

**AUS DEM INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
DIREKTOR: PROF. DR. MED.
CHRISTIAN SINA**

**REGULATION DER EPITHELIALEN EXPRESSION DES KOMPLEMENTFAKTORS
C3 IM INTESTINUM – RELEVANZ FÜR DIE PATHOPHYSIOLOGIE VON
CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN DARMERKRANKUNGEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Karen Ebbert
aus Coesfeld

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sina

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Luhm

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.06.2017

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die intestinale Mukosa	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.2 Mukus als Schutzsystem des intestinalen Epithels	2
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.2.1 Epidemiologie	3
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.2.3 Klinik und Morphologie	6
1.2.4 Therapie.....	7
1.3 Das Komplementsystem	8
1.3.1 Aufbau und Aktivierungskaskaden	8
1.3.2 Effektormechanismen	10
1.3.3 C3-Fragmente, deren Funktion und Rezeptoren	11
1.3.4 Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren	13
1.3.5 Komplement-regulierende Proteine.....	14
1.3.6 Synergismus von Komplement und Toll-like Rezeptoren	15
1.4 Komplement und CED	17
1.4.1 Komplement im Intestinum.....	17
1.4.2 Komplement und CED.....	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Zellkulturexperimente	21
2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zelllinien.....	21
2.1.2 Zellzahlbestimmung.....	21
2.1.3 Isolierung intestinaler Epithelzellen	22
2.1.4 Stimulationsexperimente	22
2.2 Genexpressionsanalyse	23
2.2.1 RNA-Isolierung aus der Zellkultur und Bestimmung der RNA-Konzentration	23

2.2.2	cDNA-Synthese	23
2.2.3	Quantitative Real-Time PCR	24
2.2.4	Semiquantitative Reverse-Transkriptase PCR.....	25
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.3	DSS-Versuch.....	26
2.3.1	Versuchsaufbau Dextran-Sulfat Natrium (DSS)	26
2.3.2	Histologische Darmpräparate.....	27
2.3.3	Immunhistochemie (IHC).....	28
2.3.4	Erhebung der Entzündungsaktivität	29
2.3.5	Konservierung der Mukosa-assoziierten Bakterien	30
2.4	Western Blot.....	30
2.5	Durchflusszytometrie	31
2.6	Statistik.....	32
3.	Ergebnisse.....	33
3.1	IEC-1 und Mode-K exprimieren hauptsächlich C3 auf mRNA-Ebene	33
3.2	Murine intestinale Epithelzelllinie IEC-1 exprimiert C3 stärker als C5.....	35
3.3	Murine intestinale Epithelzelllinie Mode-K exprimiert C3 stärker als C5	36
3.4	C3 mRNA Expression in IEC-1 wird durch LPS Stimulation gesteigert	37
3.5	Expression von TLR auf IEC-1 und Mode-K.....	39
3.6	LPS stimuliert die C3-Proteinexpression in IEC-1.....	40
3.7	Isolation von primären intestinalen Epithelzellen (pIEZ) der Maus	41
3.8	pIEZ exprimieren C3 und Komplementrezeptoren auf RNA-Ebene.....	42
3.9	LPS Stimulation erhöht die C3-Expression in pIEZ	45
3.10	pIEZ der DSS-Mäuse exprimieren mehr C3 als pIEZ der Kontrollmäuse	45
3.11	Stärkere C3 Expression im Darm der DSS-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen	47
4	Diskussion.....	50
4.1	Murine Epithelzelllinien und primäre IEZ exprimieren Komplementfaktoren	50
4.2	Die Expression von C3 ist durch Lipopolysaccharide (LPS) stimulierbar	52
4.3	Primäre IEZ der DSS-Versuchstiere exprimieren mehr C3 als pIEZ der Kontrollmäuse	54
4.4	Gesteigerte C3-Spaltung und C3b-Deposition auf MAB in DSS-Versuchstieren.....	55
4.5	Limitation und Ausblick.....	57
5	Zusammenfassung	59
6	Materialliste	60
6.1	Chemikalien	60

6.2	Zellkultur- und Verbrauchsmaterialien	63
6.3	Medien und Puffer	64
6.4	Antikörper, Primer	66
6.4.1	Antikörper.....	66
6.4.2	Primer	67
6.5	Kits	69
6.6	Geräte und Auswertungsprogramme	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Danksagung	83
9	Lebenslauf	84

Abkürzungen

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
5-ASA	5-Aminosalizylate
AP	Alternativer Weg (engl. alternative pathway)
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATG16L	engl. autophagy-related 16-like 1 proteine complex
C1q-C9	Komplementfaktor
CD55, CD46	engl. cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFB (fB)	Komplementfaktor B
CP	Klassischer Weg (engl. classical pathway)
CR1-4, CR1g	Komplementrezeptor
CU	Colitis Ulcerosa
DAF	engl. Decay accelerating factor
DAMP	engl. danger associated molecular pattern
DGVS	Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSS	sulfatiertes Natriumsalz der Dextrane
ERK1/2	engl. extracellular signal-regulated protein kinase 1/2
FC	Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry)
fB, fD, fH	Komplementfaktor B, D, H
FMT	Stuhltransplantation (engl. fecal microbiota transplantation)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
IEC-1	intestinale Epithelzelllinie 1
IEZ	intestinale Epithelzellen
IFN-γ	Interferon gamma

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IFN-3	engl. Interferon regulary factor 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LP	Lektin-vermittelter Weg (engl. lectin pathway)
LPS	Lipopolysaccharide
MAB	mukosa-assoziierte Bakterien
MAC	Membrane Attack Complex
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MC	Morbus Crohn
MCP	engl. membrane cofactor protein
Mode-K	<i>murine duodenal Epithelial cell-clone K</i>
mRNA	engl. messenger ribonucleid acid
MUC2	Protein Mucin 2
MyD-88	engl. myeloid differentiation primary-response protein 88
NF-κB	engl. nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOD1/2	engl. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2
PAMP	engl. pathogen associated molecular pattern
PLC	Phospholipase C
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PRR	engl. pattern-recognition receptors
RT-PCR	engl. real time polymerase chain reaction
TCC	Terminaler Komplement Komplex
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
UE	Untereinheit
v/v, w/v	engl. volume/volume, weight/volume
WB	Western Blot

1 Einleitung

Das Komplementsystem ist als Teil des angeborenen Immunsystems unter anderem für die Kontrolle von Infektionen des Blutsystems verantwortlich und verhindert deren systemische Ausbreitung. Diese Funktionen des Komplementsystems sind bereits gut erforscht. Im Blut und in Organgewebe vermittelt das Komplement eine Immunstimulation. Es fördert die Abwehr von Bakterien und apoptotischen sowie maligne-entarteten Zellen durch deren Opsonisierung und durch die Produktion von Anaphylatoxinen. Auch kann es direkt die Lyse von Bakterien induzieren. Im Rahmen von intestinalen Entzündungs- und Infektionsprozessen ist erst wenig über das Komplement und seine Funktion in Epithelzellen bekannt. Eine erhöhte Konzentration von Komplementfaktoren in Epithelzellen von Patienten, die an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) leiden, weist auf eine Beteiligung des Komplements im Rahmen der Pathophysiologie dieser Erkrankungen hin [1, 61]. So veröffentlichte die Arbeitsgruppe um *Brandtzaeg et al.* bereits 1990 und 1998 Versuchsergebnisse, die eine erhöhte Produktion von Komplementfaktoren und -regulatoren im Rahmen von CED aufzeigen [10, 38].

1.1 Die intestinale Mukosa

1.1.1 Aufbau und Funktion

Als intestinales Hohlorgan besteht der Darm aus vier konzentrischen Schichten. Von luminal nach außen sind dies die Tunica mucosa (kurz: Mukosa), Tela submucosa, Tunica muscularis mit je einer äußeren Längs- und inneren Ringschicht und die Tunica serosa (kurz: Serosa) in intraperitonealen Darmabschnitten, beziehungsweise die Tunica adventitia in extraperitoneal gelegenen Darmabschnitten [118].

Die Mukosa teilt sich wiederum in drei Schichten. Die Lamina epithelialis mucosae variiert in Funktion und Aufbau in den einzelnen Darmabschnitten. Sie grenzt sich durch die Basalmembran zur darunterliegenden Lamina propria mucosae ab. Die Lamina propria mucosae

macht den größten Teil der Mukosa aus und besteht aus einem lockeren Bindegewebe, welches von Kapillaren, Lymphgefäßen, Nerven und Fibrozyten durchsetzt ist [34]. Auch die Lamina muscularis mucosae variiert in ihrer Ausprägung innerhalb der verschiedenen Darmabschnitte und bei jedem Individuum. Ihre glatten Muskelzellen, die meist außen längs und innen zirkulär verlaufen, ermöglichen der Mukosa eine eigene Beweglichkeit. Durch Ausbildung von Falten (Plicae circularis), Zotten (Villi) und Mikrovilli vergrößert sich die intestinale Schleimhaut insgesamt auf eine resorbierende Oberfläche von bis zu 400 m². Zwischen den Zotten münden tubuläre Einsenkungen der Mukosa, sogenannte Krypten [23, 84]. Die Vergrößerung der Resorptionsfläche dient der verbesserten Nährstoffaufnahme aus dem Lumen des Darms in die Zirkulation und der Regulation des Wasser- und Elektrolytaustauschs [118].

1.1.2 Mukus als Schutzsystem des intestinalen Epithels

Das Epithel ist von einer Mukusschicht überzogen. Diese wird von den Becherzellen des Epithels gebildet und setzt sich aus Glykoproteinen, Phospholipiden und Lipidmediatoren zusammen. Entscheidend für die gallertartige Konsistenz und die wichtigsten Eigenschaften des Mukus sind Proteine; eines der Bedeutsamsten ist das Protein Mucin 2 (MUC2). Durch den Reichtum an den Aminosäuren Prolin, Threonin und Serin (PTS-Domäne) fungieren sie als Bindungsstelle für O-Glykane [53, 60]. Diese verleihen den Muzindomänen eine Resistenz gegenüber Proteasen und dienen als Energiequelle für kommensale Bakterien. Die Glykane machen insgesamt etwa 80% des Mukus aus und erhöhen dessen Wasserbindungskapazität. Die Bakterien produzieren kurzkettige Fettsäuren aus Monosacchariden. Diese diffundieren durch den Mukus zum Epithel und fungieren als Energiequelle [56].

Im Kolon bildet der Mukus zwei Schichten. Die luminale Schicht variiert stark in ihrer Ausdehnung, abhängig von der Proteaseaktivität. Durch die Ausdehnung gelangen endogene Bakterien in den Mukus, welcher hier einen Lebensraum für die intestinale Mikrobiota darstellt. Die innere, also am Epithel gelegene Schicht des Mukus, ist beim Menschen etwa 200 µm dick und unter physiologischen Bedingungen frei von Bakterien. Sie dient dem Kolon somit als „Barriere“ zwischen der luminalen, bakterienreichen Schicht und dem Epithel und gestattet einen möglichst distanzierten Abtransport der Bakterien [41, 53].

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) handelt es sich um meist schubweise über Jahrzehnte verlaufende chronische Entzündungen des Darms. Der Morbus Crohn (MC) und die Colitis Ulcerosa (CU) bilden die beiden Hauptgruppen der CED. Während die CU auf das Rektum und das Kolon beschränkt bleibt, kann der MC den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen. Am häufigsten tritt er im Ileum und im Kolon auf [28].

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des MC liegt etwa bei 6,6 und die der CU liegt etwa bei 3,9/100.000 Einwohnern in Deutschland [77]. Während beide Erkrankungen weltweit vorkommen, liegt die Prävalenz in westlichen Industrieländern mit 100-200 (MC) bzw. 160-250/100.000 Einwohnern/Jahr (CU) am höchsten [64]. Ein Nord-Süd-Gefälle sowie ein Ost-West-Gefälle sind zu bemerken [99]. Die beiden Erkrankungen können in jedem Alter auftreten, es besteht jedoch eine bimodale Altersverteilung. Zwischen dem 15. und dem 30. Lebensjahr zeigt sich ein erster Manifestationsgipfel und zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr ein zweiter, schwächerer Gipfel. Etwa 10% der Fälle manifestieren sich vor dem 18. Lebensjahr [4]. Während die Geschlechterverteilung bei der CU in etwa ausgeglichen ist, sind Frauen von MC etwas häufiger betroffen (Verhältnis weiblich zu männlich: 1,1-1,8:1) [40, 64].

