren der γ -Sekretasen untersucht. Zu den GSI zählen beispielsweise LY-411,575, Dibenzazepine (DBZ), Benzodiazepine (BZ) und Arylsulfonamide (AS). Die verschiedenen GSI verfügen über unterschiedliche Wirkungsspektren (Milano et al. 2004). Ursprünglich wurden die GSI zur Behandlung der Alzheimer Krankheit entwickelt. LY-411,575, ein GSI mit hoher Potenz, reduziert *in vitro* und *in vivo* die Produktion von A β Proteinen, welche sich im zentralen Nervensystem zu Plaques ablagern können und eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung spielen (Wong et al. 2004). Des Weiteren führt die Behandlung mit GSI zu einer Blockade des Notch-Signalweges (van Es et al. 2005).

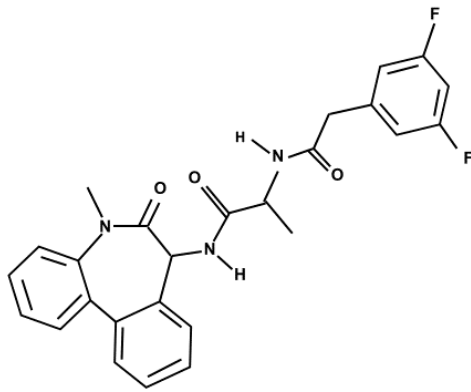


Abb. 4 Chemische Strukturdarstellung des γ -Sekretase-Inhibitors Dibenazepine (DBZ) (modifiziert nach Jeon 2015)

1.5 Die Apoptose als Form des Zelltodes durch Caspase8 reguliert

Die Apoptose beschreibt eine Art des programmierten Zelltodes und der Begriff, der aus dem Altgriechischen stammt, wurde erstmalig von Kerr et. al 1972 benutzt (Lawen 2003). In der Erhaltung des Gleichgewichts selbsterneuernden Gewebes spielt die Apoptose eine wichtige Rolle zur Eliminierung von fehlerhaften und destruierten Zellen (Degterev et al. 2003). Während der physiologischen Entwicklung ist sie eine Antwort auf zellulären Stress (Fulda & Debatin 2006). Die Apoptose einer Zelle kann prinzipiell durch zwei verschiedene Wege aktiviert werden, intrinsisch und extrinsisch (Algeciras-Schimmich et al. 2002). Die extrinsische Aktivierung ist rezeptorvermittelt, beispielsweise über Fas oder TNF-Rezeptoren (*tumor necrosis factor receptor*). Durch Ligandenbindung und Rekrutierung weiterer Proteine entsteht ein Komplex den man *death inducing signaling complex* (Musio et al.) nennt. Dies resultiert in der Aktivierung der Caspasen Kaskade. Der intrinsische oder auch intrazelluläre Weg zur Aktivierung von Apoptose kann durch verschiedene intrazelluläre Stimuli wie DNA-Zerstörung, oxidativen Stress oder cytotoxische Medikamente ausgelöst werden. Die Mitochondrien setzen verschiedene Stoffe frei, die zur Bildung eines Apoptosoms beitragen, welches die Aktivität von Caspasen katalysiert (Barnhart et al. 2003, Degterev et al. 2003). Apoptose kann durch verschiedene Faktoren wie Verlust der Zell-Zell-Kontakte, Toxine oder Zellstress zusätzlich getriggert werden (Lawen 2003).

Bei Caspasen handelt es sich um eine Familie cysteinhaltiger Proteasen, die in einer inaktiven Form in nahezu allen tierischen Zellen exprimiert und synthetisiert werden. Bisher sind zwölf verschiedene Caspasen (1-10, 12, 14) bekannt, die anhand ihrer Funktion in zwei Untergruppen aufgeteilt werden (Degterev et al. 2003, Launay et al. 2005, Lawen 2003). Die eine Gruppe umschreibt Initiatoren, die für die Aktivität der anderen Gruppe, der Effektoren, verantwortlich sind. Effektoren verändern sich während des Apoptosevorgangs morphologisch durch Spaltung. Alle Caspasen sind sich vom Aufbau her generell ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer aktiven Einheit voneinander. Sie werden durch Spaltung aktiviert und bestehen aus einer kleinen und großen Untereinheit (Barnhart et al. 2003, Degterev et al. 2003). Caspase8 ist eine Initiator Caspase, die in den Signalweg der rezeptorvermittelten Apoptose involviert ist (Launay et al. 2005). Sie wird, wie Caspase10, vom Chromosomenabschnitt 2q33 kodiert. Um Anteil an der rezeptorvermittelten Aktivierung der Apoptose zu nehmen, enthält Caspase8 eine *death receptor domain* (DED), eine spezialisierte Proteindomäne die Protein-Protein-Interaktionen beinhaltet (Barnhart et al. 2003). Die Aktivierung von Caspasen resultiert in Zelltod, weswegen dieser Vorgang streng durch pro- und anti-apoptotische Proteine reguliert wird (Reed 2000). Eine Dysregulation der Apoptose kann folgenschwere Konsequenzen haben, die zur Entstehung von Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder neurodegenerativen Erkrankungen, führen können (Degterev et al. 2003). In verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Bronchialkarzinome, Neuroblastome, Leberkarzinome) liegen Mutationen der Caspase8 vor. Tumorerkrankungen sind häufig durch unregulierte Proliferation gekennzeichnet. Der Verlust von Caspase8 resultiert in Tumorstadium durch fehlende Apoptose (Krelin et al. 2008). Es ist somit gerechtfertigt, Caspase8 als Tumorsuppressor zu bezeichnen. Der funktionelle Verlust von Caspase8 kann beispielsweise durch Hypermethylierung der kodierenden Gene erzeugt werden. Mutierte Caspasen können zusätzlich negativ regulatorische Wirkungen haben (Barnhart et al. 2003). Das relative Level an intrazellulär enthaltenden pro- und anti-apoptotischen Proteinen beeinflusst die Anfälligkeit einer Zelle für Apoptose (Lawen 2003). Neben der Induktion von Apoptose haben Caspasen noch weitere Funktionen, bspw. sind die in die Regulation des Zellzyklus involviert. Außerdem spielen sie eine Rolle in entzündlichen Prozessen, Differenzierung, T- und B-Zell

Proliferation (Launay et al. 2005) sowie der Regulation von Necroptose und Migration (Kaemmerer et al. 2015). Die Mutation oder Dysregulation von Caspasen verfügt somit auch über das Potential, entzündliche Prozesse zu begünstigen oder auszulösen. Studien in denen der Verlust von Caspase8 im intestinalen Deckepithel unter Verwendung eines speziellen Mausmodells (Casp8 *knockout* Mäuse) untersucht wurden, zeigten einen intestinal inflammatorischen Phänotyp. Dieser war schwerpunktmäßig lokalisiert im terminalen Ileum und umfasste teils Befunde eines Morbus Crohn. So fand sich ein Verlust von Panethzellen und eine deutliche Verminderung der Anzahl der Becherzellen. Die Anzahl der Enterozyten und enteroendokrinen Zellen blieb hingegen gleich. In diesem Modell war weiterhin die Expression von Genen, welche Stoffe kodieren, die für die antimikrobielle Antwort wichtig sind (Defensine, Lysozyme, Phospholipase), vermindert, was auf eine mögliche Rolle von Caspase8 in der Regulation der angeborenen Immunantwort des intestinalen Epithels hinweist. Des Weiteren wurde im Kryptenkompartiment eine erhöhte Zelltodrate festgestellt, die anhand der zu erkennenden histomorphologischen Merkmale hauptsächlich durch Necroptose erklärt werden kann. Auch diese Form von Zelltod ist TNF-R vermittelt und ist mit einer erhöhten Expression von RIP3 (*receptor-interacting protein 3*) assoziiert. Patienten mit M. Crohn zeigen ebenfalls eine erhöhte Expression von RIP3 in Panethzellen (Gunther et al. 2011). Caspase8 beeinflusst neben Apoptose und Necroptose auch die Migration von Enterozyten. Eine gestörte Migration der Enterozyten entlang der Krypten-Zotten-Achse begünstigt die Entstehung von entzündlichen Prozessen im Gastrointestinaltrakt (Kaemmerer et al. 2015).

1.6 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist ein epithelialer Tumor. In der Regel präsentiert sich der Tumor mit einer drüsigen Differenzierung als Adenokarzinom und infiltriert von der Darmschleimhaut aus in tiefere Wandschichten (Herold 2016). Bei Männern stellt es die dritthäufigste, bei Frauen die zweithäufigste krebisbedingte Todesursache dar (Torre et al. 2015). Der Tumor betrifft Männer häufiger als Frauen und tritt zumeist sporadisch, seltener im Rahmen von hereditären Syndromen (FAP, Lynch-Syndrom) auf. Häufig entsteht der Tumor im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz, in der aus Adenomen, sog. intraepitheliale

Neoplasien des Drüsenepithels, Karzinome entstehen. Adenome stellen fakultative Präkanzerosen dar, deren Erkennung und Abtragung eine zentrale Rolle in der Vorsorge der kolorektalen Karzinoms spielen. Risikofaktoren für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms sind beispielsweise eine positive Familienanamnese, fleischreiche und ballaststoffarme Kost und ein hoher Alkoholkonsum (Böcker 2012, Herold 2016). Die genaue Ätiologie der Entstehung von kolorektalen Karzinomen ist nicht abschließend geklärt, jedoch gibt es einige bekannte Mutationen und strukturelle Chromosomenaberrationen, die zur Entstehung von Adenomen und somit auch von Karzinomen beitragen können. Bekannt ist beispielsweise die Mutation des *Apc* Tumorsuppressorgens (Böcker 2012, Fernandez-Majada et al. 2007, van Es et al. 2005). Klinisch zeigt der Tumor keine charakteristischen Frühsymptome, sondern macht sich meist erst im Verlauf durch Blutbeimengungen im Stuhl, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten (Durchfall, Obstipation) oder B-Symptomatik (Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsverlust) bemerkbar. Therapiert wird er je nach Ausbreitung und Infiltrationstiefe multimodal chirurgisch sowie strahlen- und chemotherapeutisch (Herold 2016).

1.7 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (*inflammatory bowel disease/ IBD*, CED) werden zunächst die Entitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammengefasst. Es wird davon ausgegangen, dass es sich beim Morbus Crohn um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt. Die genaue Ätiologie der CED ist bislang ungeklärt. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf Initiation und Verlauf der Erkrankungen, wie beispielsweise besondere genetische Konstellationen oder auch Umweltfaktoren, werden diskutiert. Die Pathogenese dieser Erkrankungsgruppe ist bislang ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Anzunehmen ist eine mehrphasige Entwicklung, beginnend mit einer Barrierestörung des Darmepithels, die zum Eindringen von Bakterien in die Darmschleimhaut führt (Herold 2016). Klinische Studien und Tierexperimente bestätigen das vermehrte Vorkommen von Bakterien in der Darmschleimhaut während der entzündlichen Phase (Swidsinski et al. 2002). Die Tiere eines keimfreien Mausmodells zeigen keine Entwicklung einer Entzündungsreaktion der *Mukosa*. In der Kultivierung dieser möglicherweise CED relevanten

intraepithelial vorkommenden Bakterien zeigen sich gehäuft *Escheria coli* (*E. coli*, 50-95% Anteil der intraepithelialen Bakterien), seltener auch *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* oder *Bifidobakterien*. Vermutet wird, dass diese Bakterienbesiedlung zu einer pathologisch gesteigerten Abwehrreaktion gegen die kommensale Bakterienflora führt (Stange & Wehkamp 2016). Infolge dessen entsteht eine lokale Gewebeschädigung mit Ausbildung von Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen (Böcker 2012, Herold 2016).

1.7.1 Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa gehört zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und betrifft typischerweise das Kolon und Rektum. Gelegentlich wird ein Übergriff auf das terminale Ileum gefunden, der retrograde Anschlußileitis genannt wird. Die Colitis ulcerosa ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche Ausbreitung von distal nach proximal mit Ulzerationen und Blutungen der oberflächlichen Schleimhautschichten (*Mukosa* und *Submukosa*) (Böcker 2012). Die Inzidenz für Colitis ulcerosa in Deutschland liegt bei etwa 6/100.000/Jahr. Die Erkrankung tritt gehäuft zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr auf. Die Ätiologie ist multifaktoriell, wobei Rauchen als protektiver Faktor gilt. Klinisch äußert sich die Colitis ulcerosa durch blutig-schleimige Durchfälle und Abdominalschmerzen, vor allem krampfartige linksseitige Unterbauschmerzen vor dem Stuhlgang (*Tenesmen*). Neben den intestinalen Symptomen, kann es zur Ausbildung von extraintestinalen Symptomen kommen (siehe Tabelle 1) (Herold 2016). Die genaue Pathogenese der Erkrankung ist unklar, bekannt ist jedoch eine veränderte Funktionalität der T-Lymphozyten (Böcker 2012). Die Therapie besteht primär in der Verabreichung von immunsuppressiven Medikamenten (z.B. Mesalazin, Kortikosteroide und Immunsuppressiva). Entstehen im Falle von medikamentös nicht mehr kontrollierbaren Krankheitsverläufen Komplikationen (siehe Tabelle 1) kann eine operative Therapie durchgeführt werden. Durch eine komplette Entfernung des Dickdarms (*Proktokolektomie*) ist eine Heilung der Erkrankung möglich (Herold 2016).

Colitis ulcerosa	Morbus Crohn
Hauptsymptome - Blutig-schleimiger Durchfall - Abdominalschmerzen, Tenesmen	Hauptsymptome - Nicht-blutiger Durchfall - rechtsseitige Unterbauchschmerzen (Appendizitis-ähnlich)
Extraintestinale Symptome - <u>Haut</u>: Aphten, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum - <u>Augen</u>: Iritis, Uveitis, Episkleritis, Konjunktivitis - <u>Gelenke</u>: Arthritis, ankylosierende Spondylitis - <u>Leber</u>: primär sklerosierende Cholangitis (PSC), Fettleber	Extraintestinale Symptome - <u>Haut</u>: Aphten, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum - <u>Augen</u>: Iritis, Uveitis, Episkleritis, Konjunktivitis - <u>Gelenke</u>: Arthritis, ankylosierende Spondylitis - <u>Leber</u>: primär sklerosierende Cholangitis (PSC), Fettleber
Komplikationen - Wachstumsstörungen im Kindesalter - Gewichtsverlust - Massive Blutungen - Toxische Kolondilatation - Kolorektales Karzinom	Komplikationen - Fisteln (40%) und anorektale Abszesse (25%) - Wachstumsstörungen im Kindesalter - Malabsorptionssyndrom mit Gewichtsverlust - Darmstenosen ggf. mit (Sub-) Ileus

Abb. 5 tabellarisch dargestellter Vergleich von M. Crohn und Colitis ulcerosa

1.7.2 Morbus Crohn (Enterocolitis regionalis)

Der Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die durch eine diskontinuierliche und segmental auftretende transmurale Entzündung im gesamten Verdauungstrakt gekennzeichnet ist. Typische Lokalisationen sind das terminale Ileum und das proximale Kolon. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei

6/100.000/Jahr und gehäuft tritt die Erkrankung zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr auf. Die Ätiologie ist nicht eindeutig geklärt, jedoch lässt sich eine familiäre Häufung erkennen und das mutierte NOD2-Gen in der homozygoten Form wurde als ätiologisch relevant identifiziert. Raucher sind häufiger von Morbus Crohn betroffen als Nichtraucher. Klinisch zeigen sich bei Morbus Crohn nicht-blutige Durchfälle und rechtsseitige, Appendizitis-ähnliche Unterbauchschmerzen. Besonders Patienten mit M. Crohn weisen extraintestinale Symptome auf (vgl. Abb. 5) (Herold 2016). Endoskopisch erkennt man aphthöse Schleimhautläsionen, Ulzerationen mit einem charakteristischen Kopfsteinpflasterrelief und aufgrund der transmuralen Entzündung im Langzeitverlauf auch Wandverdickungen, Stenosen, Strikturen und Fisteln (Böcker 2012). Behandelt wird der M. Crohn primär medikamentös (Mesalazin, Kortikosteroide, Immunsuppressiva). Bei Komplikationen kann endoskopisch oder operativ interveniert werden. Eine Heilung kann derzeit nicht erzielt werden, bei gutem Therapieerfolg besteht allerdings für die Mehrzahl der Patienten eine normale Lebenserwartung (Herold 2016).

1.8 Abwehrmechanismen des Darms

Zur Abwehr von Mikroorganismen verfügt der Darm über vielfältige Mechanismen. Das Epithel bildet eine geschlossene Grenzschrift als physikalische Barriere gegenüber dem Lumen, gebildet durch Zell-Zell-Kontakte, *tight junctions*. Dem Epithel ist lumenwärts aufgelagerte eine Schleimschicht, die 150µm dick ist (Pantanowitz et al. 2012) und verschiedene antimikrobielle Stoffe, wie Muzine, antimikrobielle Peptide (z.B. Defensine, Lysozyme, Cathelicidine), Antikörper (IgA und IgG) und Phospholipide enthält. Die Mehrzahl dieser Stoffe wird durch Paneth- und Epithelzellen sezerniert. Aufgrund dieser Peptide sind die Schleimschicht und der direkte Bereich über der Schleimschicht nahezu steril (Stange & Wehkamp 2016). Des Weiteren verfügt der Darm über verschiedene zelluläre Abwehrmechanismen. Zum einen enthält die Lamina propria lymphatische Zellen als Mechanismen der erworbenen Abwehr, zum anderen ist das Epithel in die angeborene Immunabwehr einbezogen. Der Darm beinhaltet physiologisch eine bakterielle Flora (kommensale Bakterien), welche die alimentären Nährstoffe weiter verwertet. Das Immunsystem des Darmes zeigt typischerweise eine Toleranz gegenüber diesen Bakterien, weshalb eine

Entzündungsreaktion nicht ausgelöst wird (Lüllmann-Rauch 2009). Bei Störungen der Biohomeostase oder auch verursacht durch mechanische Irritationen der Schleimhaut kann es zur erhöhten Durchlässigkeit (Permeabilität) des Epithels kommen. Anfangs erhöht sich die Durchlässigkeit für kleine Moleküle wie Lactulose. Im Verlauf können jedoch auch Bakterien in das Epithel einwandern. Erreichen diese schließlich die Lamina propria und auch Submukosa, treffen die eingewanderten Bakterien auf verschiedene Abwehrzellen. Dabei handelt es sich um T-Zellen, Dendritische Zellen, Monozyten, bereits ausgereifte Makrophagen und Granulozyten (Stange & Wehkamp 2016). Die Unterscheidung zwischen kommensalen und pathogenen Keimen unterliegt einem Mechanismus, der bis jetzt nicht ausreichend geklärt ist (Lüllmann-Rauch 2009). Verschiedene Anteile der Bakterien, beispielsweise *Flagelline*, werden durch membrangebundene Toll-like-Rezeptoren oder intrazelluläre NOD2-Rezeptoren, ein intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Peptidoglykane, erkannt (Stange & Wehkamp 2016). Auch Panethzellen exprimieren den NOD2-Rezeptor. Eine Mutation von NOD2 führt zu einer Reduktion der α -Defensin Expression im Ileum, bei gleichbleibender Anzahl von Panethzellen. Diese Mutation ist als eine der Ursachen für M. Crohn bekannt (Wehkamp et al. 2004). Durch Zytokine wird eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst, die umliegendes Gewebe schädigt (Stange & Wehkamp 2016).