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Obwohl das Krankheitsbild der CED seit dem 19. Jahrhundert bekannt ist, ist die Ätiopathogenese noch weitgehend unverstanden. Das derzeitige Modell geht von einer multifaktoriellen Genese aus. So komme es, bei gegebener genetischer Prädisposition, durch verschiedene Umweltfaktoren zu einer überschießenden Immunreaktion [40].

Neben dem Auftreten einer familiären und ethnischen Häufung von CED, weisen auch verschiedene Zwillingsstudien auf eine genetische Prädisposition hin [64]. So konnte eine erhöhte Konkordanz im Auftreten von CED bei monozygoten Zwillingen im Vergleich zu dizygoten Zwillingen aufgezeigt werden [37, 76]. Bei der CU fällt die Konkordanz mit 18% niedriger aus als bei MC mit 58% [76]. Das NOD2 Gen (engl. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) wurde als Suszeptibilitäts-gen für die Entstehung von Morbus Crohn auf Chromosom 16 identifiziert [50, 73].

Das Protein Nod2 gehört zu der Familie der pattern-recognition receptors (PRRs), zu denen auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gezählt werden. Die genetischen Varianten, die in Bezug auf die Pathogenese des MCs gefunden wurden, weisen auf eine Bedeutung des angeborenen Immunsystems, der Autophagie und Phagozytose hin. Nod2 ermöglicht über Aktivierung des für Entzündungsreaktionen entscheidenden Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) eine adäquate Immunreaktion [50, 73]. Eine Vielzahl weiterer Gen-Loci, die bei CED verändert sein können, konnte darüber hinaus identifiziert werden [55, 72]. So wird auch ein Polymorphismus im autophagy-related 16-like 1 proteine complex (engl., ATG16L) nachweislich mit einer Suszeptibilität für MC in Verbindung gebracht. Das veränderte Protein führt zu einer gestörten Autophagie in Epithelzellen des Darms und ist somit mitverantwortlich für die intestinale Inflammation [72].

Des Weiteren geht man bei CED von einer chronischen Dysregulation des Immunsystems aus, sodass es zu einer genetisch beeinflussten, inadäquaten Immunreaktion auf einen endogenen Stimulus der Darmflora kommt. Durch die gestörte Immunregulation kommt es dauerhaft zu einer Entzündungsreaktion, die zu lokaler Gewebsschädigung mit Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen führt. Ein Faktor der intestinalen Immunität besteht in anatomischen Besonderheiten (z.B. epitheliale Tight Junctions), die unter physiologischen Bedingungen eine Penetration von Makromolekülen und Bakterien in die Mukosa verhindern. Immunzellen regulieren diese Verbindungen durch verschiedene Zytokine (TNF α , IL-17, IFN γ) [120]. Eine gestörte intestinale Permeabilität tritt bei vielen erstgradigen Verwandten von MC Patienten auf, die selber nicht erkrankt sind [14, 81, 101].

Das Epithel steht zudem in ständiger Kommunikation mit der luminalen Flora und dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Diese Translation erfolgt über TLR, Nod1 und 2 und Rezeptoren für Chemokine, die durch die intestinalen Epithelzellen exprimiert werden [16,

46, 121]. In diesem Zusammenhang scheint die epithelzellspezifische Aktivierung bzw. Suppression des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems bei CED zu spielen. Die Unterscheidung zwischen pathogenen und körpereigenen Strukturen durch diese Rezeptoren konnte bei autoimmunologischen Erkrankungen als ein entscheidender Faktor der Pathogenese identifiziert werden [75, 124].

Veränderungen des Mukus können ebenfalls Einfluss auf die intestinale Immunität nehmen. So zeigen MUC2-defiziente Mäuse häufiger eine spontane Kolitis als Kontrollmäuse [108]. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen weisen zudem auf ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von MC bei Defizienz der Paneth-Zellen und eine protektive Rolle der Becherzellen hin [66, 94, 122]. In CED verliert der Mukus an Protektivität gegenüber der mikrobiellen Darmflora und führt daher zu einer gesteigerten Konzentration luminaler Bakterien im Mukus [84, 96].

Neben genetischen Prädispositionen und einer gestörten intestinalen Immunabwehr gelten verschiedene Umweltfaktoren als Risikofaktoren für die Entwicklung einer CED. So zeigt sich unter Rauchern ein mehr als zweifach erhöhtes Erkrankungsrisiko für MC im Vergleich zu Nichtrauchern sowie eine erhöhte postoperative Rezidivrate. Bei der CU scheint der Nikotinkonsum dagegen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Krankheit zu erzielen. Auch auf bereits aufgetretene Symptome zeigte das Rauchen einen mildernden Einfluss [28, 64, 107].

Eine stattgefunden Appendektomie ist ebenfalls protektiv für die Entwicklung einer CU. Studien weisen gleichzeitig jedoch auf ein erhöhtes Risiko für MC hin. Eine Verwechslung des frühen MC mit einer Appendizitis ist ein mögliches Erklärungsmodell für diese Ergebnisse [64].

Kontroverse Studienergebnisse gibt es zur Hypothese, dass die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva das Risiko einer Entwicklung von CED erhöht. Zusammenfassend zeichnet sich ein schwacher Einfluss der oralen Kontrazeptiva auf die Krankheitsentwicklung ab [64].

Die Epidemiologie weist eine erhöhte Inzidenz von CED in westlichen Industrienationen auf. Erklärungsmodelle dieser Entwicklung zielen auf die westliche zuckerreiche Ernährung sowie den hohen hygienischen Standard ab [59, 64]. Studien zu diesen Themen können bisher allerdings keine abschließende Bewertung vorweisen [64].

1.2.3 Klinik und Morphologie

Bei Morbus Crohn kommt es zu einer transmuralen Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes, die typischerweise ein diskontinuierliches und segmentales Verteilungsmuster (sog. „skip lesions“) aufzeigt. Am häufigsten sind das terminale Ileum und das Kolon betroffen, aber auch der Befall des gesamten Gastrointestinaltraktes ist möglich. Endoskopisch zeigt sich ein Pflastersteinrelief, welches sich aus scharf begrenzten, tiefen Ulzerationen bildet, die von gesunden Mukosaabschnitten umgeben sind. Außerdem bilden sich nicht-verkäsende Epitheloidzellgranulome aus aggregierenden Makrophagen [13, 28].

Die Colitis Ulcerosa bleibt dagegen auf das Kolon beschränkt, wobei das Rektum stets betroffen ist und es zu einer Ausbreitung der Entzündung von aboral nach oral kommt. Auch distale Dünndarmabschnitte können betroffen sein, eine sogenannte „Backwash-Ileitis“. Die kontinuierliche Entzündung der CU zeigt sich endoskopisch durch unscharf begrenzte, flache Ulzerationen und die Ausbildung von Pseudopolypen. Das histologische Bild der CU ist gekennzeichnet durch Läsionen der Mukosa und Submukosa, wie z.B. Becherzellschwund, Epithelzeldysplasien und Kryptenabszesse. Auch das entzündliche Infiltrat aus vornehmlich Neutrophilen bleibt auf die Lamina propria beschränkt [13, 28].

Die Klinik beider Erkrankungen manifestiert sich mit Fieber, Gewichtsverlust, Tenesmen und rezidivierenden Diarrhöen mit bis zu 30 Stühlen pro Tag, die im Fall der CU blutig sein können. In 25-40% der Fälle treten extraintestinale Manifestationen, wie z.B. CED-assoziierte Spondyloarthritiden (1-26%) und muskuloskelettale Schmerzen (9-53%), Nierenerkrankungen (v.a. Nephrolithiasis, 6-23%), dermale Manifestationen (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Psoriasis, Stomatitis aphthosa, 2-34%), okuläre Entzündungen (z.B. Uveitis, 0,3-5%) oder hepatobiliäre Komplikationen auf. Insgesamt treten extraintestinale Manifestationen bei MC häufiger auf als bei der CU. Eine primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist dagegen häufiger mit der CU assoziiert [9].

Der MC beginnt oft schleichend und verläuft schubweise mit inkompletter Remission. Als Komplikation entstehen in etwa 30% der Fälle Stenosen, Fisteln, Abszesse und Strikturen durch entzündliche und fibrosierende Wandveränderungen [9].

Die CU beginnt dagegen oft akut, verläuft ebenfalls in Schüben, kann aber auch komplett remittieren. Als Komplikationen können das toxische Megakolon (5% der akuten Erkrankungen) und letal bedrohliche Blutungen auftreten [89]. In Abhängigkeit des Befallsmusters, der entzündlichen Aktivität und der Dauer der Erkrankung besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Kolonkarzinomen und hepatobiliären Malignomen [8, 26].

1.2.4 Therapie

Die konservative Therapie beider Erkrankungen besteht im Wesentlichen aus antiinflammatorischen und immunsupprimierenden bzw. -modulierenden Medikamenten [28].

Abhängig von der Entzündungsaktivität und -lokalisierung empfiehlt die aktuelle Therapieleitlinie der Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) bei MC eine initiale Behandlung mit lokal oder systemisch wirksamen Glukokortikoiden. Kommt es zu Komplikationen mit bakterieller Komponente, wie z.B. Fisteln oder Abszessen, werden begleitend Antibiotika eingesetzt. Für den Morbus Crohn besteht keine kausale Therapie, sodass lediglich eine symptomatische Behandlung zur Verfügung steht, die eine möglichst lange Beschwerdefreiheit des Patienten und eine Regeneration der Mukosa ermöglichen soll. Operationen, die bei schweren Komplikationen, wie z.B. Strikturen und Fisteln indiziert sind, werden nur sehr restriktiv durchgeführt [28, 86].

Zur Therapie des akuten Schubs der CU empfiehlt die DGVS den Einsatz von 5-Aminosalizylaten (5-ASA). Auch zur Remissionserhaltung werden 5-ASA-haltige Präparate verwendet. Bei schwerwiegenden und therapierefraktären Entzündungen ist eine systemische Glukokortikoidtherapie indiziert. Azathioprin, Ciclosporin A, TNF α -Antagonisten, Vedolizumab und Tacrolimus bieten Alternativen zur immunsuppressiven Therapie mit Steroiden [86, 87]. Die Colitis Ulcerosa kann durch eine totale Proktokolektomie bedingt kurativ behandelt werden. Im Anschluss an die Operation kommt es in 37,5% der Fälle zur Entwicklung einer Pouchitis [80]. Extraintestinale Manifestationen können durch diese Operation nicht behandelt werden.

Uneinheitliche Studienergebnisse gibt es derzeit über Probiotika (*E. coli Nissle*, *Lactobacillus GG* und *Saccharomyces boulardii*) als mögliche Therapieoption bei CED. Zur Remissionserhaltung der CU können *E. coli Nissle* appliziert werden, stellen aber eine weniger wirksame Alternative zur konservativen Therapie dar. Der Einsatz von Probiotika im Rahmen der MC-Therapie zeigte bisher nur wenige positive Effekte [49, 86]. Auch Stuhltransplantationen (engl. fecal microbiota transplantation, FMT), wie sie im Rahmen von *Clostridium difficile* Infektionen bereits durchgeführt werden, führten in Studien bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen [65].

1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Teil der antimikrobiellen Abwehr und trägt entscheidend zur Kontrolle der immunologischen Homöostase bei. Seine Aufgaben bestehen in der Elimination von Zelldetritus und infektiösen Mikroben, der Organisation der Immunantwort durch Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems und der Aussendung wichtiger Alarmsignale zum Schutz des Organismus. Kommt es allerdings zum Verlust der Kontrolle, sind eine Überaktivierung des Immunsystems und eine Wendung gegen eigene, gesunde Zellen möglich. Ein dysfunktionales Komplementsystem ist als Teilaspekt in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder des Asthmas bereits beschrieben [91, 124].

1.3.1 Aufbau und Aktivierungskaskaden

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Proteinen, die hepatisch, durch Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten und in endothelialen und epithelialen Zellen gebildet werden [2]. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt durch das Erkennen von Pathogenen, welches über drei verschiedene Wege erfolgen kann (**Abbildung 1**): über den klassischen Weg (engl. classical pathway, CP) (C1q-vermittelt), den Lektin-vermittelten Weg (engl. lectin pathway, LP) und den alternativen Weg (engl. alternative pathway, AP) via autoaktiviertem C3 [113].

Der CP wird auch als Antikörper-abhängiger Weg beschrieben, da er durch die Bindung von IgM oder IgG an das Antigen initiiert werden kann. Der Komplementfaktor C1q erkennt den Fc-Teil der Antikörper, kann aber als vielseitiges pattern recognition molecule (PRM) auch bestimmte Strukturen direkt auf den mikrobiellen oder apoptotischen Zellen erkennen. Auch endogene PRMs, wie zum Beispiel das C-reaktive Protein (CRP) können durch Bindung von Antigenen zu einer antikörperunabhängigen C1q-Bindung führen. Durch die Oberflächenbindung von C1q kommt es zur Aktivierung der Proteasen C1r und C1s [31, 112]. C1s spaltet den Komplementfaktor C4 in C4a und C4b, sodass eine Thioesterbindung freigelegt wird, welche die kovalente Bindung von C4b an Oberflächen in unmittelbarer Umgebung der Aktivierungsseiten und somit Opsonierung ermöglicht. Kommt es zur Bindung des Komplementfaktors C2 an C4b, so wird dieser in C2a und C2b gespalten und es entsteht die C3-Konvertase (C4b2b) [91].

In der Kaskade des LPs fungieren Mannose-bindendes Lektin (MBL) und Fikolin als PRM, die insbesondere bakterielle Polysaccharide erkennen. Jedes PRM ist mit einer MBL-assoziierten Serinprotease (MASP) verknüpft, welche ähnlich aufgebaut ist wie C1s/C1r. Es wird dabei zwischen einer MASP-1 und einer MASP-2 unterschieden. Letztere spaltet sowohl C2, als auch C4 und bildet auf diese Weise, wie im klassischen Weg antikörperunabhängig eine C3-Konvertase. Die MASP-1 hat lediglich die Fähigkeit zur C2-Spaltung [22, 88].

Der AP hält das Komplementsystem durchgehend in Alarmbereitschaft und ermöglicht eine kontinuierliche Überprüfung von Zellen [11, 79]. Das native C3 ist inert und hat nur wenige Liganden. Durch Hydrolyse entsteht $C3_{H_2O}$, welches neue Bindungsstellen bereithält. An diese kann die Protease Faktor B (fB, CFB) binden. Durch Faktor D (fD) kommt es zur Spaltung von fB (CFB) und somit zur Bildung einer C3-Konvertase, die insbesondere in einer löslichen Form vorliegt ($C3_{H_2O}Bb$). Auch Properdin (P) erkennt molekulare Muster, die mit Pathogenen oder Zellschaden assoziiert sind (pathogen associated molecular patterns (PAMP) und danger associated molecular patterns (DAMP)) und zieht durch deren Bindung lösliches C3b an, sodass es zur de novo Synthese einer weiteren C3-Konvertase (C3bBbP) auf den opsonierten Zielzellen kommt [103].

Alle drei Wege zur Initiierung der Komplementkaskade enden in der Formation einer C3-Konvertase (AP: C3bBb; LP/CP: C4bC2b).

1.3.2 Effektormechanismen

Die C3-Konvertasen spalten den Komplementfaktor C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b. Das Spaltprodukt C3b dient dem Komplementsystem zudem als Amplifikationsfaktor. Über den AP ermöglichen alle oberflächengebundenen C3-Konvertasen die Amplifikation, da sie alle C3b bilden und dieses, in Anwesenheit von fB (CFB) und fD, direkt zur C3-Konvertase (C3bBb) gebunden wird. Durch diesen Effekt macht der alternative Weg, unabhängig vom ursprünglichen Initiierungsweg, etwa 80-90% der Komplementaktivierung aus [42]. Die gesteigerte Dichte von C3b führt zu einer vermehrten Bindung von C3b an bestehende Konvertasen (C4b2b3b, C3bBb3b), sodass sich ihre Substratspezifität von C3 zu Komplementfaktor C5 verschiebt. Es entstehen also sogenannte C5-Konvertasen, welche C5 in die Produkte C5a und C5b spalten.

C5a gehört zur Gruppe der Anaphylatoxine. Bindet C5b auch die Komplementfaktoren C6 und C7, kann sich dieser Komplex in die Zellmembran integrieren. Erhält dieser Kontakt zum Komplementfaktor C8, führt dies zur Einleitung der Bindung von Fragmenten des Komplementfaktors C9. Durch diese Kaskade bildet sich der terminale Komplement Komplex (TCC, C5b-C9_n) oder auch der Membrane Attack Complex (MAC). Der MAC formt eine Pore in die Membran des Mikroorganismus, sodass es zur Lyse der Zielzelle kommt [70].

Neben der Bildung des TCC hat das Komplementsystem noch weitere wichtige Aufgaben in der Aktivierung des Immunsystems. Zum Einen verbessert die Komplement-vermittelte Opsonierung der Pathogene die Phagozytose und Antigen-Präsentation [95].

So erhält C3b während der Bildung aus C3 eine kurzlebige Mehrheit an Thioestern, welche auf körpereigenen Zellen sofort ausgeglichen wird. Die Reaktivität der Thioester führt zu spezifischen Reaktionen mit Polysacchariden und zur Opsonierung fremder Partikel und stellt somit einen grundlegenden Erkennungsmechanismus von Pathogenen dar [78, 93]. Durch diesen Mechanismus kommt es rasch zur Markierung z.B. von bakteriellen Bestandteilen, einer proinflammatorischen Signalkaskade und Mobilisierung von Immunzellen zur Phagozytose. Auch der MAC kann im Anschluss an eine Opsonierung auf einigen Pathogenen, wie z.B. gram-negativen Bakterien oder Parasiten gebildet werden und zur Lyse führen. Neben C3b sind auch die Faktoren C1q und C4b zur direkten Bindung an und Markierung von Pathogenen fähig [91].

Zum Anderen ermöglicht die Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a die Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen und fördert die Phagozytose [109].

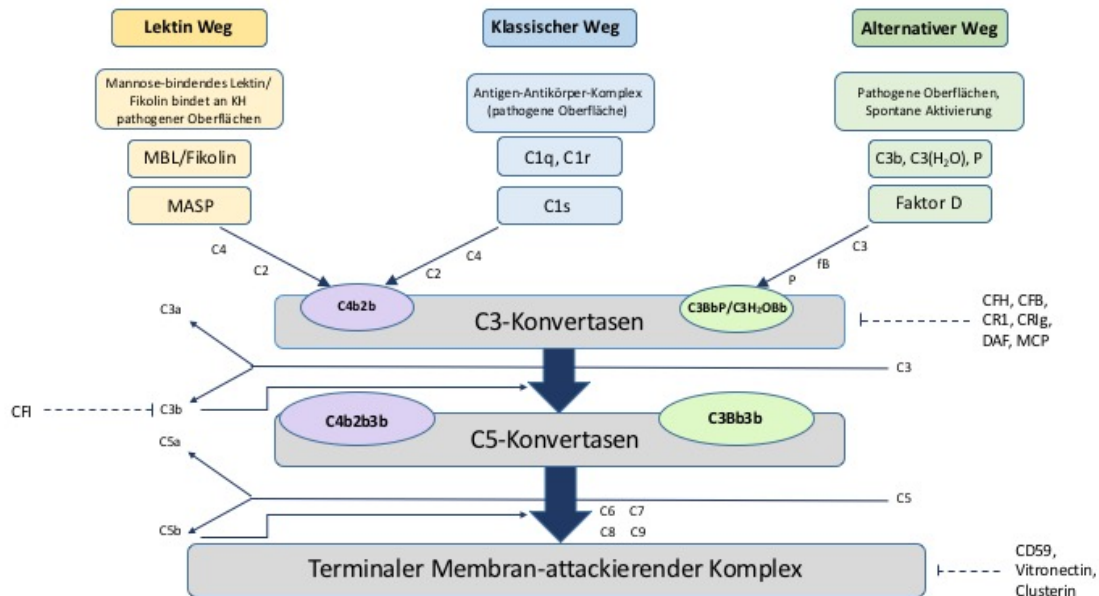


Abbildung 1: Aktivierung und Regulation des Komplements modifiziert nach (Weber et al., 2014) [117]. Die drei Aktivierungswege führen zur Bildung von Komplexen mit enzymatischer Funktion (C3- und C5-Konvertasen). Unter Bildung von Anaphylatoxinen (C3a, C5a) und einem Opsonin (C3b) kommt es zur Bildung des TCC. Regulatoren verhindern auf verschiedenen Ebenen eine unkontrollierte Aktivierung der Signalkaskade. fB (CFB), Faktor B; CFH, Faktor H; CFI, Faktor I CR1 und CRiG, Komplementrezeptoren 1 und Ig DAF, engl. Decay accelerating factor; MBL, Mannose-bindendes Lektin; MASP, MBL-assoziierte Serinprotease; MCP

1.3.3 C3-Fragmente, deren Funktion und Rezeptoren

C3 ist nativ sehr träge, als C3b jedoch ein vielseitiger Bindungspartner. Um das umliegende Gewebe vor einer Überreaktion des Komplementsystems zu schützen, greifen unter physiologischen Bedingungen verschiedene Regulationsmechanismen in die Kaskade ein [125]. Zur Bildung der C3-Konvertase braucht oberflächengebundenes C3b die Anwesenheit des Faktor B (fB, CFB). Kommt es zu keiner Reaktion der beiden Faktoren, wird C3b rasch durch Faktor I (fI) inaktiviert, und durch den Faktor H (fH) in iC3b überführt. iC3b wird dann zum löslichen C3c und dem oberflächengebundenen C3dg degradiert. Zuletzt wird C3dg in das lösliche Fragment C3g und das gebundene Fragment C3d gespalten. Bei dieser Inaktivierungskaskade fallen also mehrere C3-Fragmente an, welche Liganden für verschiedene

Rezeptoren auf myeloischen und lymphoiden Immunzellen darstellen (CR1-4, CRIg) und über diese spezifische Funktionen ausüben können [97, 109].

Die Aktivierung von CR1 und CRIg ermöglicht durch Beseitigung der Immunkomplexe und Mikroorganismen den Erhalt der Gewebshomöostase. Auf die Aktivierung der Rezeptoren CR2, CR3 und CR4 folgt dagegen eher eine inflammatorische Antwort und eine Stimulation des adaptiven Immunsystems [18].

Im Detail: Der humane CR1 hat eine hohe Affinität zu C3b, interagiert aber auch mit C4b. Er vermittelt die Degradation dieser Komplementfaktoren durch fI und stimuliert die Phagozytose durch Neutrophile, indem er pathogengebundenes C3b erkennt und somit einen wichtigen Faktor im Rahmen der Opsonierung darstellt. Des Weiteren vermittelt er die Beseitigung von Immunkomplexen und inhibiert sowohl den alternativen als auch den klassischen Weg durch Interaktion mit den C3- und C5-Konvertasen.

Der kürzlich entdeckte CRIg ist auf Gewebsmakrophagen exprimiert und bindet C3b, iC3b und C3c. So erleichtert auch er die Phagozytose von Pathogenen durch Erkennung von zellgebundenem Komplement [44].

Der CR2 wird als Teil des B-Zellrezeptors auf B-Zellen, aber auch auf follikulär dendritischen Zellen (FDC) exprimiert. Er stimuliert nach Erkennung des C3-Fragmentes C3d die B-Zellproliferation und Bildung von Gedächtniszellen [17, 18].

CR3 und CR4 werden auf Makrophagen, Neutrophilen, natürlichen Killerzellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Über Interaktion mit C3b oder iC3b stimulieren sie die Phagozytose und regulieren die Leukozytenbewegung und Zytokinausschüttung [18].

C3b und seine Fragmente verfügen also über eine antipathogene Wirkung, gewähren aber auch den Schutz der Homöostase der Darmmukosa. Weitere proinflammatorische Moleküle bilden die Anaphylatoxine.

1.3.4 Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren

Als Anaphylatoxine bezeichnet man proinflammatorische Moleküle, die bei der proteolytischen Spaltung von C3 und C5 durch Komplementproteasen entstehen [24]. Auch andere Proteasen wie z.B. Plasmin, Thrombin und Kallikrein vermögen die Faktoren zu spalten, sodass eine Quervernetzung zwischen der Komplement- und der Gerinnungskaskade zu beobachten ist. C5a gilt als potenteres Anaphylatoxin als C3a [24].