1.8.1 Das angeborene Immunsystem

Drei verschiedene Anteile bilden das angeborene Immunsystem. Zum einen verfügt der menschliche Körper über Barrieren, die als äußere Schutzschicht fungieren. Dazu zählt man die unterschiedlichen Epithelien, wie beispielsweise die Hautdecke oder die Schleimhäute (Magen-Darm-Trakt, Atemwege, Urogenitaltrakt). Schleimhäute produzieren außerdem Muzine, die eine zusätzliche Schutzschicht bilden. Sie wird von kommensalen Bakterien besiedelt. Dabei handelt es sich um Bakterien, die gegenüber dem Menschen kein pathogenes Potenzial besitzen und die auf den Schleimhäuten um Nahrung und Platz mit pathogenen Mikroorganismen konkurrieren. Im Magen-Darm-Trakt sind kommensale Bakterien vor allem *E. coli* oder verschiedene *Lactobazillen*. Die zweite Komponente des angeborenen Immunsystems sind lösliche Produkte. Zu diesen zählen das Komplementsystem, die Akut-Phase-Proteine und

antimikrobielle Proteine wie Defensine. Die dritte Komponente umfasst die angeborene zelluläre Abwehr. Dazu zählen in der Mehrzahl neutrophile Granulozyten (55-75%), die Pathogene erkennen, in sich aufnehmen (Phagozytose) und abtöten. Weitere Zellen, die schwerpunktmäßig Phagozytose durchführen, sind Gewebsmakrophagen, die sich aus Monozyten herleiten (Rink 2015).

1.8.2 Das adaptive Immunsystem

Viele Pathogene und Tumorzellen weisen Mechanismen auf, die es ihnen ermöglichen die angeborene Abwehr zu umgehen. Dafür haben sie verschiedene Strategien entwickelt, beispielsweise wird die Expression der Rezeptoren der Zelloberfläche herunterreguliert oder durch die Bildung von muzinösen Kapselstrukturen maskiert. In diesen Fällen kommt das adaptive Immunsystem zum Einsatz. Es besteht aus B- und T-Lymphozyten, welche Pathogene erkennen und Immunglobuline (Antikörper) freisetzen. Die Speicherung und Reifung der Lymphozyten geschehen in lymphatischem Gewebe, wie der Milz, Tonsillen oder den Lymphknoten. In Schleimhäuten findet man zusätzlich MALT (*mucosa associated lymphatic tissue*), im Darm wird dieses Gewebe als Peyer-Plaques bezeichnet (Rink 2015).

1.8.3 α -Defensin

Die etablierten Abwehrzellen des Darms sind die Panethzellen, welche sich in der Basis der Krypten, vor allem im Dünndarm, befinden und antimikrobielle Peptide wie Defensine produzieren (Chu et al. 2012). Defensine stellen eine wichtige Gruppe der antimikrobiellen Peptide dar. Abhängig von der Lage der drei Schwefelbrücken (Disulfidbrücken) innerhalb der Peptide sind sie in α - und β -Defensine eingeteilt. α -Defensine sind kleine, argininreiche, kationische Peptide mit einem niedrigen molekularen Gewicht von 3-5kDa. Zu ihnen gehören die Humanen Neutrophilen Peptide 1-4 (*human neutrophil peptide 1-4*) und die epithelialen Humanen Peptide 5 und 6 (HD-5 und HD-6) (Wehkamp et al. 2004). Panethzellen produzieren vor allem HD-5, welches einem klassischen antimikrobiellen Peptid entspricht (Chu et al. 2012). α -Defensine besitzen ein breites Spektrum an antimikrobiellem Potenzial. Durch die Bildung einer Pore penetrieren sie die Membran des Erregers und sie entfalten ihre Wirksamkeit

gegenüber Bakterien, Pilze und einige Viren (Wehkamp et al. 2004). HD-6 hingegen bildet an der Basis der Krypten eine Art Netz, dass die Mobilität der Bakterien einschränkt (Chu et al. 2012). Bei Kontakt mit Bakterien oder bakteriellen Antigenen (Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, Lipid A und Muramyl) werden die α -Defensine von den Panethzellen sezerniert. Die Sekretion erfolgt dosisabhängig innerhalb weniger Minuten (Ayabe et al. 2000). Im Rahmen von Infektionen oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen können Defensine auch in metaplastischen Panethzellen im Dickdarm produziert und sezerniert werden. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird eine erhöhte Expression von HD-5 und HD-6 beobachtet (Wehkamp et al. 2004).

1.9 Zielsetzung

Die Darmschleimhaut ist ein funktionell und strukturell hoch komplexes Gewebe, mit einer ausgeprägten ständigen Erneuerung des Deckepithels. Sie bildet im Zusammenspiel mit den kommensalen Bakterien des Mikrobioms eine Barriere gegen pathogene Keime. Zur Konfiguration der Schleimhautbarriere tragen u.a. Caspase8, sowie Signalwege wie Notch und Wnt bei.

Es konnte gezeigt werden, dass Störungen dieser Signalwege Integrität und Abwehrfunktion des Darmepithels beeinträchtigen und somit das Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) fördern. Deren Inzidenz liegt in Deutschland bei ca. 6/100.000/Jahr und die Erkrankungen betreffen häufig vergleichsweise junge Patienten im mittleren Lebensalter.

Speziell zeigte sich im Mausmodell des intestinalen Caspase8 *knockout* das spontane Auftreten einer Enterocolitis mit morphologischen Merkmalen der CED. Dies ging einher mit Aktivierung des Notch Signalweges und folgender Verminderung der sekretorischen Aktivität des Epithels mit reduzierter Sekretion bakterizider Substanzen bei Verlust der Panethzellen. Durch pharmakologische Inhibition des Notch Signalweges bei intestinaler Caspase8 Defizienz gelang eine Transdifferenzierung sekretorischer Zellen unter Einschluss von Becher- und Panethzellen. Unklar blieb, ob diese Transdifferenzierung auch mit einer Rekonstitution antimikrobieller Funktion verbunden ist und somit diesbezüglich eine *restitutio ad integrum* erreicht wird.

In der vorliegenden Studie sollte zunächst die Möglichkeit sekretorischer Differenzierung am Modell kultivierter Enterozyten *in vitro* untersucht werden. Es sollte beantwortet werden, ob sich nach der sekretorischen Transdifferenzierung eine erhöhte Bakterizidie ergibt, welchen Einfluss der Caspase8 Verlust auf die Möglichkeit der Transdifferenzierung und die Induktion der Bakterizidie hat sowie ob DBZ als Gegenspieler zu Caspase8 in Bezug auf die Bakterizidie fungiert. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen sollten durch die Charakterisierung muriner Gewebe validiert werden. Insbesondere sollten im Mausmodell auch mögliche Unterschiede in der räumlichen Verteilung und Funktion der durch DBZ induzierten sekretorischen Zellen entlang der Krypten-Zotten-Achse untersucht werden.

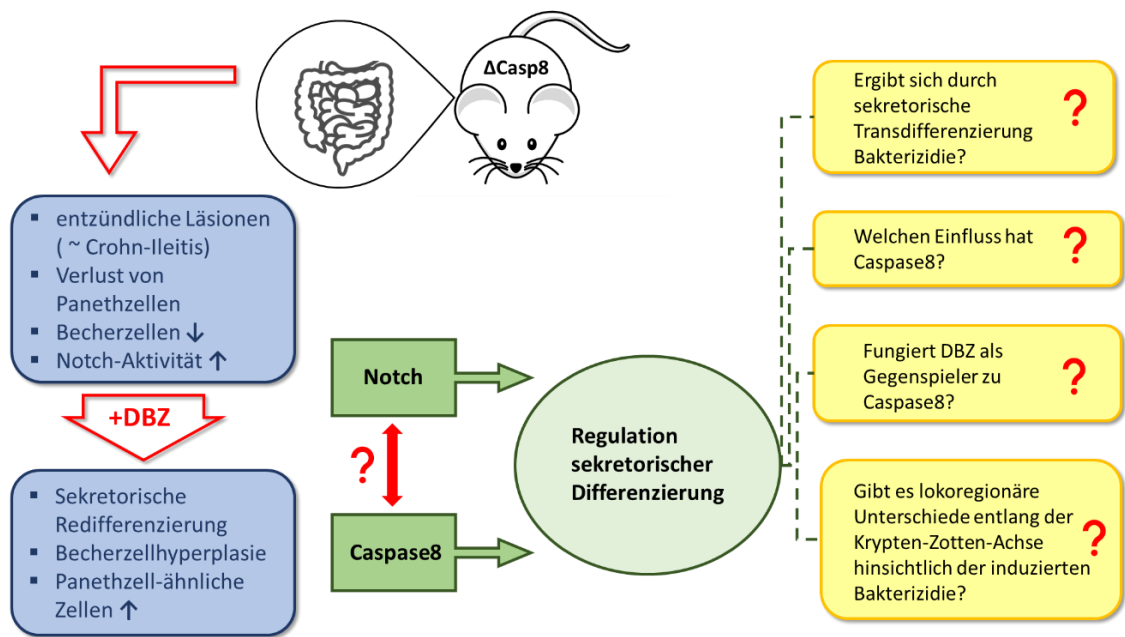


Abb. 6 Graphische Darstellung der Zielsetzung

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Absaugpumpe	Vacosafe (IBS Integra Bioscience, CH)
Ausgießstation	HistoCenter 2 (Thermo Scientific, Karlsruhe)
Autoklav	Fedegari AutoklaviSPA (BioRad, München)
Brutschrank	(Biotron Labortechnik, Hilden)
Dampfsterilisator	Varioclav (Thermo Scientific, Karlsruhe)
Eismaschine	(Ziegra, Hannover)
Feinwaage	(Sartorius, Göttingen)
Heizplatte	(IKA Labortechnik, Staufen)
Mikroskope	Dialux 20 EB (Leitz, Wetzlar) Axiovert 25 (Zeiss, Jena)
Netzteile	Power Pac Basic (BioRad, München) Power Pac Universal (BioRad, München)
pH Meter	766 Calimatic (Knick, Berlin)
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research (Eppendorf, Hamburg)
Pipettierhilfe	Pipettus Akku (Hirschmann, Eberstadt)
Reinraumwerkbank	Hera Safe (Heraeus, Düsseldorf)
Rotationsmikrotom	RM2145 (Leica, Wetzlar)

Schüttler	Stuart SSL4 (Barloworld, Südafrika)
	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
	Vortex (Heidolph, Schwabach)
Stickstofftank	Arpege 170 (Air Liquide, Düsseldorf)
Thermocycler	Veriti Thermal Cyclers, 96 Well (Applied Biosystems, Darmstadt)
Wärmeschrank	(Heraeus, Düsseldorf)
Wasserbäder	TW8 (98°C) (Julabo Labortechnik, Seelbach)
	(GFL, Großburgwedel)
Zellzählgerät	Casy 1 (Schärfe System, Reutlingen)
Zentrifugen	5417R (Eppendorf, Hamburg)
	Sorvall RC 5B Plus (Sorvall, England)
	Biofuge pico (Heraeus, Düsseldorf)
	Megafuge 1.0 (Heraeus, Düsseldorf)

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem GmbH (Darmstadt)
 BioRad (München)
 Carl Roth (Karlsruhe)
 Fluka Chemie GmbH (Schweiz)
 ICN Biomedicals (USA)
 Innovatis (Reutlingen)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Medac (Wedel)
 Merck (Darmstadt)

Roche (Mannheim)

Serva (Heidelberg)

Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.1.3 Verbrauchsmittel

Blot-Papier	(BioRad, München)
Deckgläser	(Langenbrinck, Emmendingen)
Einbettkassetten	(Thermo Scientific, Karlsruhe)
Fettstift DakoPen	(DAKO, Hamburg)
Kulturgefäße Gewebekulturflaschen T75	(Greiner bioone, Frickenhausen)
Gewebekulturschalen 10cm ²	(Becton Dickinson, Karlsruhe)
Chamber Slides LabTek	(Nalge Nunc TM, USA)
Kanülen BD Microlance 27G 19mm	(Becton Dickinson, Karlsruhe)
Multiwellplatten Flachboden, 6-, 96-Well	(Becton-Dickinson, Heidelberg)
Rundboden, 96-Well	(Peglab, Erlangen)
Objektträger Histoslides adhäsiv	(Thermo Scientific, Karlsruhe)
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	(Corning, Bodenheim)
Pasteurpipetten	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	(NerbePlus, Winsen/Luhe)
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	(Eppendorf, Hamburg)

Falconröhrchen, 50ml	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Sterilfilter Glocken-Sterilfilter 0,2µm	(Sartorius, Göttingen)
Verschlussfilm Microseal 'B'Film	(BioRad, München)
Zellschaber	(Roth, Karlsruhe)

Weitere Verbrauchsmaterialien wurden über die Abteilung Fertigvorrat des Universitätsklinikums Aachen bezogen.

2.1.4 Reagenzien

2.1.4.1 Medien, Puffer, Lösungen

2.1.4.1.1 Medien für die Zellkultur

Medien	DMEM 4,5 g/l Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim) EMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim) RPMI 1640
Medienzusätze	L-Glutamin 1,6 mM (PAA, Cölbe) Penicillin 40000 U/ml, Streptomycin (PAA,Cölbe) Na-Pyruvat (Gibco, USA) Non-essential Amino Acids (Gibco, USA) DMSO (Gibco, USA)

Serum	Fetal Bovine Serum, Certified (Invitrogen, Karlsruhe)
-------	--

2.1.4.1.2 Medien für die Bakterienkultur

Medien	LB-Medium (Roth, Karlsruhe) LB-Agar (Roth, Karlsruhe)
--------	--

2.1.4.1.3 Medien für die Weiser-Methode

PBS 10x	Reagenzien	Menge
	KCl	30mM
	KH ₂ PO ₄	15mM
	NaCl	1,37mM
	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	65mM

PBS Waschpuffer	Reagenzien	Menge
	PBS 10x	100ml
	MgCl ₂ (0,5mM)	0,15g
	CaCl ₂ (0,5mM)	0,073g
	Aqua bidest.	Auf 1l auffüllen
	Dithiothreitol (DTT)	1mM frisch hinzugeben
		pH Einstellung auf 7,1-7,4

Puffer A	Reagenzien	Menge
	KCl (1,5mM)	1,11g
	NaCl (96mM)	5,57g

Natriumcitrat (27mM)	7,94g
KH ₂ PO ₄ (8mM)	1,09g
Na ₂ HPO ₄ (5,6mM)	0,87g
Aqua bidest.	Auf 1l auffüllen
Dithiothreitol (DTT)	1mM frisch hinzugeben

Puffer B	Reagenzien	Menge
	PBS 10x (ohne Kalzium oder Magnesium)	100ml
	Aqua bidest.	Auf 1l auffüllen
	Dithiothreitol (DTT)	0,5mM frisch hinzugeben
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	1,5mM frisch hinzugeben
	Bovine Serum Albumin (BSA)	1mM frisch hinzugeben
		pH Einstellung auf 7,1-7,4

2.1.5 Zelllinien

CaCo2 (ATCC HTB-37)	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie mit enterozytärer Differenzierung
CaCo2 Casp8 knockdown	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie mit enterozytärer Differenzierung nach Caspase8 knockdown durch siRNA

CaCo2 neg. siRNA	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie nach einbringen einer negativen siRNA
Colo320DM (ATCC CCL-220)	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie
Colo320DM Casp8 knockdown	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie mit enterozytärer Differenzierung nach Caspase8 knockdown durch siRNA
Colo320 neg. siRNA	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie nach einbringen einer negativen siRNA

Abb. 7 Übersicht über die verwendeten Zelllinien

2.1.6 Versuchstiere

Für das Mausmodell wurden männliche Tiere der Linie C57/B16 verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechnik

2.2.1.1 Kultivierung und Passage von humanen Zelllinien

Für die Versuche des Zellkulturmodells wurden CaCo2 und Colo320 verwendet. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter konstanter Begasung mit 5% CO₂ in einem befeuchteten Brutschrank bei 37°C. Alle Schritte erfolgten an einer sterilen Arbeitsbank und mit sterilen Lösungen. Die normale Kultivierung erfolgte in standardmäßigen T75 Kulturflaschen in 10ml Komplettmedium. Eine Passage wurde bei ausreichender Dichte von etwa 90% durchgeführt. Für die Kultivierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Um eine ausreichende Ablösung der Zellen zu erreichen, erfolgte eine Inkubation für 3min mit 3ml Trypsin-EDTA bei 37°C. Das enthaltende EDTA löste die Zelladhäsionen untereinander und zur Wand der Kulturflasche. Das im Serum

enthaltene Kalzium wurde gebunden und die kalziumabhängigen Adhäsionsmoleküle durch Trypsin gelöst. Bei stark haftenden Zellen wurden diese aktiv mittels schütteln der Kulturflasche von der Flaschenwand abgespült. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von mit FKS versetztem Kulturmedium abgestoppt. Es erfolgte eine Zentrifugation der derart suspendierten Zellen für 5min bei 1200rpm. Das Sediment wurde in frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf in 1:2 bis 1:10-Verdünnung auf neue Flaschen mit neuem Medium aufgeteilt.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung können die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dafür wurden dem normalen Kulturmedium 5% DMSO und 10% FKS hinzugefügt. Da das DMSO bei Raumtemperatur eine toxische Wirkung auf die Zellen hat, muss dieses rasch verdünnt werden. Die Zellen wurden hierfür im Wasserbad erwärmt und mit vorgewärmtem Kulturmedium verdünnt.

2.2.1.3 Behandlung von Zellen mit dem γ -Sekretase Inhibitor Dibenazepine (DBZ)

Die folgenden Versuche wurden mit den Zelllinien CaCo2 und Colo320 durchgeführt. Hierfür wurden zum Vergleich Wildtyp Zellen (Lawthorn et al.), Zellen nach Transfektion mit Caspase8 *knockdown* (Δ Casp8) und Zellen nach Transfektion mit einer negativen siRNA (Δ neg. siRNA) zur Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden in 6-Lochkulturplatten angezüchtet. Die Proben wurden mit 10 μ m DBZ jeweils 24h und 48h im sterilen Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24h bzw. 48h wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mehrmals mit kaltem, sterilen PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 2ml PBS resuspendiert und im Ultraschallbad 60sec sonifiziert um die Zellen zu lysieren. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 5000rcp für 10min. Erneut wurde der Überstand abgenommen. Der Überstand und das entstandene Zellpellet wurden getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.2.1 Haltung von Versuchstieren

Die Haltung der verwendeten Mauslinie erfolgte im Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Aachen entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (BGBl. I S. 2178), der FELASA (Vereinigung der europäischen Gesellschaft für Versuchstierkunde) und der GV-Solas (Deutsche Gesellschaft für Versuchstierkunde) unter standardisierten Zuchtbedingungen (LANUV, AZ 84-02. 04. 2013. A034). Die Tiere wurden in temperaturkontrollierten Käfigen gehalten mit einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung.

2.2.2.2 Behandlung mit Dibenzazepin (DBZ)

Die Behandlung mit dem γ -Sekretase Inhibitor DBZ erfolgte, um den Notch Signalweg zu blockieren. DBZ wurde von Prof. Dr. M. Niggemann (Institut für organische Chemie, RWTH Aachen) synthetisiert. Das in DMSO gelöste DBZ wurde in PBS, welches 0,5% Methocel E4M und 0,01% Tween 80 enthält, suspendiert. Die Behandlung der Tiere erfolgte gewichtsadaptiert mit 20 μ g/g fünfmalig innerhalb von zehn Tagen per intraperitonealer Injektion.

2.2.2.3 Euthanasierung und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation euthanasiert und nachfolgend in Rückenlage nach etabliertem Protokoll fixiert. Die Entnahme intestinaler Organe erfolgte standardmäßig nach Eröffnung des Bauchraums.