Mehrere Mechanismen führen zu einer proinflammatorischen Wirkung der Anaphylatoxine. Neben ihrer bekannten Rolle als potente Lockstoffe von Granulozyten, Makrophagen und T- und B-Zellen, im Falle von C3a auch Mastzellen [25], modulieren C3a und C5a auch die Funktion von Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen durch die Bindung ihrer spezifischen Rezeptoren C3aR und C5aR [83]. Des Weiteren vermitteln sie die Produktion und Freisetzung von verschiedenen Mediatoren wie Arachidonsäurederivaten, führen zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskulatur und einer erhöhten Thrombozytenaktivierung und -aggregation [24, 35].

Die Wirkung der Anaphylatoxine ergibt sich durch Bindung ihrer entsprechenden Rezeptoren C3aR und C5aR, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zählen. C3aR mRNA (engl. messenger ribonucleid acid) wird in den meisten Geweben gebildet, das Protein konnte bisher in Eosinophilen, dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Neuronen, Astrozyten, endothelialen und epithelialen Zellen sowie in glatten Muskelzellen der Lunge nachgewiesen werden [21, 57]. Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung des Liganden führt zur Dissoziation der beiden Untereinheiten (α - und β - γ -UE) und einer Vermittlung von verschiedenen Signalen, u.a. MAPK-Signale (engl. mitogen-activated protein kinase) [33]. Die Aktivierung der MAPK erfolgt über GTPasen wie Ras, welche die Phosphorylierung verschiedener Kinasen initiieren. Durch die Aktivierung transloziert die MAPK in den Nukleus, moduliert dort durch verschiedene Phosphorylierungen Transkriptionsfaktoren und beeinflusst somit zelluläre Prozesse, wie die Zytokinproduktion und den Zellzyklus [19, 33]. Auch eine Aktivierung des Inflammasoms NLRP3 (engl. pyrin domains-containing protein 3) konnte im Zusammenhang mit dem Auftreten der C3aR-Signalkaskade in Kombination mit metabolischen Veränderungen des Cytosols detektiert werden [5]. In Säugetieren kommen am häufigsten die MAPKs ERK1/2 (engl. extracellular signal-regulated protein kinase1/2), c-Jun N-terminale

Kinase (JNK) und p38 vor [19]. Die β - γ -UE stimuliert ERK1/2 durch Aktivierung von Ras über eine Tyrosinkinase. Ob dieser Weg über die Phospholipase C- β (PLC) oder PI3K läuft, wird diskutiert [34].

C5L2 oder C5aR2 (GPR77) bildet einen weiteren, G-Protein-unabhängigen Rezeptor, dessen Funktion noch nicht vollends geklärt werden konnte. Er ist cytosolisch auf Endosomen exprimiert und wird nur nach Aktivierung auf die Zelloberfläche transloziert. Verschiedene Arbeitsgruppen schreiben ihm eine proinflammatorische oder „lockende“ Funktion zu [6, 115].

1.3.5 Komplement-regulierende Proteine

Einmal aktiviert ist das Komplement ein sehr wichtiges System zum Erhalt der zellulären Integrität und der Gewebshomöostase. Die Reaktion dieses Systems kann sich aber auch vervielfältigen und in einer mächtigen Effektorfunktion und Gewebszerstörung resultieren. Auf jeder Ebene wird die Komplementkaskade über Regulatoren kontrolliert, um Unterschiede zwischen körperfremden (bzw. apoptotischen Zellen) und körpereigenen Zellen auszumachen [125].

Eine lokale Komplementaktivierung attackiert stets auch umliegende Zellen. Der Schutz eigener Zellen ist deshalb enorm wichtig, um die Immunantwort auf die Zielzelle zu beschränken. Diese Schutzfunktion übernehmen Regulatorproteine, die entweder löslich, membrangebunden oder als Rezeptoren für Komplementeffektormoleküle (CR1-4 und CR1g, C3aR, C5aR, C5L2, C1qR) vorliegen [125]. Die spezifische Expression und Verteilung der Rezeptoren ist abhängig von der Zelllinie oder dem Zelltyp. Die Verteilung und individuelle Komposition der Rezeptoren sind Parameter für die protektive Oberfläche der Zelle und ihre molekulare Antwort auf das Komplement [125].

Die große Gruppe der Komplementregulatoren kann man nach ihren Angriffspunkten gliedern (**Abbildung 1**). Die Hemmung der C3-Konvertase ist sehr effektiv, da an dieser Stelle alle drei Initiierungswege münden. Zu den Regulatoren der C3-Konvertasen zählen u.a. fH und fB (CFB), CR1 und CR1g, der Decay accelerating factor (DAF; CD55) und das Membrane Cofactor Protein (MCP, CD46). Das MCP wird auf fast allen Zellen exprimiert. Die Inhibierung von C3

durch CD46 stabilisiert einen nicht-entzündlichen Zustand der Wirtszelle, sodass ein immunsuppressiver Phänotyp entsteht. Dieser äußert sich z.B. in einer Induktion der regulatorischen T-Zellen (T_R1 -Zellen), welche vermehrt IL-10 produzieren, einer Suppression von Entzündungsreaktionen und einer Stabilisierung der mukosalen Homöostase [82].

Der DAF hemmt die Komplementkaskade durch Trennung der multimolekularen C3-Konvertase des APs, C3bBb, durch Bindung an C3b. In geringerer Effektivität inhibiert er auch die C3-Konvertase des CPs, C4bC2b [43]. Des Weiteren verhindert er die Bildung weiterer C3- und C5-Konvertasen und inhibiert so zusätzlich die Aktivierung des Komplementsystems [24].

Ein anderer Angriffspunkt der Komplementregulatoren ist die Formation des MAC. Das CRP CD59 (Protectin) bindet C5b-8 und inhibiert die Anlagerung von C9. Bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) ist die Anfälligkeit für eine komplementinduzierte Zellyse durch das Fehlen von CD55 und CD59 erhöht [100]. Vitronectin und Clusterin bilden zwei Vertreter der löslichen TCC-Inhibitoren. In weiterer Ebene der Komplementregulation, werden die Anaphylatoxine durch Carboxypeptidase-N desarginiert und somit inaktiviert [91].

Die Regulation der Komplementkaskaden ist also überaus wichtig, da eine Überaktivierung des Komplementsystems zur Zerstörung körpereigener Zellen führen kann und das Auftreten von Gewebepathologien begünstigt [32].

1.3.6 Synergismus von Komplement und Toll-like Rezeptoren

Das Komplementsystem ist ein effektiver Teil des angeborenen Immunsystems. Durch die Fähigkeit zur Fremd- und Selbsterkennung ist es in der Lage, schnell auf Gefahren zu reagieren. Dabei nutzt es allerdings nicht nur die eigene Reaktionskaskade, sondern koordiniert diese auch mit anderen biologischen Systemen, wie zum Beispiel den TLRs [36], der Gerinnung und dem adaptiven Immunsystem [24].

Sowohl das Komplement als auch die TLRs bilden eine schnelle Antwort auf mikrobielle Strukturen, wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Dabei wirken die beiden Systeme sowohl synergistisch als auch antagonistisch zusammen, um die angeborene Immunantwort optimal zu regulieren [36]. Detektieren mehrere Systeme des angeborenen Immunsystems

unabhängig voneinander ein Pathogen, gilt dies als Verifizierung der Erkennung und es kommt zu einer Amplifikation und Regulation der antimikrobiellen und inflammatorischen Immunantwort [91].

Durch Erkennung von PAMPs (z.B. LPS, Zymosan, Flagellin, DNA) kommt es sowohl durch die Komplement-, als auch die TLR-Aktivierung synergistisch zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine (TNF, Interleukin-1 β und -6). Insbesondere für TLR2, TLR4, TLR9 sind Interaktionen beschrieben, in denen sich der Signalweg auf Höhe der MAPKs, in erster Linie ERK1/2 und JNK mit dem Signalweg der Anaphylatoxine kreuzt [91, 105, 123]. Da die drei TLRs (TLR2, 4, 9) ihre Signale über das MyD88 (engl. myeloid differentiation primary-response protein 88) vermitteln, wird dieser Signalweg auch bei der Pathogenassoziierten TLR-Regulation durch das Komplement vermutet [36]. Zudem stimuliert eine TLR4-Aktivierung auch die Produktion einiger Komplementfaktoren wie C3 und CFB [85].

Kommt es zu einer gleichzeitigen Aktivierung von TLR und C3aR, kann es zu einer simultanen Aktivierung des NLRP3 kommen. So führt die TLR-Stimulation zu einer Expression von NF- κ B, die Aktivierung des C3aR führt über Aktivierung von Ionenpumpen zu einer Veränderung des Zellmilieus. Die Folge dieser zwei Signalwege ist die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms welche in der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 resultiert [5].

Aber auch der Komplementrezeptor gC1qR spielt in der Kreuzkommunikation des Immunsystems eine Rolle. Dieser Initiator des CPs hemmt die TLR4-Antwort über die PI3K und somit eine IL-12-Produktion in humanen Monozyten [111]. Des Weiteren inhibiert dieser Rezeptor die Produktion von IL-1 β und TNF α und fördert eine TLR4-assoziierte IL-10-Produktion. Er wirkt somit anti-inflammatorisch [30] über eine Generierung des inhibitorischen NF- κ B p50/p50 Homodimers [29].

Die regulatorischen Effekte des Komplements auf die TLR-Antwort ist zellspezifisch und unterscheidet sich z.B. in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen grundsätzlich [36, 58]. Der zugrundeliegende biomolekulare Prozess konnte bisher nicht vollkommen entschlüsselt werden. Man vermutet aber als Ursache verschiedene Isoformen der Adenylatzyklase [36, 83, 105].

1.4 Komplement und CED

1.4.1 Komplement im Intestinum

Es ist bekannt, dass intestinale Epithelzellen durch das angeborene Immunsystem in der Lage sind die Darmschleimhaut zu überwachen und anhand von Systemen wie der PRR Mikrobe zu erkennen und, wenn es notwendig ist, eine Immunantwort auszulösen [84]. Da die Effektivität und Bedeutung des Komplementsystems in der antimikrobiellen Abwehr und Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen in anderen Geweben und dem Blutkreislauf bereits ausreichend nachgewiesen werden konnte, ist auch für den Darm eine Relevanz des Komplementsystems anzunehmen.

Die Produktion der Komplementfaktoren findet hauptsächlich in der Leber statt. Aber auch nicht-hepatische Bildungswege, die die Anwesenheit von Komplementfaktoren im Darm ermöglichen, konnten bereits aufgedeckt werden. So ist zum Einen eine Sekretion von Komplementfaktoren in das Duodenum über das Pankreassekret beschrieben [3], zum Anderen konnten intestinale Epithelzellen (IEZ) als Syntheseort für Komplementfaktoren identifiziert werden [51].

Belege für die Komplementproduktion in IEZ bilden Versuche an verschiedenen humanen intestinalen Epithelzelllinien, welche eine Expression der Faktoren C3, C4 und fB (CFB) aufweisen, die durch stimulierende Zytokine wie z.B. IL-6, IL1 β , IFN γ und TNF α zusätzlich gesteigert werden konnte [2, 7]. Neben Caco-2 [2] wurden durch die Arbeitsgruppe um *Bernet-Camard et al.* auch die humanen Kolonkarzinomzelllinien T84 und HT-29 und embryonale Epithelzelllinie INT407 untersucht. In diesen Zelllinien konnte ebenfalls die mRNA Expression der Komplementfaktoren C3 und C4, nicht aber die des Faktor C5 und der Faktoren zur Bildung des MAC nachgewiesen werden [7].

Das Vorhandensein von Komplementregulatoren, wie CD55 und CD59, auf der luminalen Seite und CD46 auf der basolateralen Seite der intestinalen Epithelzellen gibt weiteren Anhalt dafür, dass das Komplementsystem eine Relevanz im Intestinum hat und das gesunde Epithel einer Abwehr gegenüber der Komplementaktivierung bedarf [10].

1.4.2 Komplement und CED

Im Rahmen von Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem und CED konnten in Blutproben von CED-Patienten mit akuter Entzündungsaktivität erhöhte Syntheseraten und verstärkter Katabolismus von C3 im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Gleichzeitige Stuhlproben ergaben keine korrelierende C3-Ausscheidung [47].

Lauffer et al. wiesen in Resektaten von Karzinompatienten C4 anhand von In situ Hybridisierung in Dünndarmkrypten nach. In Proben von MC Patienten wiesen sie C4 mRNA sowohl in entzündeten als auch gesunden Schleimhautarealen nach, während C3 mRNA insbesondere in entzündeten Schleimhautarealen nachgewiesen wurde [51, 61]. *Sugihara et al.* isolierten das Protein für C4 in Krypten und Zotten. Darüber hinaus konnten sie eine erhöhte, NF- κ B vermittelte, mukosale C3 mRNA Expression in Biopsien von CED Patienten [51, 104].

Komplementfaktoren konnten auch im Lumen des Darms direkt nachgewiesen werden. In luminalen Proben von Patienten mit bakterieller Darminfektion konnten alle Komplementfaktoren bis einschließlich C5 dokumentiert werden. Für Komplementfaktoren zur Bildung des MAC blieb der Proteinnachweis aus [92]. Ein Vergleich der jejunalen Sekretion von MC Patienten und gesunden Kontrollpersonen zeigte eine erhöhte Sekretion von C3, C4, nicht aber fB (CFB) [1, 51]. Interessanterweise, konnte eine IgG abhängige Aktivierung des CP auf der Oberfläche von IEZ von CU Patienten nachgewiesen werden. Bei MC Patienten dagegen wurde keine vermehrte C1q oder C4c Expression, aber eine hohe C3b Deposition beobachtet [47].

Die Expression der Regulatoren variiert in den Abschnitten des gesunden Darms, ist aber bei CED insgesamt erhöht. Zum Beispiel wird CD55 von gesunden Kolonepithelzellen nicht exprimiert. In Patienten mit CED wurde dagegen eine erhöhte Expression von CD55 und CD59 nachgewiesen [10, 51, 67].

Der Nachweis von C3-Spaltprodukten auf mukosalen Epithelzellen weist auf eine luminal Aktivierung und einen Katabolismus des Komplements hin. *Halstensen et al.* konnten C3b aus der oberflächlichen Mukusschicht isolieren und C3b sowie Faktoren des MAC auf Epithelzellen in Dün- und Dickdarm von MC Patienten nachweisen [39]. Dabei entsprach die vermehrte

Bildung der C3-Spaltprodukte in CED-Patienten der Entzündungsaktivität [39, 51]. *Hodgson et al.* proklamierten 1977 eine positive Korrelation der Faktoren C3 und fB (CFB) mit der Entzündungsaktivität bei CED Patienten. In Krankheitsremission reduzierte sich auch die Komplementkonzentration, sodass die Arbeitsgruppe eine extraintestinale Beeinflussung der Komplementkonzentration als unwahrscheinlich erachtete [48]. Auch andere Arbeitsgruppen wiesen eine erhöhte Konzentration von C3 und C4 entsprechend der Entzündungsaktivität sowohl bei CU als auch bei MC nach [90, 116]. Die Aktivierung der Komplementfaktoren im Rahmen von CED liegt zum einen in der Tatsache begründet, dass sie teilweise zu den Akute-Phase-Proteinen gehören. Zum anderen weisen die uneinheitlichen Studienergebnisse auch auf beeinflussende Faktoren, wie z.B. die Krankheitsaktivität, extraintestinale Manifestationen und Therapie, hin [51].

Im Tiermodell einer chemisch-induzierten (DSS) chronischen Kolitis zeigten C3-defiziente Tiere eine schlechtere Überlebensrate und stärkere Entzündungsprogression als Kontrolltiere [27]. Auch diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des Komplementfaktors C3 an der Entzündungsaktivität bei chronisch intestinalen Entzündungen hin.

Eine Bedeutung des Komplementsystems im Rahmen der CED scheint also unumstritten. Ob das Komplement eine protektive oder eher schädliche Beeinflussung hat, ist noch nicht vollends geklärt [51]. Welche Rolle das Komplementsystem im Rahmen der Pathogenese und gegebenenfalls auch der Therapie von CED spielt, ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Komplement ist als potentes System der angeborenen Immunabwehr anerkannt. Im Wesentlichen erfüllt es drei Hauptfunktionen. So initiiert es erstens, durch Opsonierung von Bakterien und apoptotischen oder veränderten Zellen, deren Elimination. Zweitens vermag es u.a. durch die Anaphylatoxine eine Inflammation auszulösen. Schließlich führt es mittels Formatierung des terminalen Komplementkomplexes (MAC) zur Lyse von Zielzellen. Weiterhin ist bekannt, dass es durch Überaktivierung des Komplementsystems oder verminderte Inhibition durch Regulationsproteine zu einer chronischen Inflammation kommen kann [51].

Hinweise auf eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese von CED gibt es mehrere. So konnte bereits in chemischen Modellen der chronischen intestinalen Entzündung der Maus, aber auch in Biopsien von CED-Patienten eine gesteigerte Expression einiger Komplementfaktoren nachgewiesen werden [7, 10, 104]. Erste Versuche der Generierung von Komplementinhibitoren als neue Therapieoption in CED zeigen das wachsende Interesse am Komplementsystem in der Pathophysiologie von CED [27, 52]. Die genaue Rolle der vermehrt exprimierten Komplementfaktoren im Rahmen von CED bleibt aber bisher weitgehend unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen exploriert werden:

1. Welche Komplementfaktoren werden in den murinen intestinalen Epithelzellen des terminalen Ileums und des Kolons exprimiert?
2. Kann die Expression durch bakterielle Stimuli moduliert werden?
3. Lassen sich die Ergebnisse auf ein chemisches Modell chronischer intestinaler Entzündung übertragen?
4. Welche Funktionen erfüllen vermehrt exprimierte Komplementfaktoren im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturexperimente

2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zelllinien

Zur Untersuchung der intestinalen Epithelzelle wurde die murine, adhärenzte Zelllinie *Murine Duodenal Epithelial Cell – Clone K* (MODE-K) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine transformierte (SV40 large T gene) Epithelzelle einer zwei Wochen alten weiblichen C3H/HeJ-Maus [110].

Die Zelllinie IEC-1 (intestinal epithelial cells) ist eine etablierte Zelllinie zur Untersuchung der murinen intestinalen Epithelzelle [98].

Die Zellkulturen wurden in einer unbeschichteten 25 cm² Zellkulturflasche in Mode-K-Zellmedium angesetzt und bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert.

Die Subkultivierung der adhärenzten Zellen fand im Abstand von fünf bis sieben Tagen statt. Hierzu wurde die konfluente Zellschicht mit 3 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Durch die Enzymaktivität lösen sich die Zell-Matrix-Kontakte der Zellschicht. Dann wurden die Zellen in 5 ml Zellmedium aufgenommen, um die Zytotoxizität des EDTA zu mindern und das Trypsin zu inaktivieren. Im Folgenden wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet im Anschluss in 5 ml Medium resuspendiert. Für die Kultivierung neuer 25 cm² Zellkulturflaschen wurden 0,3 ml (IEC-1 0,5 ml) Zellsuspension und 5 ml Medium hinzugefügt.

2.1.2 Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl und Vitalität der Zellen bestimmt. Hierzu wurden etwa 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Die Zellen konnten dann in den vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt und die endgültige Zellzahl anhand folgender Formel bestimmt werden:

Formel 1: Bestimmung der Zellzahl

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times (\text{Anzahl vitaler Zellen}/4)$$

2.1.3 Isolierung intestinaler Epithelzellen

Zur Isolierung von intestinalen Epithelzellen wurde der Dünndarm der Maus entnommen, mit 1x PBS gespült, längs aufgeschnitten und im Anschluss in 2-4 mm große Stücke geschnitten. Die Darmstücke wurden in 1 mM DTT in 1x PBS aufgenommen und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Darmstücke in 1U Dispase II in PBS und 1% (w/v) BSA aufgenommen. Das Gemisch wurde erneut für 30 Minuten (Ileum) bzw. für 120 Minuten (Kolon) bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde nun durch ein Zellsieb (70 µm) gegossen und mit 1 x PBS gewaschen. Anhand einer Trypanblaufärbung wurde die Vitalität der Zellen kontrolliert. Die Grundlage des Routineverfahrens für die Vitalfärbung beruht darauf, dass gewisse Farbstoffe (geladene und/oder $> M_{rel}200$) die Zellmembran nicht überwinden können, während tote Zellen sich mit dem Farbstoff anfärben.

2.1.4 Stimulationsexperimente

Zur Stimulation der Mode-K- und IEC-1-Zellen wurden diese nach erfolgter Subkultivierung und Zellzahlbestimmung in frischem Medium zu 1×10^5 Zellen/ml resuspendiert und die Wells einer unbeschichteten 24-Loch-Platte so befüllt, dass sie zu etwa 80% konfluent benetzt waren. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert, sodass sie adhärent wuchsen. Am nächsten Tag wurden die entsprechenden Stimulanzen (Flagellin, LPS, LD-MDP, Peptidoglycan je 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über 24 h (bzw. eine, drei, sechs, 12 Stunden). Zur Stimulation der primären isolierten Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in die 6-Well Platte gefüllt und für drei Stunden stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Überstände entnommen und bei -20°C gelagert. Für eine anschließende PCR wurden die Zellen mit 400 µl Lysis-Puffer (aus innuPREP RNA Mini Kit) aus dem Well gelöst. Für einen anschließenden Western Blot wurde das Gleiche anhand von 400 µl WB-Lysis-Puffer durchgeführt.

2.2 Genexpressionsanalyse

2.2.1 RNA-Isolierung aus der Zellkultur und Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur RNA-Isolierung aus den Zellen wurde das innuPREP RNA Mini Kit der Firma Analytik Jena verwendet. Die Durchführung erfolgte auf Basis der gegebenen Herstellerangaben, wobei im letzten Schritt 25 μl RNase-freies Wasser hinzugefügt wurde und die Inkubationszeit fünf Minuten betrug. Mittels DNase Kit I wurde zusätzlich ein DNA Verdau durchgeführt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Der NanoDrop 1000 Spektralphotometer der Firma *Thermo Scientific* wurde zur Bestimmung der RNA-Konzentration benutzt. Die Kalibrierung erfolgte anhand von destilliertem Wasser. Zur Messung wurde jeweils ein Probenvolumen von 2 μl benötigt. Anhand der ermittelten RNA-Konzentration konnte das benötigte Volumen zur cDNA-Synthese berechnet werden.

2.2.2 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der RNA in die, für die Genexpressionsanalyse benötigte cDNA, wurden zunächst 6,5 μl RNase-freies Wasser vorgelegt. Dann wurden 5 μl der Gesamt-RNA und 1 μl des Randomprimers hinzugegeben und für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde ein Mastermix aus 4 μl 5x Puffer, 1 μl dNTPs, 0,5 μl Reverse Transkriptase und 1,5 μl RNase-freiem Wasser jeder Probe hinzugefügt. Im Thermocycler wurden die Proben dann zunächst für 60 min bei 42°C und anschließend für zehn Minuten bei 70°C inkubiert. Bei -20°C wurde die gewonnene cDNA gelagert.

2.2.3 Quantitative Real-Time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven in vitro Amplifikation geringer Mengen DNA und zur Quantifizierung der gewonnenen DNA-Amplifikate. Benötigt werden neben der Matrizen-cDNA auch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), Oligonukleotidprimer, Desoxynukleosidtriphosphate und geeignete Pufferbedingungen. In dieser Arbeit wurde die quantitative RT-PCR mittels eines Mastermix ausgeführt, der den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I enthält. Zur Durchführung der Real-Time PCR wurde, je nach Konzentration der cDNA, RNase-freies Wasser zu den Proben hinzugefügt. Bei einer Konzentration von etwa 250 ng/ μ l wurden 20 μ l RNase-freies Wasser hinzugefügt, die Proben kurz zentrifugiert und dann je 2 μ l der Proben in ein Well vorgelegt. Ein Mastermix aus 10 μ l Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 8 μ l RNase-freiem Wasser und 0,1 μ l Primer (100 pM/ μ l) je Well mussten angesetzt und nach kurzer Zentrifugation in die 96-Well-Platte pipettiert werden. Zur Kontrolle wurden jeweils zwei Wells pro Primer ohne cDNA belassen. Die Experimente wurden jeweils in Zweifachbestimmung durchgeführt. Die Platte wurde mit einer Folie bedeckt und bei 400 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Mit dem Thermocycler erfolgte die Durchführung der PCR nach folgendem Temperaturschema:

Tabelle 2: Temperaturschema für die Durchführung der RT-PCR

1.	Aktivierung der DNA-Polymerase	5 min	95°C	
2.	Denaturierung der DNA	45 s	95°C	40 Zyklen
3.	Annealing der Primer und Elongation	60 s	60°C	

Um Störfaktoren und Schwankungen im cDNA-Gehalt auszugleichen, wurde bei jeder Durchführung ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) mitgeführt. Da dieses Gen in der Regel nicht mitreguliert wird und daher als konstitutiv angesehen werden kann, kann der C_T -Wert (Cycle Threshold, Schmelz- oder Dissoziationskurve) in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA ermittelt werden. Ein Strukturprotein eukaryotischer Zellen, β -Actin, wurde in dieser Arbeit als Referenzgen eingesetzt.