2.2.2.4 Kryptenisolation an murinem Dünndarm (Weiser Methode)

Zunächst wurde die Methode der Isolation der einzelnen Schichten der Dünndarmschleimhaut (eingeteilt in Zotten, apikale Krypten und basale Krypten) etabliert. Die Pufferlösungen für die Weiser Methode (PBS 10x, Puffer A, Puffer B, PBS Waschpuffer) wurden am Vortrag vorbereitet und frisch mit Dithiothreitol (DTT) versetzt. DTT ist eine chemische Verbindung, die auch Clelands-Reagenz genannt wird. Es wird zur Isolation von Proteinen und Enzymen benutzt. Der Dünndarm der Versuchstiere wurde wie oben beschrieben entnommen, der

Darminhalt entleert und der Darm mit PBS-Waschpuffer gespült. Zur Erleichterung der Durchführbarkeit wurde der Dünndarm in drei Teile geteilt. Die Darmproben wurden von rechts auf links umgestülpt und mit reinem PBS befüllt. Die befüllten Proben wurden an beiden Enden verschlossen und für 10 Minuten bei 38°C auf dem Schüttler in Puffer A inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 20ml Puffer B überführt, weiterhin bei 38°C auf dem Schüttler inkubiert. Entsprechend der drei Fraktionen (siehe Abb. 8) wurden die Überstände abgenommen. Nach der jeweiligen Abnahme des Überstands wurden erneut 20ml des Puffers B hinzugegeben. Das im Puffer B enthaltene EDTA und DTT löst die interzellulären Bindungen und löst somit Zellen, Proteine und Enzyme aus dem Zellverband der Darmschleimhaut. Zur Kontrolle der Fraktionen, wurde nach jeder Fraktion eine Gewebeprobe der Darmanteile entnommen, in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert, eingebettet, geschnitten und mittels HE-Färbung angefärbt. Der abgenommene Überstand wurde in Falcons überführt und 5 Minuten bei 4°C mit 1500rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimalig mit kaltem, reinem PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der erzeugte Überstand und das Pellet wurden separat voneinander bei -80°C in flüssigem Stickstoff konserviert.

Fraktion	Inkubationszeit (min)	Isoliertes Epithelkompartiment
1	11	Zotten
2	11	Apikale Krypten
3	20	Basale Krypten

Abb. 8 tabellarische Darstellung der Fraktionen der Weiser Methode

2.2.2.5 Herstellung von Paraffingewebsschnitten

Das Frischgewebe wurde nach der Entnahme zugeschnitten, in Einbettkassetten eingelegt und in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben über Nacht im Gewebeeinbettautomat durch eine aufsteigende Alkoholreihe im einstündigen Wechsel entwässert und über Xylol in flüssiges Paraffin verbracht. Bei der Einbettung des Gewebes im Metallförmchen erfolgte eine Ausrichtung der Proben im warmen Paraffin (bei 60°C). Die so erzeugten Einbettungen wurden dann als Paraffinblock ausgehärtet. Das Erstellen der

Gewebeschnitte von den Paraffinblöcken erfolgte entsprechend der routinemäßigen Abläufe am Rotationsmikrotom.

2.2.2.6 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)

Die Färbung mit Hämalan und Eosin gehört zu den Standardfärbungen in der Histologie und wird routinemäßig als Übersichtsfärbung durchgeführt. Hämalan färbt saure bzw. basophile Strukturen blau, somit insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA. Eosin färbt acidophile bzw. basische Strukturen rot, welche vor allem im Zellplasma in Form von Proteinen enthalten sind. Für die Färbung wurden die Gewebsschnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Beginnend wurden die Kerne mit Hämalan für 5 Minuten gefärbt und in Leitungswasser 10 Minuten gebläut. Anschließend erfolgte die Färbung mit Eosin für 3 Minuten. Ausgewaschen wurden die Proben mit destilliertem Wasser und die weitere Differenzierung erfolgte in 80%-igem Ethanol. Danach wurden die Proben erneut in Ethanol und Xylol entwässert.

2.2.3 Bakterizitätsassay

Für den Bakterizitätsassay wurden Proben aus den Tierexperimenten und den Experimenten der Zellkultur verwendet. Das Bakterienwachstum wurde durch *colony forming units* (CFUs) und Messung der optischen Dichte quantitativ ermittelt. Im Zellkulturmodell wurden jeweils drei Proben derselben Spezifität (n=3) im Dreifachansatz gemessen. Zur Messung der Proben der Mausversuche wurden jeweils zwei Proben derselben Spezifität (n=2) im Dreifachansatz gemessen.

2.2.3.1 Herstellung der LB-Agar-Platten

Zur Herstellung der LB-Agar-Platten für das bakterielle Wachstum und die Messung der CFUs wurde LB-Agar mit PBS vermischt und in Flaschen autoklaviert. Direkt nach der Autoklavierung wurden 20ml des flüssigen Agars in 10 cm Kulturplatten gegossen. Dies geschah immer an einer offenen Flamme, um das Risiko einer vorzeitigen bakteriellen Besiedlung zu minimieren. Nach dem Aushärten wurden die sterilen Platten umgedreht und auf dem Kopf gelagert, um das entstehende Kondenswasser zu sammeln.

2.2.3.2 Methoden der Quantifizierung von bakteriellem Wachstum

2.2.3.2.1 Messung der optischen Dichte (OD)

Die OD wurde mittels eines Photometers bei 595nm bestimmt. Es wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien in LB-Puffer bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Für die Versuche wurde eine Konzentration von 5×10^6 verwendet, was einer OD von 0,025 entspricht. Die zu messenden Proben wurden in PBS resuspendiert. 100µl der zu messenden Probe wurde mit 100µl der Bakterienlösung vermischt. Es erfolgte die Messung der OD zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 3h, 4h und 5h. Zwischen den Messungen wurden die Proben weiterhin bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert.

2.2.3.2.2 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums durch Bestimmung der colony forming units (CFUs)

Für diesen Versuch wurde derselbe Ansatz wie für die Messung der OD benutzt. Zu den Zeitpunkten 0h und 5h wurden die LB Agar Platten mit 100µl beimpft und die Probe wurde mit einem weichen Plastikspatel verteilt und leicht einmassiert. Über Nacht wurden die Proben bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Jede Probe wurde in einer von Konzentration 10^7 /ml aufgetragen. Nach 24h Inkubationszeit wurden die Kolonien der Platten ausgezählt.

2.2.3.3 Durchführung des Bakterizitätsassays an Zellkulturproben

Der Bakterizitätsassay wurde mit den Zelllinien CaCo2 und Colo320 durchgeführt. Hierzu wurden Wildtyp Zellen, Zellen mit Δ neg.siRNA und Zellen mit Δ Casp8 verwendet. Diese wurden für 24h oder 48h mit DBZ behandelt. Als Negativkontrolle wurde das jeweilige Kulturmedium der Zelllinie, im Falle von CaCo2 DMEN und bei Colo320 RPMI, verwendet. Das Bakterienwachstum wurde quantitativ durch CFUs und Messung der optischen Dichte beurteilt.

2.2.3.4 Durchführung des Bakterizitätsassays an murinen Proben

Mittels Weiser-Methode wurden histologisch kontrolliert drei Fraktionen des Darmepithels unterschieden: Zotten, apikale und basale Krypten. Es wurden jeweils Zellen und Überstand gewonnen. Als Negativkontrolle wurde PBS

verwendet. Zu den Proben wurde wiederum *E. coli* hinzugegeben und bei 37°C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde quantitativ mit *CFUs* zum Zeitpunkt 0h und 5h sowie durch Bestimmung der optischen Dichte zum Zeitpunkt 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h beurteilt. Die beimpften LB-Agarplatten für die Messung der *CFUs* wurden bei 37°C inkubiert und nach 24h ausgezählt.

2.3.4 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens dreimalig durchgeführt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPadPrism®. Es wurden Mittelwerte und die Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Mittelwertunterschiede wurden je nach Versuch *One-way ANOVA (Analysis of Variances)* und *Two-way ANOVA* benutzt. Zusätzlich wurden t-Tests durchgeführt. Die einzelnen Gruppen wurden mit einem Multiple Comparison Tukey Test verglichen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $<0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Bakterizitätsassay mit Proben der Zellkulturexperimente

Um die Funktion hinsichtlich der Bakterizidie nach DBZ induzierter sekretorischer Transdifferenzierung zu untersuchen, wurden zunächst zwei Zellkulturmodelle etabliert, CaCo2 und Colo320. Beide Zelllinien stammen aus humanen kolorektalen Adenokarzinomen. Colo320 Zellen verfügen v.a. über Eigenschaften von Kolonepithel, wohingegen CaCo2 zusätzlich nach längerer Kultivierung Eigenschaften und Verhaltensweisen von Dünndarmepithel übernehmen kann und über einen Bürstensaum verfügt. CaCo2 ist eine der meist verwendeten Zelllinien für die Etablierung intestinaler Zellkulturmodelle. Für die Versuche wurden Wildtypzellen und Zellen mit Caspase8 *knockdown* (Δ Casp8) verwendet. Der *knockdown* wurde durch Transfektion mit einer *siRNA* (*small/short interfering RNA*) hergestellt. Zur Kompletierung und Kontrolle wurden auch Zellen nach Transfektion mit einer negativen *siRNA* (Δ neg.*siRNA*) in die Versuche mit einbezogen.

3.1.1 Inkubationszeit-abhängige Induktion von Bakterizidie in CaCo2 Δ Casp8 und wt durch DBZ Behandlung

Die Auswirkung der DBZ-Behandlung und des Δ Casp8 auf die Produktion von antibakteriellen Proteinen im etablierten CaCo2 Zellkulturmodell wurde beurteilt durch die Bestimmung des Wachstums von *E. coli*. Die zu messenden Proben wurden mit *E. coli* inkubiert und das Wachstum mittels Messung der optischen Dichte und *CFUs* quantifiziert. Die OD Messung erfolgte zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 3h, 4h und 5h. Verglichen wurden neben den Wachstumskurven die absoluten Endwerte zum Zeitpunkt 5h. Zur Durchführung der *CFUs* wurde zu den Zeitpunkten 0h und 5h je 100 μ l der Proben auf LB Agar Platten verteilt und 24h bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden ausgezählt und das absolute Wachstum bestimmt.

Die Behandlung für 24h mit DBZ zeigte in allen Proben des CaCo2 Zellkulturmodells keine Reduktion des bakteriellen Wachstums im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 9 und Abb. 10).

Durch die DBZ Behandlung für 48h zeigte die OD Messung eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums im $\text{CaCo2}^{\Delta\text{Casp8}}$ ($p=0,00157$) und wt ($p=0,0079$) (vgl. Abb. 11 und Abb. 12). Das reduzierte bakterielle Wachstum durch 48h DBZ Behandlung konnte auch in den *CFUs* in der 10^7 Verdünnung im CaCo2 wt gezeigt werden (unpaired t-Test 0,0083/**; vgl. Abb. 13). $\text{CaCo2}^{\Delta\text{Casp8}}$ zeigt in den *CFUs* die Tendenz einer Reduktion, die Werte waren statistisch jedoch nicht signifikant. $\text{CaCo2}^{\Delta\text{neg.siRNA}}$ zeigte keine Änderung des Bakterienwachstums nach DBZ Behandlung.

Betrachtet man das bakterielle Wachstum unabhängig der DBZ Behandlung zeigte sich in der OD Messung ein signifikant höheres bakterielles Wachstum in $\Delta\text{neg.siRNA}$ Proben des 24h Versuches im Vergleich zu wt ($p=0,0060$) und ΔCasp8 Zellen ($p=0,0110$) (vgl. Abb. 14). Auch in den *CFUs* zeigte sich die Tendenz für ein vermehrtes Wachstum von *E. coli* in $\text{CaCo2}^{\Delta\text{neg.siRNA}}$ im Vergleich zum wt und ΔCasp8 unabhängig von der DBZ Behandlung, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell

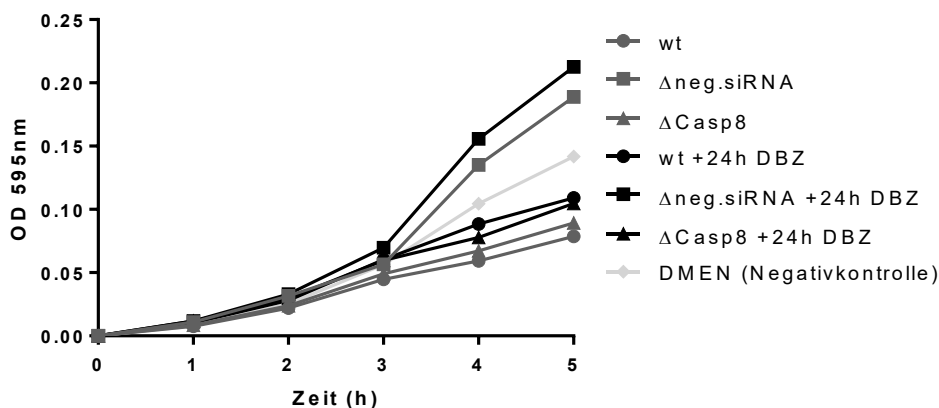


Abb. 9 Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell über 24h, OD-Messung. Dargestellt wird der Vergleich der verschiedenen Proben mit und ohne DBZ Behandlung für 24h. Die DBZ Behandlung induziert keine Änderung des bakteriellen Wachstums

Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell

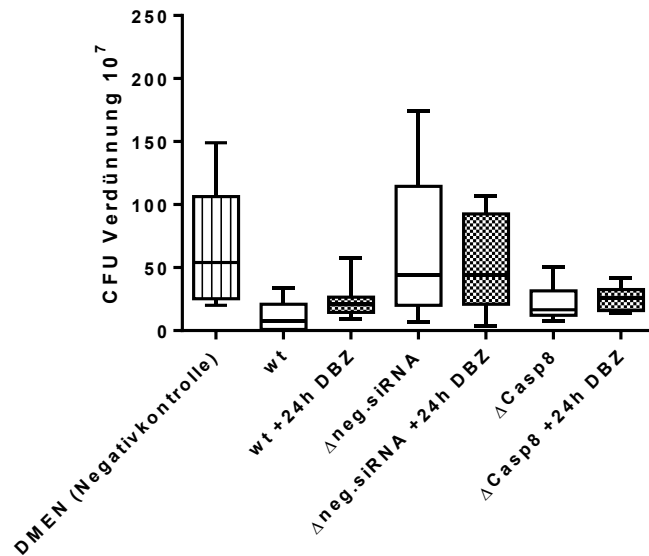


Abb. 10 Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell über 24h, CFU. Durch die Bestimmung der CFUs wurde das bakterielle Wachstum bestimmt. Verglichen wurden verschiedene Proben (wt, Δ neg. siRNA und Δ Casp8) mit und ohne 24h DBZ Behandlung. Die DBZ Behandlung für 24h zeigte keine Reduktion des bakteriellen Wachstums

Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell

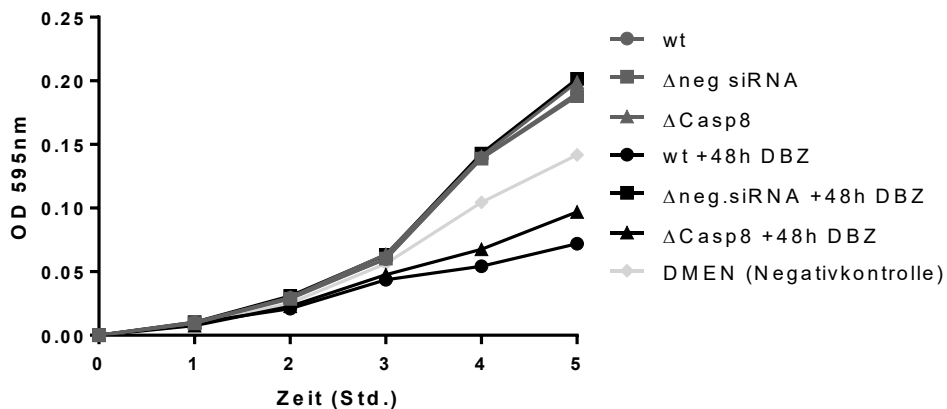
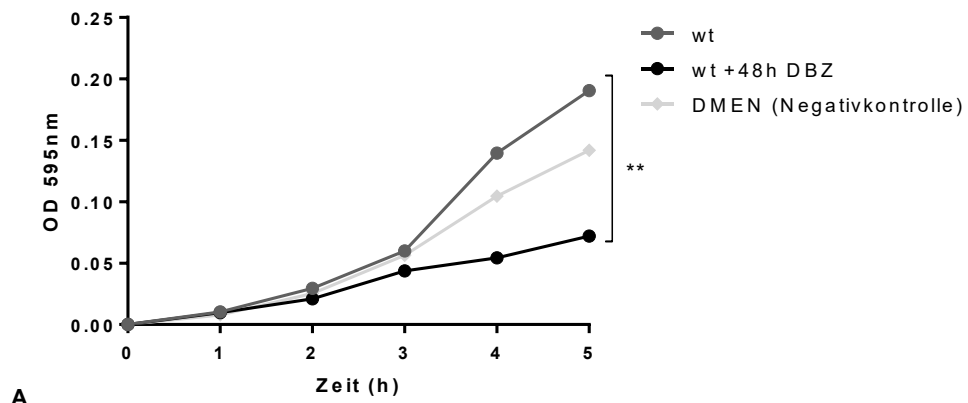
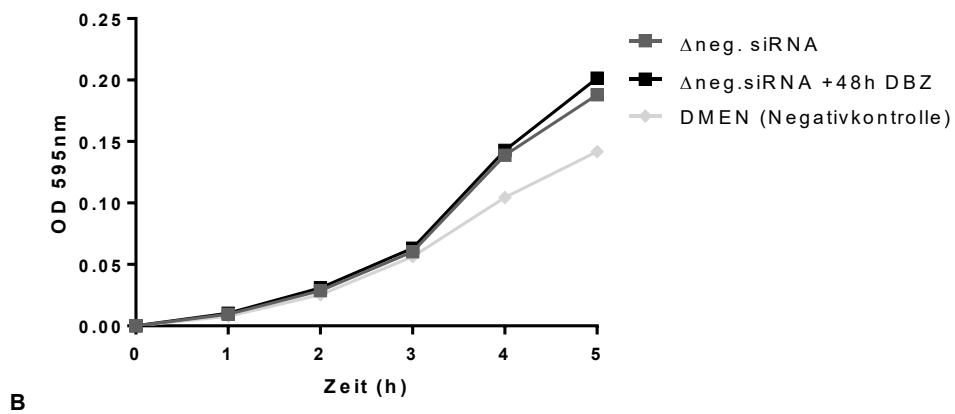


Abb. 11 Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell über 48h, OD-Messung. Vergleichend dargestellt werden die drei unterschiedlichen Proben (wt, neg. siRNA und KD Casp8) mit und ohne 48h DBZ Behandlung. Zur besseren Ansicht in Abb. 12 nochmals getrennt dargestellt.

Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell



Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell



Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell

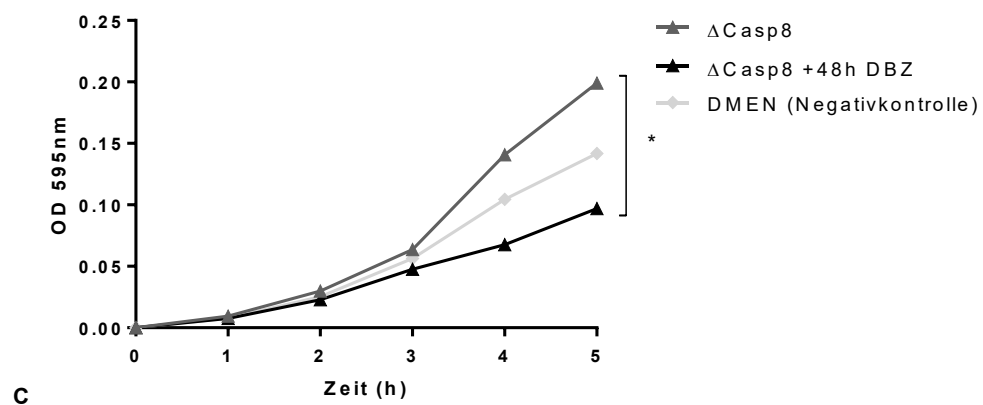


Abb. 12 Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell über 48h, OD-Messung, getrennte Darstellung. Vergleich des bakteriellen Wachstums mit und ohne DBZ Behandlung für 48h bei CaCo2 wt (unpaired t-Test, $p=0,0079/**$) (A), CaCo2^{Δneg. siRNA} (B) und CaCo2^{ΔCasp8} (unpaired t-Test, $p=0,0157/*$) (C). A und C zeigen durch die DBZ Behandlung eine signifikante Verminderung des bakteriellen Wachstums

Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell

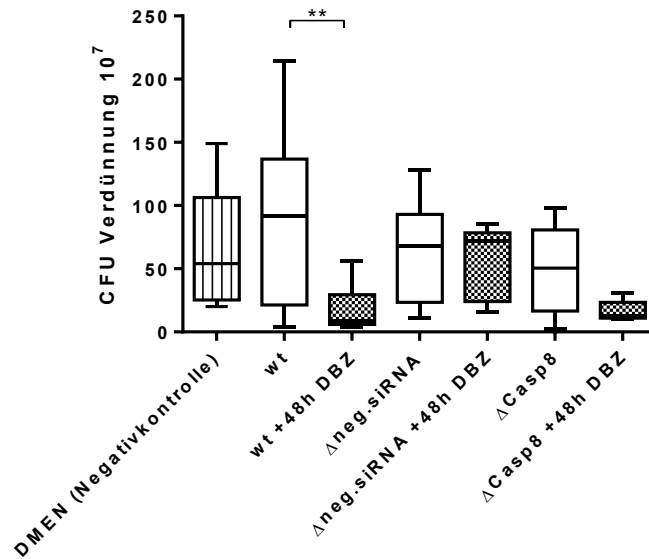


Abb. 13 Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell über 48h, CFU. Durch die Bestimmung der CFUs wurde das bakterielle Wachstum bestimmt. Verglichen wurden verschiedene Proben (wt, Δ neg. siRNA und Δ Casp8) mit und ohne 48h DBZ Behandlung. Die DBZ Behandlung bewirkte eine signifikante Verminderung des bakteriellen Wachstums des wt (unpaired t-Test, $p=0,0083/**$).

Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell

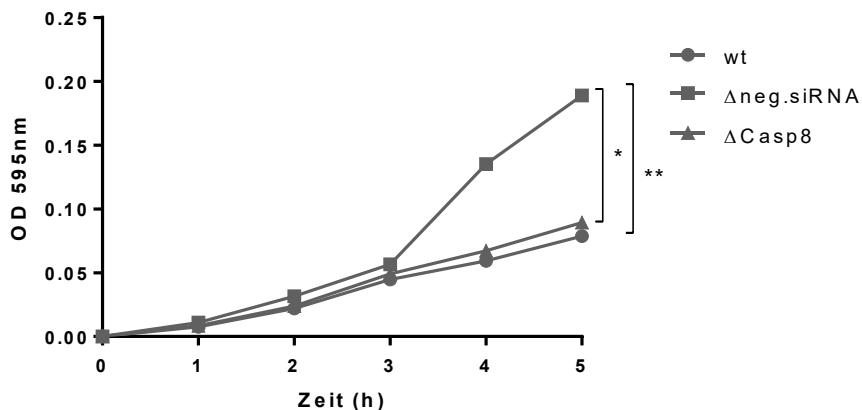


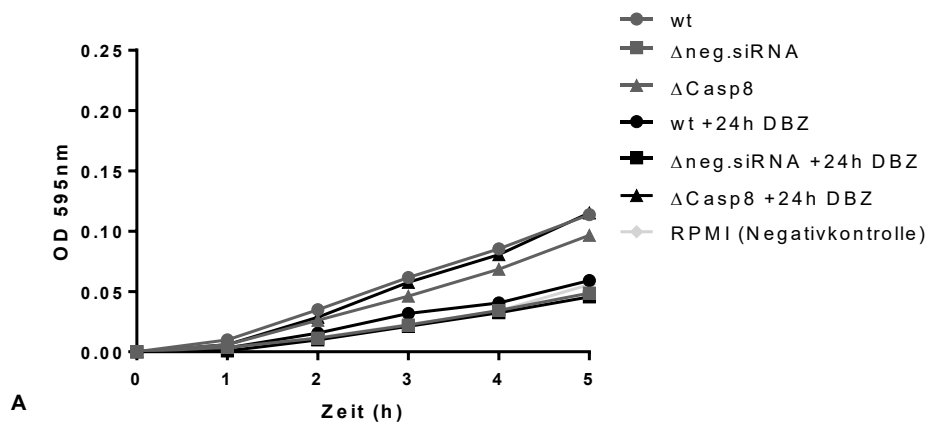
Abb. 14 Wachstum *E. coli* im CaCo2 Zellkulturmodell über 24h, OD-Messung, ohne DBZ-Behandlung. Zur Vereinfachung wurden die unterschiedlichen Kurven des 24h Bakterizitätsassays der drei zu vergleichenden Proben ohne DBZ Behandlung nochmals einzeln dargestellt. Die Proben mit der neg. siRNA haben ein signifikant erhöhtes bakterielles Wachstum im Vergleich zu den wt (unpaired t-Test, $p=0,0060/**$) und den Δ Casp8 Zellen (unpaired t-Test, $p=0,0110/*$).

3.1.2 Fehlende Induktion von Bakterizidie durch DBZ Behandlung im Colo320 Zellkulturmodell

Die Auswirkung der DBZ Behandlung auf Colo320 wt, Δ Casp8 und Δ neg.siRNA wurde hinsichtlich der möglichen Induktion einer Bakterizidie durch das Wachstum von *E. coli* in der OD Messung und CFUs analysiert

Die DBZ Behandlung, weder für 24h noch für 48h Behandlung, induzierte keine Änderung des bakteriellen Wachstums der Colo320 Proben im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Weiterhin zeigte sich kein Unterschied zwischen Colo320 wt, Colo320 Δ Casp8 und Colo320 Δ neg.siRNA unabhängig von der DBZ Behandlung.

Wachstum *E. coli* im Colo320 Zellkulturmodell



Wachstum *E. coli* im Colo320 Zellkulturmodell

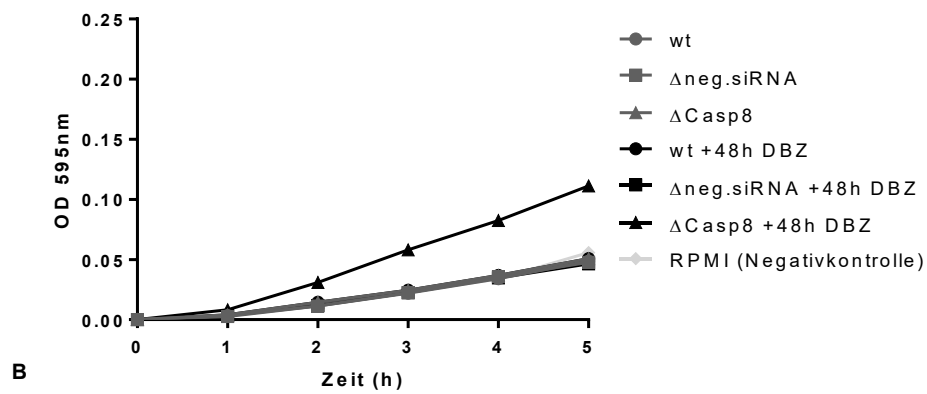
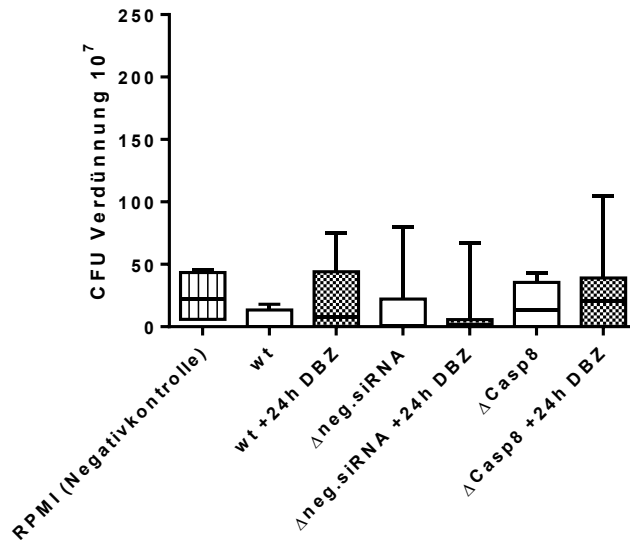


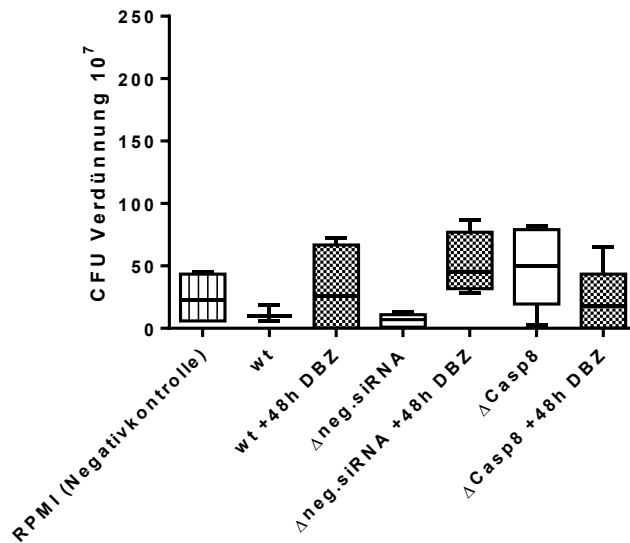
Abb. 15 Wachstum *E. coli* im Colo320 Zellkulturmodell, OD Messung. Verglichen wurde das bakterielle Wachstum der verschiedenen Proben mit oder ohne 24h (A) bzw. 48h (B) DBZ Behandlung

Wachstum *E. coli* im Colo320 Zellkulturmodell



A

Wachstum *E. coli* im Colo320 Zellkulturmodell



B

Abb. 16 Wachstum *E. coli* im Colo320 Zellkulturmodell, CFU. Graphische Darstellung des bakteriellen Wachstums der verschiedenen Proben mit 24h (A) und 48h (B) DBZ Behandlung.

3.2 Die erfolgreiche Etablierung der Weiser Methode

Um die lokoregionären Unterschiede der DBZ Behandlung entlang der Krypten-Zotten-Achse *in vivo* untersuchen zu können, wurde murines Darmepithel disseziert. Durch die Methode gelang eine stufenweise Differenzierung zwischen Zotten, apikalen Krypten und basalen Krypten. Die Abb. 17 A zeigt einen histologischen Schnitt nach der ersten Fraktion (Fraktion 1). Nach elfminütiger Inkubation war das Deckepithel der Zotten aus der Darmschleimhaut herausgelöst. Man erkennt in der HE-Färbung den Verlust des Zottenepithels mit lediglich Verbleib des residuellen Bindegewebes der Zottenkonturen, bei erhaltenem apikalen und basalen Kryptenepithel. Die Fraktion 2 ergab sich nach weiterer Durchführung des Versuches für erneut 11 Minuten (vgl. Abb. 17 B). Zu erkennen ist eine Herauslösung der oberflächlichen bzw. apikalen Kryptenepithelien aus der Darmschleimhaut. Diese Zellen wurden in der Fraktion 2 angereichert. Für die Generierung der dritten Fraktion wurde nochmals 20min inkubiert. In Abb. 17 C ist in eine vollständige Ablösung des Kryptenepithels mit Denudation der Basalmembran zu sehen.

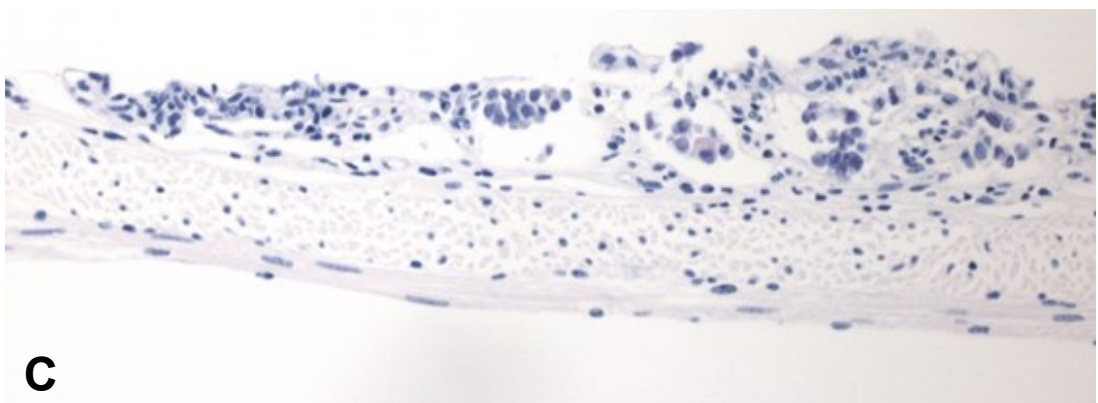
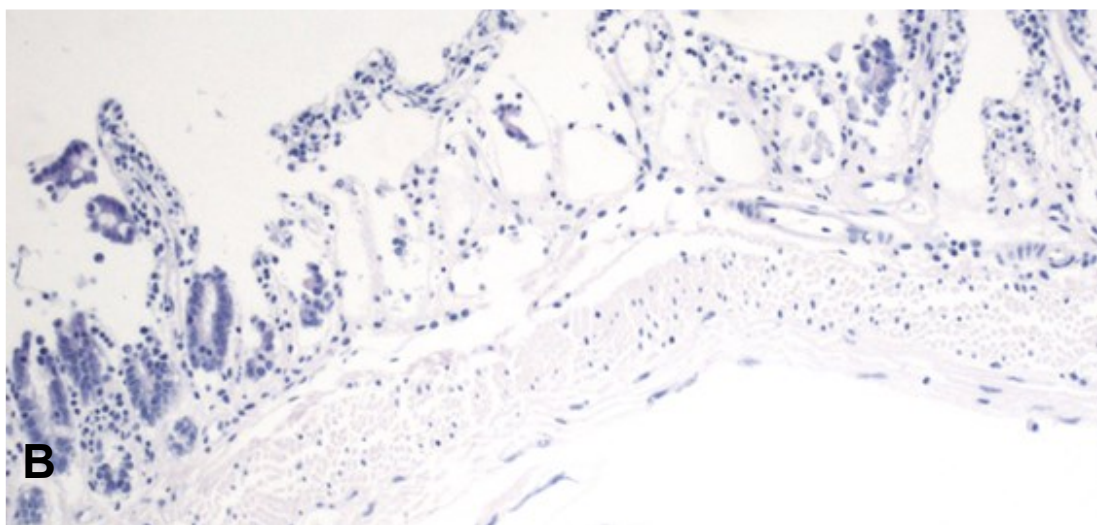
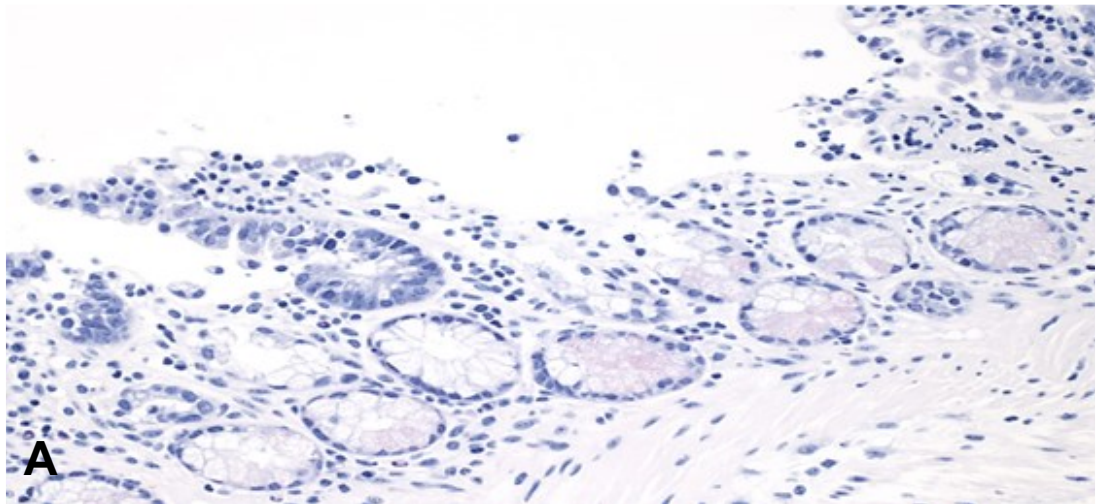


Abb. 17 HE-gefärbte Darmschnitte nach fraktionellem Verdau mittels Weiser-Methode. Fraktion 1 (A), Entnahme der Probe nach 11min Inkubation mit Puffer B, man erkennt einen oberflächlichen Verlust der Schleimhautzotten. Fraktion 2 (B), entnommen nach erneuter Inkubation von 11min in Puffer B (insgesamt 22min). Eine Lösung der apikalen Krypten ist erkennbar. Fraktion 3 (C), nach 20min Inkubation in Puffer B (Gesamtinkubation 42min). Erkennbar ist ein vollständiger Epithelverlust

3.3 Auswertung des Bakterizitätsassays mit den Proben des Mausmodells

3.3.1 Unterschiede der antimikrobiellen Funktion von Darmepithel nach DBZ Behandlung entlang der Krypten-Zotten-Achse

Das Wachstum von *E. coli* wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) und durch CFUs quantifiziert. Die Proben ohne DBZ Behandlung wurden mit den DBZ behandelten Proben verglichen. Die Abb. 18 zeigt den Vergleich der unterschiedlichen Ebenen der Krypten-Zottenachse. In Abb. 19 wurden die Ergebnisse der OD Messung der drei Fraktionen nochmals getrennt dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Abweichungen der Kurvenverläufe, insbesondere keine erkennbare Verminderung des Bakterienwachstums durch die DBZ Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

In den CFUs zeigte sich ein reduziertes bakterielles Wachstum durch DBZ Behandlung im Zottenkompartiment ($p=0,0049$) (vgl. Abb. 20). Auch im Bereich der basalen Krypten zeigte sich vermindertes bakterielles Wachstum nach DBZ Behandlung, die Werte zeigten sich jedoch nicht signifikant.

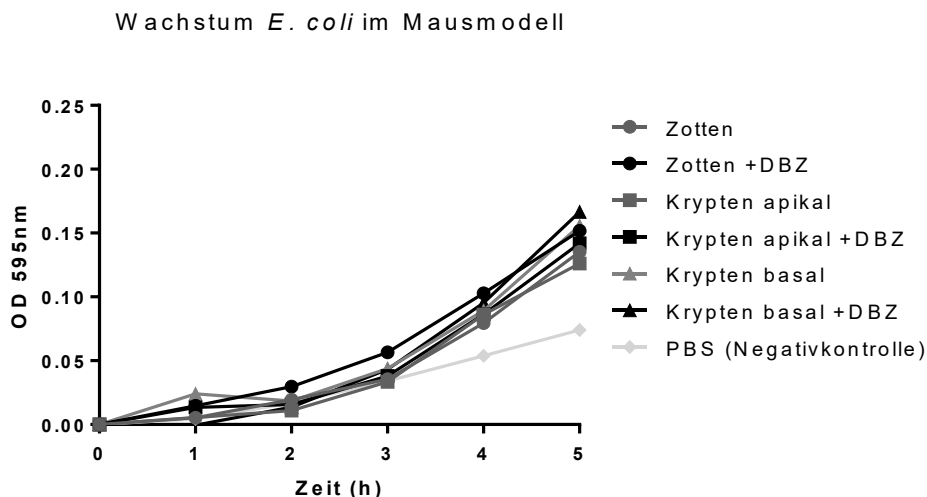
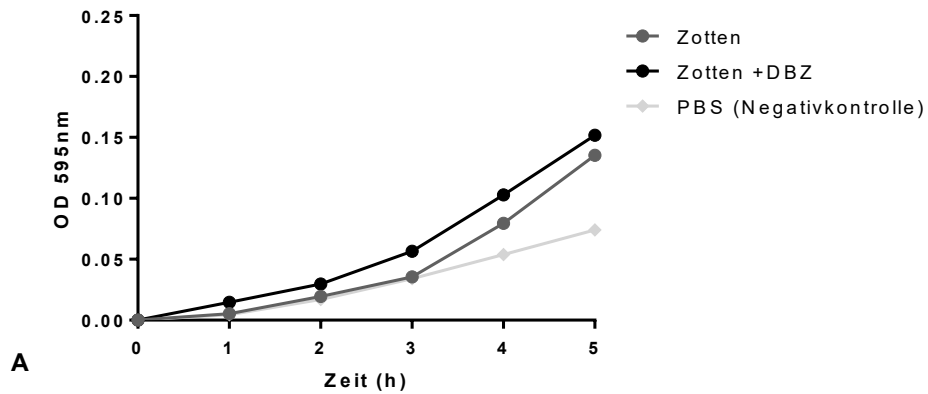
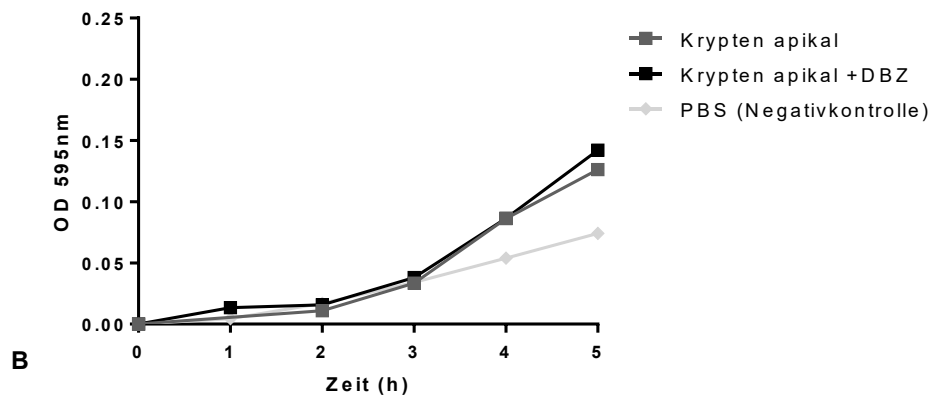


Abb. 18 Wachstum *E. coli* im Mausmodell durch OD-Messung. Überblick über alle drei Fraktionen mit oder ohne DBZ Behandlung. Zur besseren Ansicht wurden diese in Abb. 19 nochmals getrennt dargestellt.

Wachstum *E. coli* im Mausmodell



Wachstum *E. coli* im Mausmodell



Wachstum *E. coli* im Mausmodell

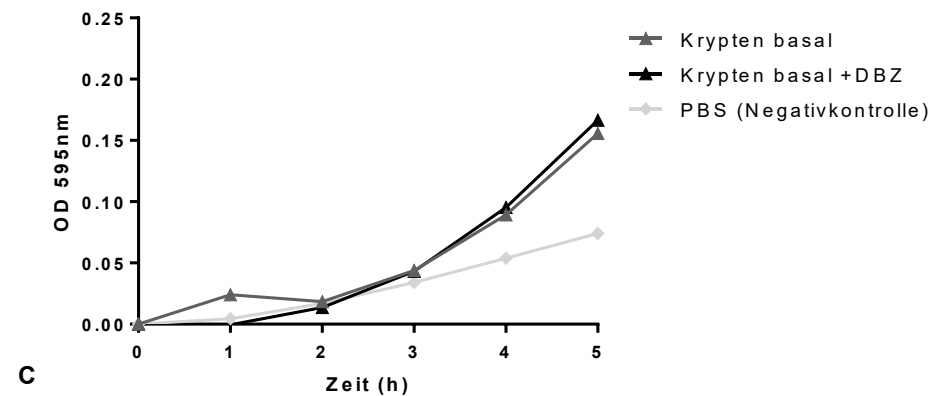


Abb. 19 Wachstum *E. coli* im Mausmodell durch OD-Messung, getrennte Darstellung. Verglichen wurde das bakterielle Wachstum im Verlauf von 5h zu sechs Zeitpunkten von DBZ behandelten und unbehandelten Proben anhand der mit der Weiser Methode hergestellten Proben. Zotten (A), apikale Krypten (B) und basale Krypten (C).

Wachstum *E. coli* im Mausmodell

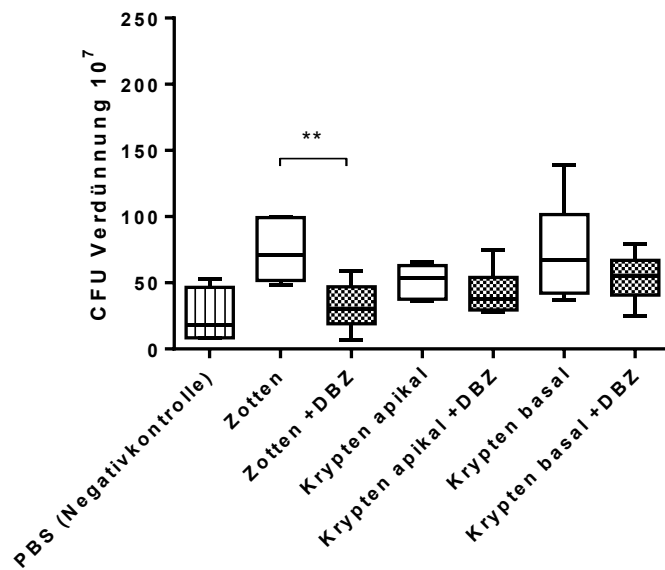


Abb. 20 Wachstum *E. coli* im Mausmodell, CFU. Verglichen wurde das bakterielle Wachstum von DBZ behandelten und unbehandelten Proben anhand der mit der Weiser Methode hergestellten Proben: Zotten, apikale Krypten und basale Krypten. Die DBZ Behandlung der Zotten (Fraktion1) bewirkt eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums (unpaired t-Test, $p=0,0049/**$), jedoch fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Proben der Krypten.

4. Diskussion

Die vier Zelltypen der intestinalen Schleimhaut verfügen gemeinsam über verschiedene Barriere- und Abwehrfunktionen. Durch Zell-Zell-Kontakte, insb. *tight junctions*, wird eine physikalische Barriere gebildet. Becher- und Panethzellen produzieren einerseits Mukus und andererseits antimikrobielle Proteine, die Pathogene abwehren. Um diese Funktionen aufrecht zu erhalten, müssen Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Zelltod des Deckepithels in der Schleimhaut im Gleichgewicht sein. Dies unterliegt der Regulation durch verschiedene Signalwege, zu denen auch der Notch Signalweg zählt. Es ist davon auszugehen, dass die Störung der Barriere- und Abwehrfunktion der Darmschleimhaut mit der komplexen Pathogenese der CEDs assoziiert ist.

4.1 Bakterizidie der Darmschleimhaut

Das Darmepithel verfügt über verschiedene Abwehrmechanismen. Man spricht von der intestinalen Barriere, die sich aus dem Epithel, der Schleimschicht und antimikrobiellen Peptiden (AMP) zusammensetzt. Das Epithel besteht aus einer einlagigen Zellschicht, die besonders durch Enterozyten gebildet wird (Salim & Soderholm 2011). Diese bilden mit Hilfe von *tigh junctions*, *adherend junctions* und *Desmosomen* eine physikalische Barriere (Wells et al. 2011). Das Epithel fungiert als selektiv-permeable Membran mit der Durchlässigkeit für Wasser, Elektrolyte und Nährstoffe. Jedoch wird bestmöglichen die Invasion von Mikroorganismen vermieden (Groschwitz & Hogan 2009). Dem Epithel liegt eine Schleimschicht auf, welche hauptsächlich ein Produkt der Becherzellen ist. Sie dient zum Schutz des Epithels und sorgt zusätzlich für eine ausreichende Hydratation. Zusammengesetzt ist sie aus Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten und enthält einen hohen Anteil an Wasser (Ehehalt et al. 2004). Für die Bildung sind langkettige *Glykoproteine* wie unter anderem Muc2 nötig (Kim & Ho 2010). Im Dünndarm erscheint die Schleimschicht einlagig und ist dem Epithel locker aufgelegt. Im Dickdarm imponiert dagegen der Mukus zweischichtig, mit einer inneren Schicht, die eng mit dem Epithel verbunden und weitgehend bakterienfrei ist, und einer locker aufgelegten äußeren (lumengerichteten) Schicht. Diese kann mechanisch leicht abgetragen werden (Antoni et al. 2014). Die Schleimschicht ist

nicht nur eine mechanisch wirksame Barriere, sondern auch als Speichermedium antimikrobieller Peptide, eine Komponente der intestinalen Abwehr (Meyer-Hoffert et al. 2008). Im menschlichen Darm findet man als antimikrobielle Peptide insbesondere Defensine. α -Defensine sind Proteine, die v.a. durch die Panethzellen im Dünndarm produziert werden. β -Defensine hingegen werden durch epitheliale Zellen des Dickdarms produziert. Die Sekretion von α -Defensinen erfolgt zum einen konstitutiv, zum anderen antigenabhängig (Ayabe et al. 2002).

Ein weiterer Anteil der Abwehrmechanismen des Darms ist das Mikrobiom, definiert als koevolutionierte Mikroorganismen des Menschen (Ostaff et al. 2013). Über Millionen von Jahren hat sich eine Koexistenz zwischen dem Wirt und den intestinalen Mikroorganismen ausgebildet (Liu et al. 2013). Die Koevolution fand sowohl zwischen dem Wirt und der Gesamtheit der Mikroorganismen, als auch unter den Mikroorganismen selber statt (Van den Abbeele et al. 2011). Im gesunden menschlichen Gastrointestinaltrakt findet sich eine Bakteriendichte von etwa 10^{12} /g mit über 1000 Spezies. Diese mikrobielle Flora setzt sich bei jedem Menschen verschieden zusammen. So findet sich nicht in jedem humanen Darm die Breite aller möglichen bakteriellen Spezies und auch nicht in einer einheitlichen bakteriellen Dichte (Liu et al. 2013). Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora haben beispielsweise die Ernährung, das Alter und der Gesundheitsstatus (Eckburg et al. 2005). Zumeist finden sich anaerobe Bakterien. Aber auch Archebakterien, Hefen und Einzeller zählt man zu dem menschlichen Mikrobiom (Rossi et al. 2011). Die Anzahl der Mikroorganismen variiert hinsichtlich ihrer Lokalisation im Gastrointestinaltrakt. Im Magen wird die Dichte der Mikroorganismen durch Salzsäure, im Dünndarm durch Sekrete der Galle und des Pankreas, minimiert. Die höchste Anzahl an Mikroorganismen findet sich im Dickdarm (O'Hara & Shanahan 2006, Wang et al. 2003). Die mikrobielle Flora hat verschiedene Funktionen. Dazu zählen Verdauung, Energiegewinnung und -versorgung der Schleimhautzellen, Regulierung der Fettaufnahme und -speicherung sowie Stimulation der Vaskularisation der Zotten. Die durch bakterielle Spaltung entstandenen Metabolite beeinflussen verschiedene Faktoren des Darms. Sie haben Auswirkungen auf Energieregulierung und Expression verschiedener Gene, die die

Zelldifferenzierung und die antiinflammatorische Antwort regulieren. Außerdem spielen die Mikroorganismen eine wichtige Rolle in der Funktion und Modulation des intestinalen Immunsystems und damit in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen (Eckburg et al. 2005, Liu et al. 2013, Rossi et al. 2011). Im gesunden Magen-Darm-Trakt fungieren das Epithel und die kommensalen Bakterien synergistisch (Becker et al. 2013).

Dysfunktionen der intestinalen Abwehr durch Defekte der Barrierefunktion sowie Dysregulation im Mikrobiom sind ein zentraler Teil der Pathogenese von CEDs. Patienten mit Colitis ulcerosa weisen eine defekte und ausgedünnte Schleimschicht (McCormick et al. 1990, Pullan et al. 1994) mit einer veränderten Zusammensetzung auf (Antoni et al. 2014). Diese Veränderungen werden unter anderem durch die gestörte Becherzelldifferenzierung bedingt (Gersemann et al. 2009). Zum einen ist die physikalische Barriere als Schutzfunktion vermindert, zum anderen verliert die dysfunktionelle Schleimschicht an antimikrobieller Kapazität. Bei Patienten mit M. Crohn im terminalen Ileum ist eine Reduktion des α -Defensins zu messen, ausgelöst durch den Verlust von Panethzellen (Gersemann et al. 2012). Die Freisetzung der Defensine aus Panethzellen erfolgt rezeptorvermittelt durch *NOD2*. Im Mausmodell mit einem *NOD2 knockout* zeigt sich eine schwer eingeschränkte und gestörte antimikrobielle Aktivität im Kryptensegment (Petnicki-Ocwieja et al. 2009). Außerdem konnte die Mutation von *NOD2* bei Patienten mit M. Crohn nachgewiesen werden (Jager et al. 2013).

Die Störung der Balance des Mikrobioms kann die Entstehung von metabolischen und autoimmunen Erkrankungen begünstigen (Rossi et al. 2011). Innerhalb des menschlichen Mikrobioms haben bestimmte Bakterienspezies Sonderstellungen. So ist eine Besonderheit in der Darmflora das Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii*, welches in *in vivo* und *in vitro* Studien einen nachgewiesenen anti-inflammatorischen Effekt hat. Bei Patienten mit M. Crohn lässt sich eine verminderte Konzentration von *Faecalibacterium prausnitzii* nachweisen (Sokol et al. 2008, Sokol et al. 2009). Durch Dysfunktion des Epithels können Teile der kommensalen Bakterienflora in die Schleimhaut einwandern, chronische Infektionen auslösen und die Entstehung von CEDs begünstigen (Gunther et al. 2011). Patienten mit M. Crohn weisen eine erhöhte Konzentration von Mikroorganismen im Darm im Vergleich zu gesunden Vergleichsgruppen auf.

Die Höhe der Konzentration korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (Swidsinski et al. 2002). Die Zusammensetzung der Mikroorganismen variiert bei den unterschiedlichen Lokalisationen von M. Crohn. In der typischen Lokalisation des M. Crohn, dem terminalen Ileum, lassen sich vor allem invasive *E. coli* nachweisen. Die Dysfunktion der epithelialen Barriere- und Abwehrfunktion und Störungen im Mikrobiom sind jedoch nur als ein Anteil der Pathogenese von CEDs zu betrachten. Chronische Entzündungsreaktionen in der Schleimhaut schaffen eine positive Umgebung für maligne Entartung. Patienten mit CEDs haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms, wobei die Dauer und Art der Entzündung mit der Entstehung assoziiert ist (Liu et al. 2013).

In den beschriebenen Versuchen wurde *E. coli* zur Testung der Bakterizidie verwendet, da dies eine häufige Spezies der kommensalen Bakterien ist und durch unphysiologische intraepitheliale Lokalisation an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt ist. In weiterführenden Studien wäre eine Durchführung mit anderen typischen kommensalen Bakterien, insbesondere auch *Faecalibacterium prausnitzii* zum Vergleich sinnvoll. Diese Spezies war jedoch für die eigenen Untersuchungen im Labor nicht verfügbar.

4.2 Modellierung von intestinalem Epithel mittels Zellkulturmodellen

Um Funktionen des Darmepithels zu untersuchen gibt es verschiedene Möglichkeiten der Erstellung von Modellen. Eine vergleichsweise einfache Modellierung zur Untersuchung der Funktionen, in diesem Falle der Bakterizidie, stellen Zellkulturmodelle dar. Da die Kultivierung von primären Panethzellen *in vitro* ist bisher nicht ausreichend etabliert wurde (Tan et al. 2015), wird zumeist auf Enterozyten zurückgegriffen.

In der durchgeführten Versuchsreihe wurden zwei Zellkulturmodelle (CaCo2 und Colo320), beides Zelllinien von humanen kolorektalen Adenokarzinomen, etabliert. Colo320 wird in der Literatur besonders zur Untersuchung von Therapieoptionen bei Kolonkarzinomen verwendet und verfügt über Eigenschaften des Kolonepithels (Yu et al. 2018). CaCo2 hingegen hat sich als Zellkulturmodell etabliert, welches Eigenschaften von Epithelzellen des Kolons

und des Dünndarms vereint und über einen Bürstensaum verfügt (Date et al. 2020, Dosh et al. 2018, Mastrogiovanni et al. 2019). Trotz allem muss kritisch hinterfragt werden, ob Enterozyten eines kolorektalen Karzinoms in der Lage sind die Funktion von Dünndarmepithel zu simulieren, im speziellen die antimikrobielle Funktion von Panethzellen. Witthoft et al. (2005) zeigte bereits, dass in CaCo2 Zellen durch Stimulation die Transkription von β -Defensinen induziert werden kann. Weiterhin wurde bereits die Fähigkeit Freisetzung freier radikaler nach pro-inflammatorischer Stimulation von CaCo2 Zellen festgestellt (Panaro et al. 2012).

Nach Behandlung von CaCo2 wt Zellen mit DBZ für 48h zeigte sich ein erniedrigtes bakterielles Wachstum in der OD Messung und *CFUs* (vgl. Abb. 12 und Abb. 13). Dies gibt einen Anhalt darauf, dass es möglich ist, im CaCo2 Zellkulturmodell Bakterizidie zu induzieren. Unterstützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen von Tan et al. (2015), der die Differenzierung von CaCo2 zu Panethzellen im einlagigem Zellkulturmodell zeigte. Auch De Gregorio et al. (2018) zeigte, dass es möglich ist, durch gezielte Stimulation Differenzierung von CaCo2 Zellen im 3D Modell in alle Zellformen des Darmepithels zu induzieren (Enterozyten, enteroendokrine Zellen, Becher- und Panethzellen). CaCo2 verfügt demnach über das Potential, die verschiedenen Funktionen der intestinalen Epithelzellen zu übernehmen. Ob die DBZ Behandlung im CaCo2 Zellkulturmodell zu einer Differenzierung von Paneth- und/ oder Becherzellen oder zu einer Ausbildung von antimikrobiellen Merkmalen in den ursprünglichen Enterozyten führt, bleibt hierbei offen. Im Colo320 Zellkulturmodell lässt sich durch DBZ Behandlung keine Bakterizidie induzieren. Dies könnte aus den unterschiedlichen Epitheleigenschaften resultieren. DBZ bewirkt demnach die Induktion von Bakterizidie in Zellreihen mit Eigenschaften von Enterozyten des Dünndarms und intermediär des Kolons, jedoch nicht in Zellen, die nur über Eigenschaften des Kolonepithels verfügen.

Verschiedene Studien zeigten den Einsatz von Epithelzellen des Dünndarms, gewonnen aus Schweinen, Ratten oder menschlichen Feten, hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Funktion (Wan Mohamad Zain et al. 2019).

Die Durchführung von *in vitro* Studien mit Zellkulturlinien ist durch die einfach strukturierte Stimulation und genetische Manipulation, im Vergleich zu zeitaufwendigen und kostenintensiven *in vivo* Studien, gut durchführbar. Trotzdem handelt es sich hierbei um kein rein physiologisches Modell. Eigenschaften und Verhalten der Zellen können abweichend sein. Zur besseren Vergleichbarkeit können beispielsweise 3D Modelle des Darmepithels erstellt werden. Dies kann durch Gewinnung der Zellen *ex vivo* aus zumeist murinem Darm (Drummond et al. 2017, Yokoi et al. 2019) oder durch gezielte Differenzierung von humanen Stammzellen zu den verschiedenen Zelltypen des Epithels (Organoid) erfolgen (Watson et al. 2014). In dieser Form können die Funktion von Paneth- und Becherzellen spezifisch untersucht werden. Drummond et al. (2017) verglich im Rahmen von viralen Infektionsstudien den Einsatz eines intestinalen 3D Modells, in dem Stammzellen durch verschiedene Zusätze (u.a. DBZ) zur Differenzierung zu den verschiedenen Zelltypen stimuliert wurden, mit der Zellkulturreihe CaCo2. Die Studie zeigte, dass die Ergebnisse, die mittels des 3D Modells erzeugt wurden, die gleiche Aussagekraft haben, wie Versuche mit herkömmlichen Zellkulturreihen.

4.3 Die Rolle von Caspase8 in der Bakterizidie des Darmepithels

Die Caspase8 ist als Initiator-Caspase in die Aktivierung des extrinsischen, rezeptorvermittelten Apoptose Vorgang involviert. Des Weiteren spielt sie eine Rolle in der Proliferation, dem Zellzyklus und der T-Zellaktivierung (Barnhart et al. 2003).