SYBR Green I baut sich unspezifisch in jede DNA ein, die Spezifität ist somit verringert.

Die Schmelzkurvenanalyse zeigt die Temperatur an, bei der die Doppelstrang-DNA denaturiert und den Fluoreszenzfarbstoff freigibt. Dadurch kann die Fragmentlänge und folgend die Spezifität ermittelt werden. Ein doppelsträngiges spezifisches PCR-Produkt hat in der Regel einen höheren Schmelzpunkt als ein unspezifisch entstehendes Produkt. Durch das Verfahren der Schmelzkurve lassen sich demnach unspezifische Produkte eliminieren und die Spezifität der PCR erhöhen.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde für jede Probe der C_T -Wert bestimmt und die Expression der unstimulierten mit den stimulierten Proben verglichen. Die Profile der Schmelzkurve wurden entsprechend der $\Delta\Delta CT$ -Methode produziert und analysiert [63].

Formel 2: Auswertung der RT-PCR

$$\text{Ratio} = ddCT = 2^{[-(dCT_1 - dCT_2)]}$$

2.2.4 Semiquantitative Reverse-Transkriptase PCR

Eine semiquantitative PCR nach *Mullis et al* [71] wurde zur Amplifikation von Genmaterial mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden je 12,5 μl DreamTaq PCR Master Mix, je 0,2 μl Primer, 3 μl isolierte DNA und 9,1 μl Aqua destillata in dem Thermocycler nach folgendem Schema verarbeitet.

Zunächst wurden die DNA-Doppelstränge für 150 Sekunden bei 95°C in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend lagerten sich die Primer im zweiten Schritt bei 60°C (für 45 Sekunden) an die DNA-Stränge an. Im dritten Schritt synthetisierte eine hitzestabile *taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) bei 72°C (für 45 Sekunden) wieder Doppelstränge. Insgesamt wurden 38 Zyklen durchgeführt. In jedem dieser Zyklen wurde die DNA verdoppelt.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Basenpaargröße der entstandenen PCR-Amplifikate und zur Darstellung möglicher Nebenprodukte in Form weiterer Banden wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Agarose-Gelelektrophorese beruht auf der Grundlage, dass die negativ geladenen Fragmente wegen ihrer unterschiedlichen Fragmentgröße im elektrischen Feld eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit aufzeigen.

Zur Durchführung wurde ein 2%-iges (w/v) Metaphor-Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Der Gelschlitten wurde vorbereitet und die Kämme eingesetzt. Ein Gemisch aus 1,34 μ l Ethidiumbromid und 25 ml 2%-igem (w/v) Agarosegel wurde hergestellt und zum Aushärten in den Gelschlitten gegossen. Der Gelschlitten wurde anschließend in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gegeben, der Kamm vorsichtig herausgezogen und anschließend je 10 μ l PCR-Amplifikat und 2 μ l 5x Loading Dye Solution in eine Geltasche pipettiert. Die beiden äußeren Geltaschen wurden mit je 10 μ l DNA-Leiter gefüllt. Für 30 Minuten wurde eine Spannung von 60-90 V angelegt. Im Anschluss wurden das Gel und der Schlitten entfernt. Durch das Ethidiumbromid wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar. Mit Hilfe des Detektionsgeräts resultierte die Aufnahme.

2.3 DSS-Versuch

2.3.1 Versuchsaufbau Dextran-Sulfat Natrium (DSS)

Der Tierversuch wurde durch den Tierversuchsantrag Nummer V 242-7224.122-4 (14-1/15) genehmigt. Entsprechend dem nationalen Recht und Richtlinien der FELASA erfolgten Haltung, Zucht und Versuche. Die verwendeten Studientiere gehören dem Mausstamm C57BL/6J an.

Der DSS-Versuch hat sich als Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen etabliert [20, 114]. Bei dem sulfatierten Natriumsalz der Dextrane (DSS) handelt es sich um hochmolekulare, verzweigte Polysaccharide aus Glukose-Untereinheiten. Für Hefen und Bakterien dienen diese als Reserve zur Energiegewinnung. Im Rahmen des DSS-Modells induziert die zyklische Gabe von DSS eine Kolitis-ähnliche Entzündung im Gastrointestinaltrakt der Versuchstiere [74, 114].

Zur Kolitis-Induktion wurde dem Trinkwasser der Versuchstiere 2% (w/v) DSS in fünftägigen Zyklen zugesetzt. Es erfolgte also über fünf Tage die Gabe von normalem Trinkwasser, gefolgt von einer fünftägigen Gabe von DSS-versetztem Trinkwasser. Dieses Schema wiederholte sich bis zur Tötung der Tiere am 30. Lebenstag. Kontrolltiere erhielten während des gesamten Versuchszeitraums normales Trinkwasser.

2.3.2 Histologische Darmpräparate

Durch zervikale Dislokation wurden die Versuchstiere getötet. Das Abdomen wurde umgehend durch einen Kreuzschnitt eröffnet. Zur weiteren Präparation des Darms wurde dieser in seiner gesamten Länge entnommen. Es folgte eine Spülung von Ileum und Kolon mit eisgekühltem PBS. Zur histologischen Auswertung wurden die Ileum- und Kolonproben in 4% (w/v) PFA eingelegt.

Die Fixierung der Proben erfolgte in Carnoyscher Lösung. Die Lösung drang erwartungsgemäß schnell ein. Objekte von 1-2 mm Dicke waren schon nach einer Stunde fixiert. Größere Stücke benötigten eine Fixierungszeit von maximal drei Stunden. Darüber hinaus sollte nicht fixiert werden, da sonst starke Schrumpfungen auftreten können und die Präparate zu hart werden. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Objekte zur Dehydrierung in absoluten Alkohol übertragen, welcher nach 24 Stunden einmal gewechselt wurde. Es folgte die Einbettung in eine Paraffinmatrix. Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms wurden aus den ausgehärteten und auf -20°C abgekühlten Paraffinblöcken 4 µm dicke Schnitte angefertigt.

Ein repräsentativer Querschnitt der Darmmukosa wurde ausgewählt, in einem Heißwasserbad bei 45°C gestreckt und anschließend glatt auf Objektträger gezogen. Zuletzt trockneten die Schnitte über Nacht bei 40°C.

2.3.3 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Verfahren zur Färbung spezifischer Antigene mittels Markierung durch Antikörper. Durch Bindung des Antikörpers an diese Epitope kommt es entsprechend des Prinzips der Antigen-Antikörper-Reaktion zur Identifikation der Zielstrukturen. Anhand eines Markers, der den bindenden Antikörper sichtbar macht, können so Epitope detektiert werden. In dieser Arbeit wurde die *indirekte* Färbemethode verwendet, bei der die primär an der Zielstruktur bindenden Antikörper nicht markiert sind. Ein zweiter Antikörper, welcher spezifisch an den ersten Antikörper bindet und mit einem Enzym markiert ist, wird zur zweistufigen Färbung benutzt.

Es wurde eine spezifische Färbung für den Komplementfaktor C3 in Darmabschnitten von Versuchs- und Kontrolltieren durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in **Tabelle 12** angegeben.

Zur Markierung der histologischen Schnitte mit dem C3-Antikörper wurden diese zunächst entparaffiniert, um die Reaktivität des Antigens wiederherzustellen. Dazu wurden sie für viermal fünf Minuten mit Xylol behandelt und im Anschluss für zweimal drei Minuten in 100%-iges Ethanol gelegt. Es folgte eine Reihe aus je dreiminütiger Behandlung mit 96%-igem, 90%-igem und 80%-igem Alkohol. Im Anschluss wurden die Schnitte für zweimal drei Minuten in 70%-igen Alkohol gelegt. Zuletzt erfolgte das Abspülen der Schnitte für ebenfalls zweimal drei Minuten in Aqua destillata. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Proben mit Citratpuffer bei einem pH-Wert von 6 für 35 Minuten in den Dampfgerar gelegt. Nach zweimaligem Spülen der Schnitte in PBS für jeweils fünf Minuten wurde eine zehnminütige Spülung mit Peroxidase durchgeführt. Im Anschluss an einen Waschvorgang mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen in 0,5% (w/v) Triton X 100 für 20 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS wurden dann unspezifische Bindungen durch eine 30-minütige Blockierung in 2% (w/v) BSA gegenüber dem Antikörper abgeschirmt.

Nach Auftragen des primären Antikörpers (Anti-C3-Antikörper, 1:2000 in 0,5% (w/v) Triton X und 1x BSA) wirkte dieser bei 4°C über Nacht ein. Im Anschluss an einen Waschvorgang mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Ziege-AK, HRP konjugiert, 1:200) aufgetragen. Dieser wurde nach einer Einwirkzeit von einer Stunde bei Raumtemperatur mit PBS abgespült. Zuletzt wurden die Schnitte mit DAB behandelt und

mit PBS gewaschen, sodass es durch eine Enzymreaktion am zweiten Antikörper zu einer indirekten Färbung von C3 kam.

Zur weiteren Anfärbung der Gewebestruktur wurden die histologischen Schnitte für drei Minuten in Mayers Hämalaunlösung gegeben. Das Bläuen erfolgte unter fließendem warmem Leitungswasser für etwa zehn Minuten. Nach Spülung der Schnitte wurden diese mit Aquatex® eingedeckt und konnten unter dem Axiophot ausgewertet werden.

2.3.4 Erhebung der Entzündungsaktivität

Zur standardisierten Beurteilung der Entzündungsaktivität wurde der modifizierte Disease Activity Index (DAI) [20] bestimmt. Dieser beinhaltet die Einordnung der Parameter „Gewichtsverlust“ und „rektale Blutung“ in ein Score-System. **Tabelle 3** gibt das Schema zur Punkteinteilung wieder. Maximal konnten 8 Punkte erreicht werden.

Tabelle 3: Disease Activity Index. Den Befunden aus Zeile 2 und 3, betreffend Gewicht und Blut im Stuhl, werden die Punktwerte der dritten Zeile zugeordnet.

Gewichtsverlust in %	0-5	5-10	10-15	15-20	>20
Blut			Positiv im Haemoccult		Frisches Blut im Stuhl
Punkte	0	1	2	3	4

2.3.5 Konservierung der Mukosa-assoziierten Bakterien

Die folgende Methode wurde adaptiert von Swidinski et al. [106]. Die Probenentnahme erfolgte aus dem proximalen Kolon der Maus mittels einer 3x3 mm großen Stanze. Die Biopsie wurde gewogen und anschließend zur Ablösung der Mukusschicht in 500 µl PBS 0,016% (v/v) Dithioerythritol gegeben. Alle Vorgänge wurden eisgekühlt durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 µl PBS durch etwa 30-sekündiges Schütteln wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 500 µl Aqua destillata aufgenommen und für 30 Minuten bei 800 x g auf dem Vortexer durchmischt. Dieser Schritt diente der osmolytischen Lyse der Zellen und daher der Freisetzung von Bakterien aus den Zellen. Durch das Verwenden von Aqua destillata anstelle des PBS kommt es durch den osmotischen Druck zum Platzen der Epithelzellen. Für die Lagerung wurden die Bakterien für drei Minuten bei 12 000 x g pelletiert, in Glycerol-PBS aufgenommen und bei – 80°C bis zur Auswertung mittels Durchflusszytometrie schockgefroren.