Gunther et al. (2011) zeigte im Δ Casp8 Mausmodell das spontane Auftreten von entzündlichen Läsionen im terminalen Ileum, die einer Ileitis Crohn entsprechen. Histologisch ließ sich ein Verlust von Panethzellen und eine Verminderung der Anzahl der Becherzellen darstellen. Weiterhin waren Gene, die in die antimikrobielle Abwehr involviert sind (kodieren für Defensine, Lysozyme), herunterreguliert. Die Zelltoderate durch Necroptose, v.a. im basalen Kryptensegment des Dünndarms, war deutlich erhöht. In den Krypten zeigten sich von der Necroptose v.a. Zellen betroffen, die elektronendichte Granula enthalten und a.E. Panethzellen entsprechen.

In der Vorarbeit zu den hier dargestellten eigenen Versuchen wurde durch die Arbeitsgruppe ein Caspase8 *knockout* Mausmodell etabliert (Casp8^{Δint}). Histomorphologisch zeigte sich eine gestörte Krypten-Zotten-Architektur mit verminderter Differenzierung sekretorischer Zellreihen und Invasion inflammatorischer Zellen. Die Versuchstiere entwickelten in Abschnitten des gesamten Darms das Bild einer Enterocolitis, assoziiert mit geringerem Körpergewicht und einer erhöhten Mortalität. Im Dünndarm zeigten sich ein nahezu kompletter Verlust von Panethzellen und eine signifikante Reduktion der Becherzellanzahl bei verringerter Mukusproduktion. Die Permeabilität des Epithels war erhöht und pro-inflammatorische Zytokine (z.B. TNF-α) hochreguliert. Casp8^{Δint} zeigten außerdem eine erhöhte Zelltodrate durch Necroptose im Dün- und Dickdarm. Neben der Vermittlung von Apoptose ist die Caspase8 an der Regulation der Differenzierung von sekretorischen Zellen und dem Vorgang von Necroptose beteiligt (Kaemmerer et al. 2015). Eine Auswirkung des ΔCasp8 auf die Bakterizidie ließ sich durch fehlende Panethzellen mit fehlender Produktion von AMPs und verminderter Mukusproduktion durch verringerte Becherzellanzahl, vermuten. Weiterhin zeigte sich das Auftreten von Enterocolitiden, lokalisiert v.a. im Bereich des terminalen Ileums. Caspase8 könnte im intestinalen Epithel als Schutz vor entzündlichen Läsionen durch Regulation der Differenzierung und Zelltodvorgänge sekretorischer Zellen, insbesondere der Panethzellen, fungieren.

Jeon (2015) zeigte weiterhin bei Casp8^{Δint} im Dünndarm und Kolon erniedrigte mRNA Expression von Math1 und erhöhte Expression von Hes1. Es handelt sich um zwei Marker des Notch Signalweges, welche in dieser Konstellation als erhöhte Aktivität zu werten war. Eine verringerte Expression von Math1 ließ sich auch in CaCo2 bei Caspase8 Verlust (CaCo2^{ΔCasp8}) nachweisen. Die verstärkte Aktivierung von Notch nach ΔCasp8 war demnach im CaCo2 Zellkulturmodell reproduzierbar. Um die Auswirkungen des Caspase8 Verlustes und der erhöhten Aktivierung des Notch Signalweges auf die Bakterizidie von CaCo2 zu untersuchen, wurde der in 2.2.3.3 Durchführung des Bakterizitätsassays an Zellkulturproben beschriebene Bakterizitätsassay durchgeführt. Vergleicht man das bakterielle Wachstum nach Inkubation mit den Proben ergeben sich die in 3.1.1 dargestellten Ergebnisse. Es zeigen sich keine Unterschiede des

bakteriellen Wachstums zwischen dem CaCo2 wt und CaCo2 Δ Casp8. Vergleichend zeigte die Kontrolle CaCo2 Δ neg.*siRNA* erhöhtes bakterielles Wachstum und damit eine verringerte Bakterizidie (vgl. Abb. 14). Die Abweichungen der CaCo2 Δ neg.*siRNA* und die Rolle der Transfektion werden im Abschnitt 4.4 weitergehend diskutiert. Die von Jeon (2015) festgestellte Notch Aktivierung in CaCo2 Δ Casp8 würde sich demzufolge nicht auf die Bakterizidie des Zellkulturmodells auswirken. Im durchgeführten Bakterizitätsassay wurden jedoch lediglich die Auswirkungen des Δ Casp8 auf das Wachstum von *E.coli* untersucht. Zwar handelt sich bei *E.coli* um ein Bakterium, welches zu großen Anteilen im Gastrointestinaltrakt zu finden ist und invasive *E.coli* als Teil der Pathogenese von CEDs bekannt sind, jedoch sollte, um eine weitere Aussage über die Bakterizidie treffen zu können, die durchgeführten Versuche auch mit anderen potenziell pathogenen Keimen durchgeführt werden. Beide Methoden der quantitativen Messung der Bakterizidie müssen hierbei kritisch hinterfragt werden. Die Messung der optischen Dichte spiegelt das bakterielle Wachstum im Verlauf von 5h durch eine Zunahme der Anzahl der Bakterien in einem definierten Volumen wider. Die Testung durch Durchführung der CFUs könnte jedoch eine verlängerte Inkubation der Bakterien mit den Proben zulassen. In allen durchgeführten Experimenten zeigte sich die CFU als die Methode mit der besseren Sensitivität im Vergleich zur OD-Messung. Die in beiden Methoden aufgefallene hohe Standardabweichung ist am ehesten durch Verunreinigungen zu erklären. Zur weiteren Untersuchung der Folgen des Caspase8 Verlustes hinsichtlich der Bakterizidie könnten PCR und Westernblot Untersuchungen bspw. zum Nachweis der mRNA Expression von Defensinen durchgeführt werden. Auch eine Darstellung möglicher elektronendichter Granula oder Mukuseinschlüsse der Zellen könnte weiteren Aufschluss über die Induktion von Bakterizidie geben.

Im Colo320 Zellkulturmodell zeigte sich keinerlei erkennbare Auswirkung des Δ Casp8 auf die Bakterizidie im Vergleich zum wt und Δ neg.*siRNA*. Die in beiden beschriebenen Δ Casp8 Mausmodellen Veränderungen treten in Abschnitten des gesamten Darmtraktes, betont jedoch im Dünndarm und dort besonders im terminalen Ileum. Bei den beiden verwendeten Zellkulturlinien handelt es sich jedoch um Zellen eines kolorektalen Karzinoms. Zum einem bleibt eine Aussage

über die Veränderung der Bakterizidie nach Caspase8 Verlust im Dünndarm offen, zum anderem verfügen Karzinomzellen ggf. über veränderte Eigenschaften und Verhaltensweisen. Um eine genauere Aussage treffen zu können, wäre die Durchführung der Versuche mit Dünndarmepithel sinnvoll.

4.4 Auswirkung der Transfektion auf das Zellkulturmodell

Um Funktionen bestimmter Gene zu untersuchen, können diese durch Einbringen einer *siRNA* spezifisch *in vitro* und *in vivo* ausgeknockt werden (Transfektion) (Cardoso et al. 2007). Die Effektivität des *knockdown* ist abhängig von der Konzentration der *siRNA* und der Methode der Transfektion (Metwally et al. 2012). Um eine bessere Effektivität der Transfektion zu erreichen, können Liposomen (bspw. Lipofectamin2000™) eingesetzt werden. In der durchgeführten Studie wurden CaCo2 und Colo320 mit Δ Casp8 untersucht, die im Vorhinein durch Transfektion unter Zugabe von Lipofectamin2000™ behandelt wurden (Jeon 2015). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Proben durch Transfektion mit negativer *siRNA* (Δ neg.*siRNA*) erzeugt. Weiterhin erfolgte der Vergleich mit wt Zellen. Im CaCo2 Zellkulturmodell zeigte sich, wie in Abb. 14 dargestellt, ein erhöhtes bakterielles Wachstum von CaCo2 Δ neg.*siRNA* im Vergleich zum wt und CaCo2 Δ Casp8 im 24h Versuch. In den Proben von CaCo2 Δ neg.*siRNA* und wt, beide als Kontrolle gedacht, war ein weitgehend übereinstimmendes Ergebnis zu erwarten. Ungewollte unspezifische Effekte des Transfektionsvorgangs auf die Zellen und deren Proteinproduktion, auch im Zusammenhang mit Lipofectamin2000™, wurden neben einer gewissen Zytotoxizität, bereits beschrieben (Spagnou et al. 2004). Die Vermutung, der Transfektionsvorgang könnte sich auf die Bakterizidie der Zellen auswirken, wurde durch die Ergebnisse der 48h Versuches jedoch nicht bestätigt (vgl. Abb. 11). Sie sind demnach a.E. als Verunreinigung zu werten.

Es zeigte sich jedoch ein Unterschied der Induktion von Bakterizidie durch DBZ zwischen wt, CaCo2 Δ Casp8 und CaCo2 Δ neg.*siRNA*. Durch 48h Behandlung mit DBZ zeigte sich im wt und Δ Casp8 vermindertes bakterielles Wachstum im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, wohingegen die DBZ Behandlung von CaCo2 Δ neg.*siRNA* keinerlei Änderung des bakteriellen Wachstums bedingt. Vergleicht man lediglich wt und Δ neg.*siRNA*, könnte man die unterschiedliche

Induktion der Bakterizidie durch ungewollte, unspezifische Effekte der Transfektion erklären. Unter Hinzunahme des verminderten bakteriellen Wachstums der Δ Casp8 Proben, die dem gleichen Vorgang der Transfektion unterzogen wurden, kann diese Aussage nicht endgültig getroffen werden. Im Colo320 Zellkulturmodell zeigte die Transfektion keine Änderung der Bakterizidie. Ungeklärt bleibt, ob und in welcher Form die Transfektion als Vorgang an sich, sich auf die Bakterizidie der Zelle und das mögliche Ansprechen einer DBZ Behandlung auswirkt.

4.5 Interaktion von Notch in der Bakterizidie intestinalen Epithels

Der Notch Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Proliferation und Differenzierung von intestinalen Stamm- und Vorläuferzellen. Er beeinflusst maßgeblich die Differenzierung der Enterozyten mit Ausbildung absorptiver bzw. sekretorischer Zellen. Im aktivierten Zustand fällt diese Entscheidung zu Gunsten der absorptiven Zellen aus (Pantanowitz et al. 2012).

Durch GSI, wie bspw. Dibenzazepin (DBZ), kann der Notch Signalweg *in vivo* und *in vitro* inhibiert werden. Dies resultiert in vermehrte Differenzierung zu sekretorischen Zellen, v.a. Becherzellen (Becherzellhyperplasie) (Milano et al. 2004). Neben der histologischen Sicherung der Becherzellhyperplasie, ließ sich die verstärkte Funktionalität der Becherzellen durch vermehrte Mukusproduktion und erhöhte Becherzellmarker (bspw. Muc2) nachweisen (Wong et al. 2004). Nach GSI Behandlung konnten weiterhin erhöhte Level von typischen Markern für Panethzellen (Mmp7, Sox9) und erhöhte Konzentrationen von Panethzellprodukte (Kryptidine, Lysozyme, Ephrine) nachgewiesen werden. Histomorphologisch ließen sich Zellen mit Paneth-typischen, jedoch veränderten Merkmalen erkennen. Sie enthielten kleinere elektronendichte Granula und zusätzliche Mukuseinschlüsse. Die gesteigerte Funktion trotz veränderter histologischer Merkmale der Panethzellen nach GSI Behandlung, ließ die Vermutung zu, der Notch Signalweg ist in die Regulation der Differenzierung von Panethzellen und deren Phänotyp involviert (van Es et al. 2005, VanDussen et al. 2012).

Die Aktivität von Notch ist entlang des Gastrointestinaltrakts variabel (Vooijs et al. 2011). Infolgedessen kann die Behandlung mit DBZ in den verschiedenen Darmabschnitten unterschiedliche Auswirkungen haben.

Ob die vermehrte sekretorische Differenzierung durch DBZ in erhöhte Bakterizidie resultiert, sollte in dieser Studie untersucht werden. Im CaCo2 Zellkulturmodell induzierte die Behandlung mit DBZ für 48h der wt Zellen verringertes bakterielles Wachstum im Gegensatz zur 24h Behandlung. Der Effekt der DBZ Behandlung zeigte sich demnach nicht nur wie von Wong et al. (2004) beschrieben Dosisabhängig, sondern auch abhängig von der Inkubationszeit (vgl. 3.1.1).

Durch die DBZ Behandlung des Colo320 wt lässt sich in den gezeigten Versuchen keine Bakterizidie induzieren (vgl. 3.1.2). Dies gibt einen Hinweis auf die unterschiedlichen Auswirkungen der Modifikation durch Signalwege in den Zelllinien abhängig von ihren Eigenschaften und Verhaltensweisen.

Die von Jeon (2015) mit DBZ behandelten Kontrollmäuse zeigten erneut die bereits beschriebene Becherzellhyperplasie und das Auftreten von panethzellähnlichen Zellen mit verändertem Granulat und enthaltendem Muc2. Die sekretorische Transdifferenzierung im murinen Darmepithel durch DBZ Behandlung wurde hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Funktion im 2.2.3.4 beschriebenen Bakterizitätsassay untersucht. Um lokoregionäre Unterschiede der Induktion entlang der Krypten-Zotten-Achse vergleichen zu können, wurde das Epithel mittels der Weiser Methode unter histologischer Kontrolle disseziert (vgl. 2.2.2.4 und Abb. 17). Die in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse zeigten eine erhöhte Bakterizidie im Bereich der Zotten. Man erkannte weiterhin eine Tendenz der Reduktion des bakteriellen Wachtums im Bereich der basalen Krypten, diese war jedoch nicht signifikant. Dies deutet auf erhöhte Bakterizidie durch DBZ induzierte Differenzierung der Vorläuferzellen zu sekretorischen Zellen entlang der Krypten-Zotten-Achse, zugehörig zu den Lokalisationen der Becher- und Panethzellen, hin. Im Bereich der Zotten sind neben Enterozyten v.a. Becherzellen vorzufinden. Die durch DBZ induzierte Bakterizidie könnte demnach durch Becherzellen und deren Mukus bedingt sein. Ahmed et al. (2012) beschreibt eine veränderte Mukuszusammensetzung nach Notch Inhibierung. So

könnte sich der Notch Signalweg neben der Differenzierung von Becherzellen und deren Aktivität, regulativ auch auf die Funktionalität hinsichtlich der Bakterizidie auswirken. Die Tendenz der gesteigerten Bakterizidie durch DBZ in den basalen Krypten gibt einen Hinweis auf die antimikrobielle Funktionalität, der vermehrt aufgetretenen panethzellähnlichen Zellen und erhöhter Konzentration von Panethzellprodukten. Zur Bestätigung der bisher unzureichend signifikanten Reduktion, müssten die Versuche mit erhöhter Probenzahl durchgeführt werden. Weiterhin sollte mittels PCR und Westernblot die ausreichende Notch Inhibierung in den drei Fraktionen nachgewiesen werden, um den lokoregionären Auswirkungen der Notch Inhibierung zu vergleichen.

Die Weiser Methode lässt eine separierte Abtragung des Epithels entlang der Krypten-Zotten-Achse zu (vgl. Abb. 17). Vor Dissektion der Fraktionen wurde der Darm gereinigt, jedoch muss davon ausgegangen werden, dass Rückstände des Darminhaltes zurückgeblieben sind. Diese Rückstände können zum einen kommensale und pathogene Keime enthalten, zum anderen Anteile von Nahrungsmittel sein, die den Bakterizitätsassay beeinflussen könnten. In Fraktion 1 befinden sich physiologisch Enterozyten und einige Becher- und enteroendokrine Zellen. Allerdings sind im Epithel auch Immunzellen, bspw. Lymphozyten, angesiedelt. AMPs werden, neben Panethzellen, auch durch Abwehrzellen und Enterozyten gebildet und sezerniert (Jager et al. 2013) und im Mukus gespeichert (Antoni et al. 2014). AMP vermittelte Bakterizidie kann in den Fraktionen demnach auch ohne Anwesenheit von Panethzellen stattfinden. Auch in Fraktion 2 und 3 kann von einer vollkommenen Reinheit der entnommenen Proben nicht ausgegangen werden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass bei der Durchführung der Weiser Methode es zur Degranulation bakterizider Zellen und einer somit artifiziellen Anreicherung in einzelnen Fraktionen kam. Die Anwesenheit dieser Abwehrzellen in den Fraktionen kann die Bakterizidie der Probe beeinflussen. All diese akzidentellen Anteile der Fraktionen können die Aussagekraft über die Paneth- und Becherzellfunktion einschränken. Die Methode stellt jedoch eine experimentelle Basis dar, um physiologische, lokoregionäre Unterschiede entlang der Krypten-Zotten-Achse zu untersuchen.

Die Ergebnisse der DBZ Behandlung in Zellkultur und murinem Darmepithel weisen auf ein gewisses Potenzial pharmakologisch induzierbarer Bakterizidie hin, abhängig von den Eigenschaften und der Differenzierung der Epithelzellen.

4.6 Die Rolle der Notch Inhibition als reverse Modulation bei Caspase8 Verlust

Gestörte Becher- und Panethzelldifferenzierung mit verminderter Produktion von Mukus und AMPs sind ein Teil der Pathogenese von CEDs (Gerseemann et al. 2009, Gerseemann et al. 2012). Das in den Vorversuchen zu dieser Studie etablierte Δ Casp8 Mausmodell zeigte das spontane Auftreten von Crohn-ähnlichen, entzündlichen Läsionen, mit gestörter Differenzierung der sekretorischen Zellen, verminderte Schleimproduktion, erhöhter Permeabilität des Epithels und vermehrter Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α). Dies deutete auf eine Rolle der Caspase8 in der Pathogenese von CEDs hin (Jeon et al. 2013). Der Verlust von Caspase8 ging mit einer gesteigerten Aktivierung des Notch Signalweges einher. Nach Δ Casp8 zeigten sich im Mausmodell in Abschnitten des Dün- und Dickdarms erniedrigte mRNA Expression von Math1 und erhöhte Expression von Hes1 (Jeon 2015). Eine erhöhte Expression des *NICD* konnte in von Colitis ulcerosa betroffenen Darmabschnitten mit resultierender Reduktion der Becherzellanzahl nachgewiesen werden (Zheng et al. 2011). Kini et al. (2015) zeigte, dass der Notch Signalweg unterschiedlich aktiv sein kann, abhängig von den Stadien der Colitis ulcerosa. Die Interaktion von Notch und Caspase8 ist Teil eines Netzwerkes aus Signalwegen in der Regulation des Darmepithels (Fang Yu et al. 2019).

Da sich die Aktivität des Notch Signalweges bei Caspase8 Verlust erhöht zeigte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Notch und Caspase8 als Gegenspieler an der Regulation der Differenzierung der sekretorischen Zellen beteiligt sind. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde Casp ^{Δ int} mit DBZ behandelt und hinsichtlich histomorphologischer und markerspezifischer Veränderungen untersucht. Histologisch zeigte sich eine verstärkte Differenzierung sekretorischen Zellen mit gesteigerter Bildung von Paneth- und Becherzell-Vorläufern. Casp8 ^{Δ int} zeigte weiterhin nach DBZ Behandlung erhöhte Marker für

Becher- und Panethzellen (Muc2, MMP7, Gif1) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Interessanterweise zeigte sich die Induktion der Differenzierung der sekretorischen Zellen durch DBZ im Casp^{Δint} v.a. im terminalen Ileum. Dies steht im Gegensatz zum wt, der diese Induktion in Anteilen des gesamten Darmverlaufes zeigte. Auch zeigten sie die Level der Panethzellmarker nach DBZ Behandlung im Casp^{Δint} stärker erhöht als im wt. Die Veränderungen durch ΔCasp8, die v.a. im terminalen Ileum aufgetreten waren, wurden durch Notch Inhibierung verringert, ohne signifikantes Ansprechen auf den Rest des Darms. Die Level der Panethzellmarker nach DBZ Behandlung zeigten sich im Casp^{Δint} stärker erhöht als im wt. Weiterhin zeigte sich im Vergleich zum wt im Casp^{Δint} nach DBZ Behandlung verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF-α). Die Casp^{Δint} Versuchstiere nahmen nach DBZ Behandlung an Gewicht zu und hatten eine bessere Überlebensrate. Konträre Ergebnisse zeigten sich durch DBZ Behandlung der wt Tiere, die ein verringertes Gewicht aufwiesen und eine erhöhte Mortalität. Die DBZ Behandlung ergab einen unterschiedlichen Effekt, abhängig von der Anwesenheit von Caspase8. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass DBZ als reverser Modulator bei Caspase8 Verlust agieren kann.