2.4 Western Blot

Ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen ist der Western Blot. Zunächst wird anhand der SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ein Proteingemisch auf einem 12%-igem Polyacrylamid-Gel anhand eines elektrischen Feldes entsprechend der Proteingröße aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine bei dem Western Blot auf eine Membran transferiert und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Dazu wurden 40 µg Protein mit 5 µl 4xSDS-Puffer gemischt, mit Aqua destillata auf 25 µl aufgefüllt und für fünf Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophorese-Puffer befüllt und das Gel mit den Proben (15-25 µl) beladen und bei 230 Volt für 45 Minuten laufen gelassen. Es erfolgte die Auftrennung der Proteine und des Molmassen-Standards durch die SDS-PAGE.

Die getrennten Proteine wurden nun mit Hilfe des TurboBlot Systems auf eine Polyvinylidene Difluorid (PVDF)-Membran übertragen. Diese wurde im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockpuffer inkubiert, um die nicht besetzten Stellen

der Membran zu blockieren. Die Membran wurde über Nacht mit einem spezifischen primären Antikörper (Anti-C3-Antikörper, 1:1000) bei 4°C auf einem Schüttler in 5% (w/v) Magermilch/T-TBS inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal mit T-TBS gewaschen und dann mit einem entsprechenden sekundären Antikörper (Anti-Maus-AK, HRP-konjugiert, 1:4000) für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% (w/v) Magermilch/T-TBS inkubiert. Erneut wurde die Membran gewaschen und für eine Minute mit 1,0 ml Clarity Western ECL Substrat (der Entwicklerlösung) benetzt, um eine sichtbare Reaktion zu ermöglichen.

2.5 Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie (FC, engl. Flow Cytometry) wurde die Effektivität und Genauigkeit der Epithelzellisolierung überprüft und die C3b-Deposition auf Mukosa-assoziierten Bakterien (MAB) dargestellt. Bei dieser Methode werden die Zellen fluoreszenzmarkiert bevor sie einzeln einen fokussierten Argon-Laserstrahl passieren. Dabei entsteht ein für die Zellen charakteristisches Streu- und Fluoreszenzlicht. Die Detektion dieses Lichts ermöglicht eine Differenzierung der Zelltypen und eine semiquantitative Begutachtung spezifischer Oberflächenmerkmale der Zellen. Dabei gibt der Vorwärts-“Scatter“ (FSC) Aufschluss über das Zellvolumen (die Zellgröße), der Seitwärts-“Scatter“ (SSC) vermittelt Informationen zur Granularität der Zellen und ihrer Binnenstruktur [45].

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde der FC-Puffer zum Waschen und zur Verdünnung der Antikörper eingesetzt. Zur Markierung der Zellstrukturen wurde die Zellsuspension für 30 Minuten mit einem Primärantikörper und im Anschluss mit dem grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper für 30 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert. Alternativ konnten die Zellen mit einem fluoreszierenden Primärantikörper direkt markiert werden. Anhand eines unspezifischen IgG-Antikörpers in gleicher Konzentration resultierte die Isotypenkontrolle im Durchflusszytometer. Die Bestimmung der Epithelzellen erfolgte anhand des Vorwärts- und Seitwärts-Scatters. Eine zusätzliche Markierung mit einem Anti-EPCAM-Antikörper (1:20) verifizierte den Zelltyp. Zur Abgrenzung von intralaminären Lymphozyten wurden diese durch den Anti-CD45-Antikörper (1:50) markiert.

Zur Ermittlung der C3b-Deposition auf MAB wurde das gewonnene Bakterienpellet aufgetaut und auf dem Vortexer durchmischt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um bakterielles Wachstum zu vermeiden. 20 µl der Suspension wurden in ein neues Röhrchen überführt und anschließend bei 12 000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Bakterien in 200 µl FC-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurden 40 µl des Primärpuffers (Anti-C3b-Antikörper, 1:10) und 10 µl Intratec (1:25) appliziert. Zu einer Probe wurden 10 µl 7AAD hinzugefügt, sodass diese als Negativkontrolle fungierte. Nach 30 Minuten auf Eis erfolgte ein dreimaliges Waschen mit jeweils 100 µl FC-Puffer für drei Minuten bei 12 000 x g. Die Bakterien wurden anschließend in 50 µl des Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 488, 1:1000) resuspendiert. Wieder wurde die Lösung für 30 Minuten auf Eis gelagert und wie oben beschrieben drei Mal gewaschen. Es folgte die Resuspension der Bakterien in 200 µl FC-Puffer. Wieder wurden die Proben nach gleichem Schema zweimal gewaschen.

Die Ergebnisse wurden als Punktwolke und arithmetische Mittelwerte der Fluoreszenzintensität angegeben.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand des Mann-Whitney-Tests und des Two-wayANOVA mit anschließender Bonferroni Analyse durch das Auswertungsprogramm GraphPad Prism 5.0. Zur Beschreibung der Ergebnisse wurden Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) ermittelt. Als signifikant galten p-Werte $\leq 0,05$. Folgende Signifikanzniveaus wurden benutzt: $p \leq 0,001$ (hochsignifikant, ***), $p \leq 0,01$ (sehr signifikant, **) und $p \leq 0,05$ (signifikant, *).

3. Ergebnisse

3.1 IEC-1 und Mode-K exprimieren hauptsächlich C3 auf mRNA-Ebene

Die Produktion von Komplementfaktoren und ihrer Rezeptoren in Zellen des Intestinums ist Bestandteil einiger Arbeiten [1, 61, 119]. In dieser Arbeit wird die Produktion der Komplementfaktoren in intestinalen Epithelzelllinien und primären isolierten murinen Epithelzellen systematisch eruiert. Es erfolgte die Untersuchung der Komplementfaktoren und Anaphylatoxinrezeptoren im Rahmen bakterieller Entzündungen im Darm *in vitro*, sowie unter DSS-Bedingungen *in vivo*.

Abbildung 2 zeigt das initiale Screening der murinen duodenalen Epithelzelllinie Mode-K auf die mRNA-Produktion von Komplementfaktoren unter konstitutiven Bedingungen. Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte Produktion von C3 mRNA ($M=14.201 \pm 1.222$) unter konstitutiven Bedingungen, die signifikant oberhalb der mRNA Expression von KC ($M=6.210 \pm 1.563$; $p<0,001$) liegt. CFB wird nur geringfügig exprimiert ($M=112,3 \pm 24,73$).

Abbildung 3 zeigt das initiale Screening der murinen Dünndarmepithelzelllinie IEC-1 auf die mRNA-Produktion von Komplementfaktoren unter konstitutiven Bedingungen. Auch in dieser Zelllinie des Dünndarms wurde eine signifikant vermehrte Expression von C3 mRNA ($M=62.457 \pm 6.018$) im Vergleich zu KC ($M=7.365 \pm 873,1$) aufgezeigt ($p<0,001$). Auch in dieser Zelllinie wird CFB nur in geringer Konzentration exprimiert ($M=98,3 \pm 33,92$).

In beiden Ansätzen konnte keine mRNA Expression für C1qA, C2 und C4-C9 gemessen werden.

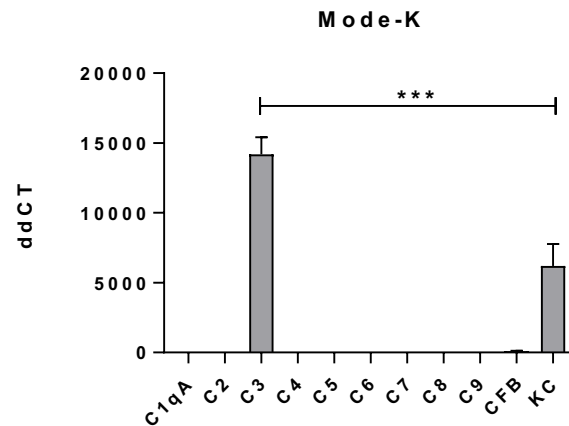


Abbildung 2: Real-Time PCR. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (C1qA (n=0), C2 (n=5), C3 (n=8), C4 (n=8), C5 (n=3), C6 (n=0), C7 (n=5), C8 (n=0), C9 (n=6), CFB (n=6), KC (n=8)) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen ACTB unter Kontrollbedingungen in der Zelllinie Mode-K. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen.

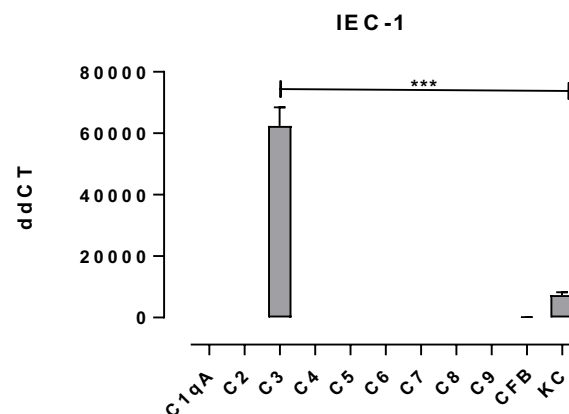


Abbildung 3: Real-Time PCR. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (C1qA (n=0), C2 (n=6), C3 (n=6), C4 (n=6), C5 (n=3), C6 (n=0), C7 (n=6), C8 (n=0), C9 (n=3), CFB (n=3), KC (n=8)) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen ACTB unter Kontrollbedingungen in der Zelllinie IEC-1. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter konstitutiven Bedingungen insbesondere C3 mRNA exprimiert wird. Daher sind im Folgenden dieser Faktor sowie sein Rezeptor C3aR Hauptbestandteil der Untersuchungen. In anderen Arbeiten [51] wurde dem Komplementfaktor C5 ebenfalls eine entscheidende Rolle im Rahmen von CED zugewiesen, sodass auch dieser Faktor und seine Rezeptoren C5aR und C5L2 im Folgenden weiter untersucht werden.

3.2 Murine intestinale Epithelzelllinie IEC-1 exprimiert C3 stärker als C5

Zur Überprüfung der konstitutiven Expression der Komplementfaktoren C3 und C5 sowie der Rezeptoren C3aR, C5aR und C5L2 auf RNA-Ebene in der murinen intestinalen Epithelzelllinie IEC-1, wurde eine Real-Time PCR durchgeführt (**Abbildung 4**).

Die Ergebnisse zeigen eine starke Expression des Komplementfaktors C3 ($M=62.457 \pm 6.018$) sowie eine mäßige Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR ($M=53,12 \pm 26,82$) in IEC-1. Nur schwache Signale zeigen sich für den Komplementfaktor C5 und seine Rezeptoren C5aR1 und C5aR2. Somit wird in IEC-1-Zellen der Komplementfaktor C3 signifikant stärker exprimiert als C5 ($M=20,28 \pm 18,22$; $p<0,001$).

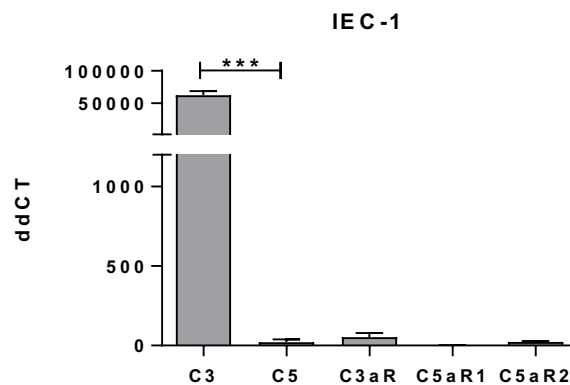


Abbildung 4: Real-Time PCR. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von C3 (n=6), C5 (n=3), C3aR (n=11), C5aR1 (n=3) und C5aR2 (n=3) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen ACTB unter Kontrollbedingungen in der Zelllinie IEC-1. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen.

Zusätzlich wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (**Abbildung 6**), um die mRNA-Expression der Komplementfaktoren in der Zelllinie nachzuweisen. Das Gel zeigt das Vorhandensein von C3 mRNA sowie von C3aR mRNA in IEC-1. Die cDNA-Bande des β -Actins ist deutlich positiv.

3.3 Murine intestinale Epithelzelllinie Mode-K exprimiert C3 stärker als C5

In der intestinalen Epithelzelllinie Mode-K wurde ebenfalls die konstitutive Expression der Komplementfaktoren C3 und C5 sowie die Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 auf RNA-Ebene anhand einer Real-Time PCR überprüft (**Abbildung 5**).