Eine verringerte Expression von Math1 ließ sich auch in CaCo2^{ΔCasp8} nachweisen. Die verstärkte Aktivierung von Notch ist demnach im Zellkulturmodell mit CaCo2^{ΔCasp8} reproduzierbar. In der OD Messung zeigte sich verstärkte Bakterizidie bei CaCo2^{ΔCasp8} nach DBZ Behandlung im Vergleich ohne Behandlung. Auch in CFUs zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion bakteriellen Wachstums nach DBZ Behandlung. Die Induktion von Bakterizidie durch DBZ zeigte sich auch in den wt Kontrollzellen und es bestand kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Reduktion zwischen wt und CaCo2^{ΔCasp8} Zellen. Im CaCo2 Zellkulturmodell lässt sich demnach die Induktion von Bakterizidie durch DBZ zeigen, jedoch unabhängig von Caspase8. DBZ induzierte im Colo320 Zellkulturmodell, einer Zelllinie mit Eigenschaften und Verhaltensweisen von Kolonepithel, keine Bakterizidie, weder nach ΔCasp8 noch im wt.

Die Abhängigkeit der Modulation zwischen DBZ und ΔCasp zeigte sich im Mausmodell v.a. im terminalen Ileum. CaCo2 übernimmt Eigenschaften und

Verhaltensweisen von Dünndarm Epithel, jedoch bleibt die Zelllinie ursprünglich Kolon Epithel. Bezieht man die Ergebnisse des regionären DBZ Effektes nach Δ Casp8 im Mausmodell von Jeon (2015) auf die Ergebnisse der Zellkulturmodelle, stimmt das fehlende Ansprechen hinsichtlich der Bakterizidie durch DBZ nach Caspase8 Verlust im Kolon in beiden Studien überein. Ob DBZ auch im Zellkulturmodell bei Δ Casp8 eine vermehrte Bakterizidie induziert, könnte durch weitere Versuchsreihen mit Zellereihen aus Dünndarmepithel untersucht werden.

Im Rahmen des Dissertationsverfahrens war eine Ausweitung des Mausmodells mit erweiterter Tieranzahl und der Einbindung von Δ Casp8 Mäusen mit und ohne DBZ Behandlung nicht möglich.

Abschließend kann somit nicht endgültig geklärt werden, inwieweit DBZ als reverser Modulator bei Caspase8 Verlust *in vivo* fungiert. Die durchgeführten Versuche geben jedoch einen ersten Hinweis auf die Funktionalität der durch DBZ Behandlung induzierten Bakterizidie, die wahrscheinlich unabhängig von Caspase8 ist.

4.7 Inhibierung von Notch als therapeutischer Ansatz

Durch seine Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung und der Entscheidung über das Zellschicksal, ist der Notch Signalweg in die Entstehung von Neoplasien involviert (Fernandez-Majada et al. 2007). Je nach Tumorart kann der Notch Signalweg als Tumorsuppressor oder pro-onkogen fungieren (Ntziachristos et al. 2014). Zur Pathogenese solider Tumore, wie dem kolorektalen Karzinom, tragen verstärkte Proliferation und verminderte Differenzierung bei (Fernandez-Majada et al. 2007). Die kolorektale Karzinom entsteht multimodal und verschiedenen Signalwege, unter anderem Notch, sind in seine Entstehung involviert (Farooqi et al. 2019). Eine verstärkte Aktivität des Notch Signalweges bedingt eine verstärkte Proliferation. Hes1, eines der Zielgene von Notch, zeigte sich in kolorektalen Karzinomen häufig überexprimiert. Weiterhin lässt sich eine erhöhte Expression von Notch-1, eines der vier Rezeptorproteine des Notch Signalweges, nachweisen. Die vier Rezeptorproteine (Notch-1 bis -4) haben unterschiedliche Affinitäten zu den

Liganden, aktivieren jedoch alle den Notch Signalweg (Vinson et al. 2016). Die erhöhte Expression von Notch-1 korreliert mit dem Tumorgrading und der Metastasierungsrate und somit mit dem Outcome für die Patienten. Auch von JAG2, ein Ligand des Notch Signalweges, ließen sich erhöhte Level in kolorektalen Karzinomen nachweisen. Da die Rate der Erhöhung mit der Metastasierungsrate korreliert, wird JAG2 als Prognosemarker gehandelt (He et al. 2019). Auch die höhere Expression von Notch-3 und JAG1 sind mit einem schlechteren Outcome assoziiert, da sie sich negativ auf Tumorgrading, Infiltrationstiefe, Nodalstatus und Metastasierung auswirken (Rallis et al. 2019).

Auch in Mammakarzinomen wird eine abnorme Aktivität des Notch Signalweges beschrieben. Für das Wachstum benötigen Tumore eine ausreichende Angiogenese, z.B, vermittelt über das VEGF-Rezeptorprotein (*vaskulary endothelia growth factor*), welches ein weiteres Zielgen des Notch Signalweges ist. Es ließ sich eine erhöhte Expression von Notch-1 und Notch-4 (Kontomanolis et al. 2018) in Mammakarzinomen nachweisen, wobei Notch-1 mit einem schlechteren Outcome für die Patienten korrelierte (Lai et al. 2018). Aber auch in nicht-soliden Tumoren, beispielsweise der T-ALL zeigte sich eine abnorme Aktivität des Notch Signalweges. In ca. 60% der T-ALL findet sich eine Mutation des Notch-1, wohingegen eine Mutation von Notch-3 ohne Konsequenz bleibt (Gao et al. 2019). Die Inhibierung von Notch stellt einen zentralen Inhalt in der antitumorösen Forschung dar.

In verschiedenen Studien wurde bereits der negative Effekt von GSI auf Kontrollmäuse nachgewiesen. Die Inhibierung von Notch durch GSI bedingt die Dysfunktion verschiedener Organe, beispielsweise des Thymus, der Nieren und des Darms. Diese Dysfunktionen umschreiben v.a. Vorgänge der Immunantwort. Die unerwünschten Effekte sind Dosisabhängig. Im Darm zeigte sich vermehrte Becherzelldifferenzierung mit verstärkter Schleimproduktion. Die erhöhte Schleimdichte im Lumen des Darms erzeugte Diarrhoen, die in reduziertem Körpergewicht der Versuchstiere resultieren. Zusätzlich bedingt die Behandlung mit GSI eine vermehrte Differenzierung der B-Zellen, zum Nachteil der T-Zellen (Shih & Holland 2006, Wong et al. 2004).

In der Studie von Jeon (2018) zeigte sich interessanterweise, dass die Behandlung mit DBZ bei Δ Casp8 sich positiv auf das Gewicht und die Überlebensrate auswirkten. Die DBZ behandelten Δ Casp8 Mäuse zeigten eine verbesserte Abwehrfunktion des Darms mit niedrigerer Permeabilität des Epithels und vermehrter Differenzierung der Vorläuferzellen von Becher- und Panethzellen.

Die Behandlung mit DBZ ist offensichtlich reich an Nebenwirkungen. Um diese Nebenwirkungen zu vermindern, möglicherweise sogar zu umgehen, befinden sich verschiedene andere Substanzen in der Entwicklung und es werden weitere Ansätze der Inhibition geprüft. Eine vielversprechende Methode, um Notch zu inhibieren, ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die unterschiedlichen Rezeptorproteine und Liganden (Ntziachristos et al. 2014).

Die Behandlung mit GSI ist auch in Krankheitsbildern, fernab der Krebs- und entzündlichen Therapie, eine Option. So bewirkt die intraperitoneale Injektion mit GSI im Mausmodell eine Umwandlung von weißem zu braunem Fettgewebe und reduziert Adipositas (Jiang et al. 2017). Im Zellkulturmodell zeigt die Behandlung von Endometriosezellen mit GSI eine positive Auswirkung (Ramirez Williams et al. 2019) und auch in der Alzheimer Therapie steht die Anwendung von GSI weiterhin im Fokus (Cusulin et al. 2019).

Die Inhibierung von Notch kommt als Therapiemöglichkeit von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der Zukunft prinzipiell in Frage. Ein wichtiger Schritt zum Einsatz von Notch Inhibitoren ist die Reduktion der Nebenwirkungen.

In verschiedenen Tumoren wurde bereits die unterschiedliche Bedeutung der Rezeptorproteine von Notch hinsichtlich der Prognose und des Outcomes für die Patienten nachgewiesen. Auch in Bezug auf CEDs könnte abnorme Aktivität der verschiedenen Rezeptorproteine eine unterschiedliche Rolle spielen. Notch kann unterschiedliche Aktivitätslevel in den Phasen einer Erkrankung haben. Dies wurde in entzündlichen Erkrankungen wie der Colitis Ulcerosa (Kini et al. 2015), aber auch in malignen Erkrankungen wie dem Cervixkarzinom nachgewiesen (He et al. 2019). Bevor es zum Einsatz eines Notch Inhibitor kommt, sollte das

Aktivitätslevel von Notch und die Expression der einzelnen Rezeptorproteine und Liganden individuell bestimmt werden. Dies kann einer Progredienz der Erkrankung vorbeugen, falls Notch in diesem Fall als Tumorsuppressor fungiert und kann weiterhin Anhalt für die Prognose der Erkrankung geben. Weiterhin könnte die Therapie individuell gestaltet werden.

Im Falle der CEDs könnte Notch Inhibierung individuell bei Caspase8 Verlust eingesetzt werden. Zwar lässt sich nicht endgültig feststellen, ob DBZ als reverser Modulator des Caspase8 Verlustes fungiert, jedoch zeigte sich ein positiver Effekt der DBZ Behandlung von Δ Casp8 Versuchstiere. Da der Notch Signalweg in einem Netzwerk aus Signalwegen fungiert (Jeon et al. 2018), stellt die Inhibierung von Notch keine alleinige Therapie dar, sondern könnte als zusätzliche Therapie, entweder als multitarget Therapie oder als additive Therapie, eingesetzt werden. Nachgewiesen verstärkt die Behandlung mit GSI bspw. die Photosensitivität von Mamma- und Zervixkarzinomzellen (Peng et al. 2018).

Der Notch Signalweg und seine verschiedenen Rezeptorproteine könnten ein mögliches Target in der antientzündlichen und antitumorösen Therapie darstellen, v.a. hinsichtlich der personalisierten Medizin und sollten weiterhin Inhalt der Forschung sein.

5. Zusammenfassung

An der Regulation der Darmschleimhaut sind verschiedene Signalwege beteiligt (bspw. Notch und Wnt). Dysbalancen der Signalwege sowie Regulatoren (z.B. Caspase8) können die Zusammensetzung und Funktion des Epithels verändern und pathologische Vorgänge wie bspw. Enterocolitiden bedingen.

Ziel des Dissertationsverfahrens war es, die Funktionalität der sekretorischen Transdifferenzierung durch Inhibierung des Notch Signalweges (durch DBZ Behandlung) im Hinblick auf Bakterizidie zu untersuchen. Zur Messung der Bakterizidie wurde im Maus- und Zellkulturmodell ein Bakterizitätsassay durchgeführt.

Zur Prüfung der lokoregionären Funktionalität wurde zunächst die Weiser Methode erfolgreich etabliert. Diese Methode lässt eine Separation des Darmepithels entlang der Krypten-Zotten-Achse in Fraktionen (Zotten, apikale Krypten, basale Krypten) zu. Die Charakterisierung der Fraktionen zeigte, dass DBZ erhöhte Bakterizidie im Zottenepithel induziert, ohne abschließenden Hinweis auf den zellulären Ursprung der induzierten Bakterizidie.

Im CaCo2 Zellkulturmodell konnte abhängig von der Inkubationsdauer mit DBZ im wt und CaCo2 Δ Casp8 die Induktion von Bakterizidie gezeigt werden. In Colo320 änderte weder die DBZ noch der Δ Casp8 das bakterielle Wachstum. Die Ergebnisse der Zellkultur zeigten eine mögliche Induktion von Bakterizidie durch DBZ Behandlung, die jedoch eher abhängig von den Eigenschaften und der Differenzierung der Enterozyten als von Caspase8 war.

Zusammenfassend zeigte die Studie, dass die Behandlung mit DBZ Bakterizidie im Maus- und im Zellkulturmodell prinzipiell induzieren kann. Die sekretorische Transdifferenzierung durch DBZ erhöhte im Mausmodell das antimikrobielle Potential. Weiterhin zeigte sich die Tendenz für lokoregionäre Unterschiede entlang der Krypten-Zotten-Achse. Eine Änderung der DBZ abhängigen Induktion von Bakterizidie nach Caspase8 Verlust ließ sich jedoch im Zellkulturmodell nicht reproduzieren.

6. Summary

The regulation of the intestinal epithelia is controlled by several signal pathways (f.e. Notch and Wnt), additional regulators include Caspase8. A disbalance can affect the composition and performance of the epithelia and lead to different pathologies such as intestinal infections.

This dissertation set out to analyse changes to the antibacterial functionality of secretory differentiation after inhibition of the Notch Pathway by treatment with DBZ. Antibacterial functionality was measured by performing an antibacterial assay.

To analyse the antibacterial function after treatment with DBZ in murine intestine the Weiser method was successfully applied, separating the epithelia in three different compartments along the crypt-villus-axis (villi, apical crypts, basal crypts). The study showed an increase in antibacterial functionality in the villi and a difference between the compartments was found, though it gives no clear answer to the cellular origin of the increase.

In CaCo2 DBZ treatment increases the antibacterial functionality in wt and CaCo2 Δ Casp8 dependant on the treatment time. Colo320 showed no change to bacterial growth after DBZ treatment or loss of Caspase8. The results show that DBZ treatment of colonic enterocytes can induce antibacterial functionality, dependant on the characteristics and behaviour of the cells, though not dependant on Caspase8.

In summary, this study showed that DBZ treatment can induce bactericity in mice and cellular culture with characteristics of small intestinal epithelia. The secretory transdifferentiation in mice after DBZ treatment results in increased antimicrobial function. The study showed regional differences of the antibacterial functionality along the crypt-villus-axis, this finding needs to be confirmed in an extension to the performed experiments. Changes to DBZ effect after Δ Casp8 in mice were not shown in CaCo2. It appears that DBZ induced bactericity is dependent on the characteristic and potential of the epithelia.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematischer Aufbau der Darmwand	6
Abb. 2 schematische Darstellung des Dünndarmepithels entlang der Krypten-Zotten-Achse	8
Abb. 3 Vereinfachte schematische Darstellung des Notch Signalweg	11
Abb. 4 Chemische Strukturdarstellung des γ -Sekretase-Inhibitors Dibenzazepine (DBZ)	13
Abb. 5 tabellarisch dargestellter Vergleich von M. Crohn und Colitis ulcerosa .	18
Abb. 6 Graphische Darstellung der Zielsetzung	24
Abb. 7 Übersicht über die verwendeten Zelllinien	31
Abb. 8 tabellarische Darstellung der Fraktionen der Weiser Methode	34
Abb. 9 Wachstum <i>E. coli</i> im CaCo2 Zellkulturmodell über 24h, OD-Messung ..	39
Abb. 10 Wachstum <i>E.coli</i> im CaCo2 Zellkulturmodell über 24h, <i>CFU</i>	40
Abb. 11 Wachstum <i>E. coli</i> im CaCo2 Zellkulturmodell über 48h, OD-Messung.	40
Abb. 12 Wachstum <i>E. coli</i> im CaCo2 Zellkulturmodell über 48h, OD-Messung, getrennte Darstellung	41
Abb. 13 Wachstum <i>E. coli</i> im CaCo2 Zellkulturmodell über 48h, <i>CFU</i>	42
Abb. 14 Wachstum <i>E. coli</i> im CaCo2 Zellkulturmodell über 24h, OD-Messung, ohne DBZ-Behandlung	42
Abb. 15 Wachstum <i>E. coli</i> im Colo320 Zellkulturmodell, OD Messung	44
Abb. 16 Wachstum <i>E. coli</i> im Colo320 Zellkulturmodell, <i>CFU</i>	45
Abb. 17 HE-gefärbte Darmschnitte nach fraktionellem Verdau mittels Weiser-Methode	47
Abb. 18 Wachstum <i>E. coli</i> im Mausmodell durch OD-Messung	48
Abb. 19 Wachstum <i>E. coli</i> im Mausmodell durch OD-Messung, getrennte Darstellung.....	49
Abb. 20 Wachstum <i>E. coli</i> im Mausmodell, <i>CFU</i>	50

8. Literaturverzeichnis

- Ahmed, I., Roy, B.C., Raach, R.T., Owens, S.M., Xia, L., Anant, S., Sampath, V., Umar, S.: Enteric infection coupled with chronic Notch pathway inhibition alters colonic mucus composition leading to dysbiosis, barrier disruption and colitis. *PLoS One* (2018) 13: e0206701
- Algeciras-Schimmich, A., Vlahakis, S.R., Villasis-Keever, A., Gomez, T., Heppelmann, C.J., Bou, G., Paya, C.V.: CCR5 mediates Fas- and caspase-8 dependent apoptosis of both uninfected and HIV infected primary human CD4 T cells. *AIDS* (2002) 16: 1467-1478
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., Stange, E.F.: Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* (2014) 20: 1165-1179
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte E., Spaniel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzinger, L. J., Zilich, H.-G.: *Duale Reihe Anatomie*, 2. Auflage (2010) Georg Thieme Verlag
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouellette, A.J.: Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* (2000) 1: 113-118
- Ayabe, T., Wulff, H., Darmoul, D., Cahalan, M.D., Chandy, K.G., Ouellette, A.J.: Modulation of mouse Paneth cell alpha-defensin secretion by mKCa1, a Ca²⁺-activated, intermediate conductance potassium channel. *The Journal of biological chemistry* (2002) 277: 3793-3800
- Barnhart, B.C., Lee, J.C., Alappat, E.C., Peter, M.E.: The death effector domain protein family. *Oncogene* (2003) 22: 8634-8644
- Becker, S., Oelschlaeger, T.A., Wullaert, A., Vlantis, K., Pasparakis, M., Wehkamp, J., Stange, E.F., Gersemann, M.: Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo. *PLoS One* (2013) 8: e55620
- Böcker, W., W., Denk, H., Heitz, P. U., Moch, H., Höfler, G., Kreipe, H.: *Lehrbuch Pathologie*, 5. Auflage (2012) Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
- Bossuyt, W., Kazanjian, A., De Geest, N., Van Kelst, S., De Hertogh, G., Geboes, K., Boivin, G.P., Luciani, J., Fuks, F., Chuah, M., VandenDriessche, T., Marynen, P., Cools, J., Shroyer, N.F., Hassan, B.A.: Atonal homolog 1 is a tumor suppressor gene. *PLoS Biol* (2009) 7: e39
- Cardoso, A.L., Simoes, S., de Almeida, L.P., Pelisek, J., Culmsee, C., Wagner, E., Pedroso de Lima, M.C.: siRNA delivery by a transferrin-associated lipid-based vector: a non-viral strategy to mediate gene silencing. *J Gene Med* (2007) 9: 170-183
- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.P., Castillo, P.A., de Jong, M.F., Winter, M.G., Winter, S.E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N.H., Underwood, M.A., Tsolis, R.M., Young, G.M., Lu, W., Lehrer, R.I., Baumler, A.J., Bevins, C.L.: Human alpha-defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* (2012) 337: 477-481

- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J.: Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* (2006) 7: 349-359
- Cusulin, C., Wells, I., Badillo, S., Pacheco, G.C.D., Baumann, K., Patsch, C.: Gamma secretase modulators and BACE inhibitors reduce Abeta production without altering gene expression in Alzheimer's disease iPSC-derived neurons and mice. *Mol Cell Neurosci* (2019): 103392
- Date, K., Yamazaki, T., Toyoda, Y., Hoshi, K., Ogawa, H.: alpha-Amylase expressed in human small intestinal epithelial cells is essential for cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* (2020) 121: 1238-1249
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., Roberts, D.J.: Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* (2003) 60: 1322-1332
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J.: A decade of caspases. *Oncogene* (2003) 22: 8543-8567
- Dosh, R.H., Jordan-Mahy, N., Sammon, C., Le Maitre, C.L.: Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev* (2018) 24: 98-111
- Drummond, C.G., Bolock, A.M., Ma, C., Luke, C.J., Good, M., Coyne, C.B.: Enteroviruses infect human enteroids and induce antiviral signaling in a cell lineage-specific manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114: 1672-1677
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (2005) 308: 1635-1638
- Ehehalt, R., Wagenblast, J., Erben, G., Lehmann, W.D., Hinz, U., Merle, U., Stremmel, W.: Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoElectrospray-tandem mass spectrometry. *Scandinavian journal of gastroenterology* (2004) 39: 737-742
- Farooqi, A.A., de la Roche, M., Djamgoz, M.B.A., Siddik, Z.H.: Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Semin Cancer Biol* (2019):
- Fernandez-Majada, V., Aguilera, C., Villanueva, A., Vilardell, F., Robert-Moreno, A., Aytes, A., Real, F.X., Capella, G., Mayo, M.W., Espinosa, L., Bigas, A.: Nuclear IKK activity leads to dysregulated notch-dependent gene expression in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104: 276-281
- Fulda, S., Debatin, K.M.: Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* (2006) 30: 217-223
- Gao, J., Van Meter, M., Lopez, S.H., Chen, G., Huang, Y., Ren, S., Zhao, Q., Rojas, J., Gurer, C., Thurston, G., Kuhnert, F.: Therapeutic targeting of Notch signaling and immune checkpoint blockade in a spontaneous, genetically-heterogeneous mouse model of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Disease models & mechanisms* (2019):

- Gersemann, M., Becker, S., Kubler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., Wehkamp, J., Stange, E.F.: Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* (2009) 77: 84-94
- Gersemann, M., Wehkamp, J., Stange, E.F.: Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* (2012) 271: 421-428
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P.: Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 124: 3-20; quiz 21-22
- Gunther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M.J., Hedrick, S.M., Tenzer, S., Neurath, M.F., Becker, C.: Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* (2011) 477: 335-339
- Harper, J.A., Yuan, J.S., Tan, J.B., Visan, I., Guidos, C.J.: Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* (2003) 64: 461-472
- He, G., Mu, T., Yuan, Y., Yang, W., Zhang, Y., Chen, Q., Bian, M., Pan, Y., Xiang, Q., Chen, Z., Sun, A.: Effects of Notch Signaling Pathway in Cervical Cancer by Curcumin Mediated Photodynamic Therapy and Its Possible Mechanisms in Vitro and in Vivo. *J Cancer* (2019) 10: 4114-4122
- Herold, G.: *Innere Medizin 2016* (2015) Herold
- Jager, S., Stange, E.F., Wehkamp, J.: Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg* (2013) 398: 1-12
- Jeon, M.K., Klaus, C., Kaemmerer, E., Gassler, N.: Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J Gastrointest Pathophysiol* (2013) 4: 94-99
- Jeon, M.K.: Molecular interactions of Caspase-8 and Notch signaling in the regulation of intestinal mucosal barrier. *RWTH Publications* (2015)
- Jiang, C., Cano-Vega, M.A., Yue, F., Kuang, L., Narayanan, N., Uzunalli, G., Merkel, M.P., Kuang, S., Deng, M.: Dibenzazepine-Loaded Nanoparticles Induce Local Browning of White Adipose Tissue to Counteract Obesity. *Mol Ther* (2017) 25: 1718-1729
- Kaemmerer, E., Kuhn, P., Schneider, U., Jeon, M.K., Klaus, C., Schiffer, M., Weisner, D., Liedtke, C., Jakel, J., Kennes, L.N., Hilgers, R.D., Wagner, N., Gassler, N.: Intestinal genetic inactivation of caspase-8 diminishes migration of enterocytes. *World J Gastroenterol* (2015) 21: 4499-4508
- Kim, Y.S., Ho, S.B.: Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* (2010) 12: 319-330
- Kini, A.T., Thangaraj, K.R., Simon, E., Shivappagowdar, A., Thiagarajan, D., Abbas, S., Ramachandran, A., Venkatraman, A.: Aberrant Niche Signaling in the Etiopathogenesis of Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* (2015) 21: 2549-2561
- Kontomanolis, E.N., Kalagasidou, S., Pouliliou, S., Anthoulaki, X., Georgiou, N., Papamanolis, V., Fasoulakis, Z.N.: The Notch Pathway in Breast Cancer Progression. *ScientificWorldJournal* (2018) 2018: 2415489

- Krelin, Y., Zhang, L., Kang, T.B., Appel, E., Kovalenko, A., Wallach, D.: Caspase-8 deficiency facilitates cellular transformation in vitro. *Cell Death Differ* (2008) 15: 1350-1355
- Lai, X.X., Li, G., Lin, B., Yang, H.: Interference of Notch 1 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer cells: Involvement of the betacatenin signaling pathway. *Mol Med Rep* (2018) 17: 2472-2478
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C.: Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* (2005) 24: 5137-5148
- Lawen, A.: Apoptosis-an introduction. *Bioessays* (2003) 25: 888-896
- Lawthom, C., Peltola, J., McMurray, R., Dodd, E., Villanueva, V.: Dibenzazepine Agents in Epilepsy: How Does Eslicarbazepine Acetate Differ? *Neurol Ther* (2018) 7: 195-206
- Liu, Z., Cao, A.T., Cong, Y.: Microbiota regulation of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* (2013) 23: 543-552
- Lüllmann-Rauch, R.: Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage (2009) Georg Thieme Verlag
- Mastrogiovanni, F., Mukhopadhyay, A., Lacetera, N., Ryan, M.T., Romani, A., Bernini, R., Sweeney, T.: Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extracts on In Vitro Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Porcine Colonic Tissue Explants. *Nutrients* (2019) 11:
- McCormick, D.A., Horton, L.W., Mee, A.S.: Mucin depletion in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* (1990) 43: 143-146
- Menke, V., van Es, J.H., de Lau, W., van den Born, M., Kuipers, E.J., Siersema, P.D., de Bruin, R.W., Kusters, J.G., Clevers, H.: Conversion of metaplastic Barrett's epithelium into post-mitotic goblet cells by gamma-secretase inhibition. *Disease models & mechanisms* (2010) 3: 104-110
- Metwally, A.A., Blagbrough, I.S., Mantell, J.M.: Quantitative silencing of EGFP reporter gene by self-assembled siRNA lipoplexes of LinOS and cholesterol. *Mol Pharm* (2012) 9: 3384-3395
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.G., Midtvedt, T., Putsep, K., Andersson, M.: Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* (2008) 57: 764-771
- Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., Ciaccio, P.J.: Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci* (2004) 82: 341-358
- Musio, B., Ragone, R., Todisco, S., Rizzuti, A., Latronico, M., Mastroianni, P., Pontrelli, S., Intini, N., Scapicchio, P., Triggiani, M., Di Noia, T., Acquotti, D., Airoidi, C., Assalg, M., Barge, A., Bateman, L., Benevelli, F., Bertelli, D., Bertocchi, F., Bieliauskas, A., Borioni, A., Caligiani, A., Callone, E., Camra, A., Cesare Marincola, F., Chalasani, D., Consonni, R., Dambruoso, P., Davalli, S., David, T., Diehl, B., Donarski, J., Gil, A.M., Gobetto, R., Goldoni, L., Hamon, E., Harwood, J.S., Kobrlova, A., Longobardi, F., Luisi, R., Mallamace, D., Mammi, S., Martin-Biran, M.,

- Mazzei, P., Mele, A., Milone, S., Molero Vilchez, D., Mulder, R.J., Napoli, C., Ragno, D., Randazzo, A., Rossi, M.C., Rotondo, A., Sackus, A., Saez Barajas, E., Schievano, E., Sitaram, B., Stevanato, L., Takis, P.G., Teipel, J., Thomas, F., Torregiani, E., Valensin, D., Veronesi, M., Warren, J., Wist, J., Zailer-Hafer, E., Zuccaccia, C., Gallo, V.: A community-built calibration system: The case study of quantification of metabolites in grape juice by qNMR spectroscopy. *Talanta* (2020) 214: 120855
- Ntziachristos, P., Lim, J.S., Sage, J., Aifantis, I.: From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell* (2014) 25: 318-334
- O'Hara, A.M., Shanahan, F.: The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* (2006) 7: 688-693
- Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nemoto, Y., Akiyama, J., Nakamura, T., Kanai, T., Watanabe, M.: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2009) 296: G23-35
- Ostaff, M.J., Stange, E.F., Wehkamp, J.: Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* (2013) 5: 1465-1483
- Panaro, M.A., Carofiglio, V., Acquafredda, A., Cavallo, P., Cianciulli, A.: Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. *Br J Nutr* (2012) 108: 1623-1632
- Pantanowitz, L., Wiley, C.A., Demetris, A., Lesniak, A., Ahmed, I., Cable, W., Contis, L., Parwani, A.V.: Experience with multimodality telepathology at the University of Pittsburgh Medical Center. *J Pathol Inform* (2012) 3: 45
- Peng, J.H., Wang, X.L., Ran, L., Song, J.L., Zhang, Z.T., Liu, X., Li, H.Y.: Inhibition of Notch signaling pathway enhanced the radiosensitivity of breast cancer cells. *J Cell Biochem* (2018) 119: 8398-8409
- Petnicki-Ocwieja, T., Hrnčir, T., Liu, Y.J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., Kobayashi, K.S.: Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106: 15813-15818
- Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A., Rhodes, J.: Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* (1994) 35: 353-359
- Rallis, G., Koletsa, T., Saridaki, Z., Manousou, K., Koliou, G.A., Kostopoulos, I., Kotoula, V., Makatsoris, T., Kourea, H.P., Raptou, G., Chrisafi, S., Samantas, E., Papaparaskeva, K., Pazarli, E., Papakostas, P., Kafiri, G., Mauri, D., Papoudou-Bai, A., Christodoulou, C., Petraki, K., Dombros, N., Pectasides, D., Fountzilas, G.: Association of Notch and Hedgehog Pathway Activation With Prognosis in Early-stage Colorectal Cancer. *Anticancer Res* (2019) 39: 2129-2138
- Ramirez Williams, L., Bruggemann, K., Hubert, M., Achmad, N., Kiesel, L., Schafer, S.D., Greve, B., Gotte, M.: Gamma-Secretase inhibition affects

- viability, apoptosis and the stem cell phenotype of endometriotic cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* (2019):
- Reed, C.J.: Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol* (2000) 37: 9-16
- Riccio, O., van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., van Es, J.H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., Radtke, F.: Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep* (2008) 9: 377-383
- Rink, L., Kruse, A., Haase, H.: *Immunologie für Einsteiger*, 2. Auflage (2015) Springer Spektrum
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S.: Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* (2011) 3: 118-134
- Salim, S.Y., Soderholm, J.D.: Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* (2011) 17: 362-381
- Sato, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., Wolfe, M.S.: Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *The Journal of biological chemistry* (2007) 282: 33985-33993
- Shih, A.H., Holland, E.C.: Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia* (2006) 8: 1072-1082
- Sikandar, S.S., Pate, K.T., Anderson, S., Dizon, D., Edwards, R.A., Waterman, M.L., Lipkin, S.M.: NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer Res* (2010) 70: 1469-1478
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P.: *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105: 16731-16736
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., Dore, J.: Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* (2009) 15: 1183-1189
- Spagnou, S., Miller, A.D., Keller, M.: Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* (2004) 43: 13348-13356
- Stange, E.F., Wehkamp, J.: Recent advances in understanding and managing Crohn's disease. *F1000Res* (2016) 5: 2896
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., Lochs, H.: Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (2002) 122: 44-54

- Tan, G., Zeng, B., Zhi, F.C.: Regulation of human enteric alpha-defensins by NOD2 in the Paneth cell lineage. *Eur J Cell Biol* (2015) 94: 60-66
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A.: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* (2015) 65: 87-108
- Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Possemiers, S.: The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev* (2011) 35: 681-704
- van Es, J.H., de Geest, N., van de Born, M., Clevers, H., Hassan, B.A.: Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nature communications* (2010) 1: 18
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., Clevers, H.: Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* (2005) 435: 959-963
- VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, A., Grosse, A.S., Gumucio, D.L., Ernst, S.A., Tsai, Y.H., Dempsey, P.J., Samuelson, L.C.: Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* (2012) 139: 488-497
- Veenendaal, L.M., Kranenburg, O., Smakman, N., Klomp, A., Borel Rinkes, I.H., van Diest, P.J.: Differential Notch and TGFbeta signaling in primary colorectal tumors and their corresponding metastases. *Cell Oncol* (2008) 30: 1-11
- Vinson, K.E., George, D.C., Fender, A.W., Bertrand, F.E., Sigounas, G.: The Notch pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer* (2016) 138: 1835-1842
- Vooijs, M., Liu, Z., Kopan, R.: Notch: architect, landscaper, and guardian of the intestine. *Gastroenterology* (2011) 141: 448-459
- Wan Mohamad Zain, W., Bowen, J., Bateman, E., Keefe, D.: Cytotoxic Effects of the Dual ErbB Tyrosine Kinase Inhibitor, Lapatinib, on Walker 256 Rat Breast Tumour and IEC-6 Rat Normal Small Intestinal Cell Lines. *Biomedicines* (2019) 8:
- Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D.O., Florin, T.H.: Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol* (2003) 95: 508-520
- Watson, C.L., Mahe, M.M., Munera, J., Howell, J.C., Sundaram, N., Poling, H.M., Schweitzer, J.I., Vallance, J.E., Mayhew, C.N., Sun, Y., Grabowski, G., Finkbeiner, S.R., Spence, J.R., Shroyer, N.F., Wells, J.M., Helmrath, M.A.: An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* (2014) 20: 1310-1314
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F.: NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* (2004) 53: 1658-1664

- Wells, J.M., Rossi, O., Meijerink, M., van Baarlen, P.: Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108 Suppl 1: 4607-4614
- Witthoft, T., Pilz, C. S., Fellermann, K., Nitschke, M., Stange, E.F., Ludwig, D.: Enhanced human beta-defensin-2 (hBD-2) expression by corticosteroids is independent of NF-kappaB in colonic epithelial cells (CaCo2). *Dig Dis Sci* (2005) 50: 1252-1259
- Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.J., Zhang, L., Higgins, G.A., Parker, E.M.: Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* (2004) 279: 12876-12882
- Yokoi, Y., Nakamura, K., Yoneda, T., Kikuchi, M., Sugimoto, R., Shimizu, Y., Ayabe, T.: Paneth cell granule dynamics on secretory responses to bacterial stimuli in enteroids. *Sci Rep* (2019) 9: 2710
- Yu, S., Tong, K., Zhao, Y., Balasubramanian, I., Yap, G. S., Ferraris, R. P., Bonder, E. M., Verzi, M. P., Gao, N.: Paneth Cell Multipotency Induced by Notch Activation following Injury. *Cell Stem Cell* (2018) 23: 46-59 e5
- Zheng, X., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Iwasaki, M., Kano, Y., Sakamoto, N., Nakamura, T., Watanabe, M.: Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* (2011) 17: 2251-2260

9. Danksagung

Zunächst möchte ich besonders Herrn Univ. Prof. Dr. N. Gaßler danken. Neben der Bereitstellung des Themas und der zugehörigen Mittel, stand er mir mit seinem Wissen, Motivation und Begeisterungsfähigkeit stets mit Rat und Tat zu Seite. Vielen Dank für die Geduld und Ihre herzliche, inspirierende Art.

Weiterhin möchte ich Dr. rer. nat. Min Kyung Jeon als meine Betreuerin für die Ein- und Mitarbeit am gemeinsamen Thema danken, ohne die die Durchführung des experimentellen Teils nicht erfolgen hätte können. Dr. rer. nat. Christina Klaus möchte ich für wissenschaftliche Zusammenarbeit und konstruktive Kritik danken, durch die ich meine Arbeit weiter verbessern konnte. Außerdem danke ich Ursula Schneider aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe für die Mithilfe bei der Etablierung der Weise-Methode und ihre Motivation.

Dem Institut für Pathologie der Uniklinik RWTH Aachen unter der Leitung von Frau Univ. Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke möchte ich für die Möglichkeit und die Mittel zur Durchführung der Arbeit und einer spannenden Famulatur danken.

Ein weiterer Dank geht an Dr. rer. nat. Eveline Bennek und der Klinik der Gastroenterologie des Uniklinikums Aachen für die Mithilfe und technische Umsetzung des Bakterisitätsassays.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden für die Liebe, die sie mir mit auf den Weg gegeben haben. Sie waren mir bei der Erstellung dieser Dissertation ein Antrieb und geduldiger Rückhalt.

10. Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- in dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen

hinterlegt sind.

11. Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Danika Weisner an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Dibenzazepin assoziierte sekretorische Transformation und Bakterizidie enterozytärer Zellen“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

	Doktor- andin Danika Weisner	Dr. rer. nat. Min Kyung Jeon	Dr. rer. nat. Christina Klaus	Dr. rer. nat. Eveline Bennek	Ursula Schneider	Univ. Prof. Dr. Gaßler	Summe (%)
Studienüberwachung		30				70	100
Studiendesign/Konze ption	20	30				50	100
Bereitstellung von Materialien		50	20	10		20	100
Probengewinnung Zellkultur	60	20			20		100
Probengewinnung Tiermodell	50	30			20		100
Weiser Methode	70	10			20		100
Bakterizitäts Assay	80			20			100
Statistische Auswertung	100						100
Datenauswertung	100						100
Interpretation der Datenauswertung	50	10	10			30	100

Unterschrift der Doktorandin Danika Weisner

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frau Danika Weisner

Unterschrift des Doktorvaters Univ. Prof. Dr. Gaßler

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Danika Weisner *26.04.1991
Adresse	Mansteinstr. 12 20253 Hamburg
Telefon	0049 176 76135798
Email	danika.weisner@gmail.com

Berufserfahrung

Weiterbildung

Seit 09/2019	Gynäkologie und Geburtshilfe, Städtisches Klinikum Lüneburg
05/2017-06/2019	Gynäkologie und Geburtshilfe, GFO Kliniken Rhein-Berg, Standort Vinzenz Pallotti Hospital Bensberg

Praktisches Jahr

06/2016-10/2016	Gynäkologie und Geburtshilfe, Luisenhospital Aachen
03/2016-06/2016	Allgemeinchirurgie, Hôpital Saint Vincent de Paul Lille, Frankreich
11/2015-03/2016	Innere Medizin, a.ö. Krankenhaus St. Johann in Tirol, Österreich

Ausbildung

11/2016	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, RWTH Aachen Note: 1,0
10/2015	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, RWTH Aachen Note: 2,0
seit 10/2013	Dissertation am Institut für Pathologie, Universitätsklinik Aachen Titel: „Caspase-8 abhängige Modifikation der DBZ-induzierten intestinalen Sekretion“ Betreuer : Prof. Dr. med. N. Gassler, Prof. Dr. med. R. Knüchel-Clarke
09/2013	Ärztliche Basisprüfung, 1. Staatsexamen, RWTH Aachen Note: 3,0
seit 10/2010	Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen

04/2010

Allgemeine Hochschulreife, Goethe Gymnasium
Dortmund
Note: 1,3

Hamburg, 29. November 2022

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "D. Weisw".