Auch in dieser Zelllinie zeigt sich eine schwache konstitutive Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR ($M=270,1 \pm 44,99$). Desweiteren wird der Komplementfaktor C3 ($M=14.201 \pm 1.222$) in signifikant höheren Konzentrationen exprimiert als der Komplementfaktor C5 ($M=4.581 \pm 3.117$; $p<0,001$). Eine mRNA-Expression der Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 war nicht nachweisbar.

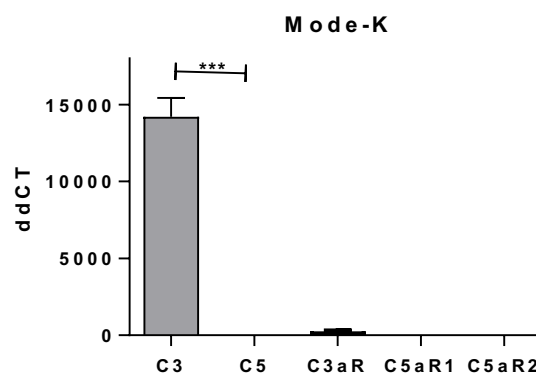


Abbildung 5: Real-Time PCR. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von C3 (n=8), C5 (n=4), C3aR (n=12), C5aR1 (n=4) und C5aR2 (n=10) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen ACTB unter Kontrollbedingungen in der Zelllinie Mode-K. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen.

Wiederum wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der mRNA-Expression der entsprechenden Gene durchgeführt. Das Gel (**Abbildung 6**) zeigt eine deutliche cDNA-Bande von C3 und β -Actin in Mode-K-Zellen. Schwache cDNA-Banden zeichnen sich jeweils für C3aR und C5aR1 ab, C5 und C5aR2 bilden keine cDNA-Bande.

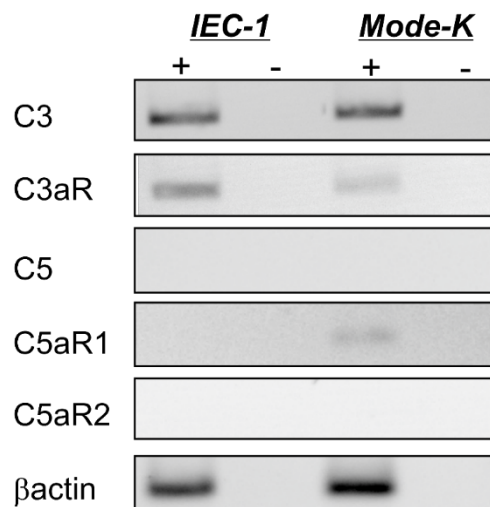


Abbildung 6: semi-quantitative PCR. Abgebildet sind die cDNA-Banden der Komplementfaktoren C3 und C5 und der Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 (=C5L2), sowie β -Actin, aus dem Isolat der murinen intestinalen Epithelzelllinien IEC-1 und Mode-K. Jeweils mit (+) und ohne (-) Zugabe der Reversen Transkriptase.

3.4 C3 mRNA Expression in IEC-1 wird durch LPS Stimulation gesteigert

Die intestinalen Epithelzellen produzieren konstitutionell C3 mRNA. Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Produktion durch bakterielle Zellwandbestandteile (sog. PAMPs/DAMPs) stimulieren bzw. regulieren lässt. Um diese Frage zu klären, wurden die IEC-1-Zellen für 24 h mit verschiedenen PAMPs in steigenden Konzentrationen stimuliert und die C3 mRNA Expression anhand von Real-Time-PCR ermittelt.

Abbildung 7 zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der C3-Expression bei Stimulation der Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS). Unter Stimulation der IEC-1 mit Flagellin, Muramyldipeptiden (LD-MDP) und Peptidoglykanen (PDG) zeigte sich kein signifikanter Anstieg der C3 mRNA Expression.

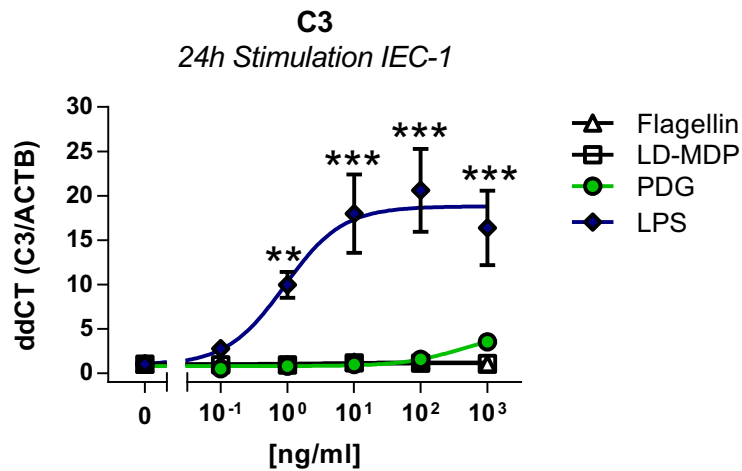


Abbildung 7: Real-Time PCR. Relative C3-mRNA-Produktion in IEC-1 nach Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Stimuli in steigender Konzentration über 24 h (n=3). Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

Die Stimulation mit LPS (**Abbildung 8**) zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der C3-Expression auf ein signifikantes Niveau ab 1 ng/ml LPS ($0 \text{ ng/ml: } M=1,03 \pm 0,03$; $1 \text{ ng/ml: } M=10,0 \pm 1,48$; $p<0,01$). Ab einer Konzentration von 10 ng/ml ($10 \text{ ng/ml: } M=17,98 \pm 4,40$; $100 \text{ ng/ml: } M=20,62 \pm 4,70$; $1000 \text{ ng/ml: } M=16,36 \pm 4,21$; $p<0,001$) scheint sich ein Plateau der C3-Expression einzustellen, eine weitere Erhöhung der LPS-Konzentration scheint keine weitere Steigerung der C3-Expression mehr herbeizuführen.

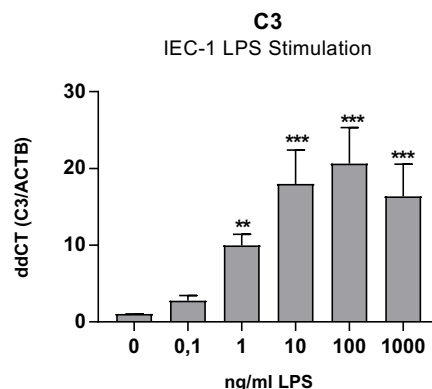


Abbildung 8: Real-Time PCR. Relative C3-mRNA-Produktion in IEC-1 nach Stimulation mit LPS in steigenden Konzentrationen über 24 h (n=3). Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

Ein weiterer Versuch zeigt neben dem konzentrationsabhängigen auch einen zeitabhängigen Anstieg der C3 mRNA Expression bei Stimulation mit LPS (**Abbildung 9**). Die Stimulation mit 100 ng/ml LPS zeigt bereits nach 3 h einen leichten Anstieg der C3-Expression, der im Verlauf eskaliert und nach 24 h einen signifikanten Wert von $M=25,54 \pm 1,91$ ($p<0,001$) und nach 48 h sogar $M=33,15 \pm 6,47$ ($p<0,001$) erreicht (t_0 : $M=0,93 \pm 0,08$).

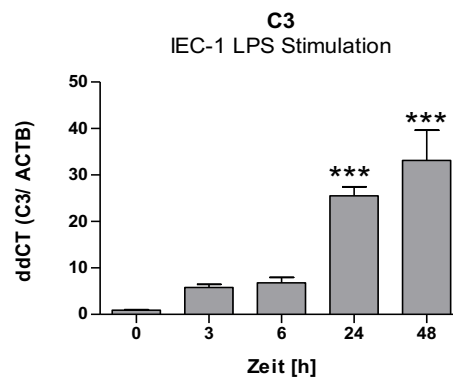


Abbildung 9: Real-Time PCR. Relative C3-mRNA-Produktion in IEC-1 nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS über verschiedene Stimulationsdauer ($n=4$, t_0 : $n=8$). Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.5 Expression von TLR auf IEC-1 und Mode-K

Abbildung 10 zeigt die Real-Time PCR der Toll-like-Rezeptoren 1-9 und 10-13 in den Epithelzelllinien IEC-1 und Mode-K. In beiden Zelllinien kommt es konstitutiv zu einer hohen mRNA-Expression der TLR2 und 4 (IEC-1: $TLR2$: $M=39.400 \pm 4.675$; $TLR4$: $M=27.250 \pm 6.101$; Mode-K: $TLR2$: $M=44.306 \pm 4.595$; $TLR4$: $M=69.201 \pm 14.613$). Auch mRNA des TLR3 wird in beiden Zelllinien moderat produziert (IEC-1: $M=6.505 \pm 337,2$; Mode-K: $M=3.953 \pm 1.007$). Des Weiteren konnte eine geringe mRNA-Expression für die TLR1, TLR5-7 und TLR13 detektiert werden. Keine mRNA konnte dagegen für die TLR8-12 nachgewiesen werden.

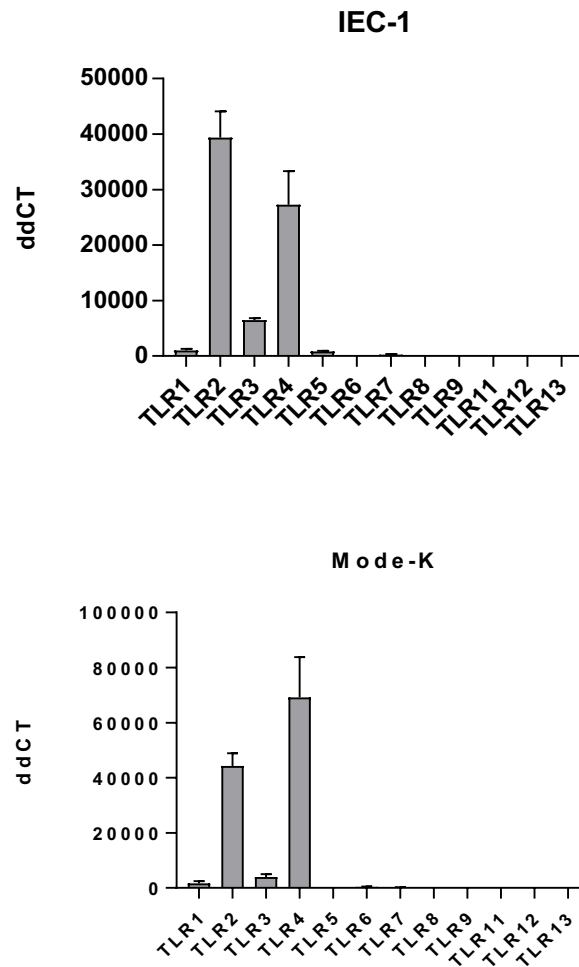


Abbildung 10: Real-Time PCR. Relative TLR mRNA Expression in IEC-1 und Mode-K (TLR1-9, TLR11-13; n=3). Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.6 LPS stimuliert die C3-Proteinexpression in IEC-1

Da der Komplementfaktor seine Funktionen nur erfüllen kann, wenn er über die mRNA-Ebene hinaus auch auf Proteinebene produziert wird, wurde die C3-Proteinproduktion anhand eines Western Blot Experiments überprüft. Verglichen wurden die Zelllysate, sowie die Überstände der Zellkultur mit und ohne LPS-Stimulation. Zur Kontrolle wurde ein Housekeeping-Protein (β -Actin) mitbestimmt, welches sowohl unter konstitutionellen Bedingungen als auch unter LPS-Stimulation gebildet wird.

Abbildung 11 zeigt die Isolation des C3-Proteins und dessen Spaltprodukte aus IEC-1-Zellen und deren Überstände unter Stimulation mit 10, 100 und 1000 ng/ml LPS und ohne Stimulation. Sowohl in den zellulären Proteinextrakten als auch in den Extrakten der

Überstände zeigt sich die C3-Proteinbande unter Stimulation mit LPS verstärkt. In den Überständen finden sich nur geringe Mengen des vollständigen C3 Proteins, die Banden der α -Kette sind dagegen sehr stark ausgeprägt und deuten auf eine Spaltung des C3 Proteins hin.

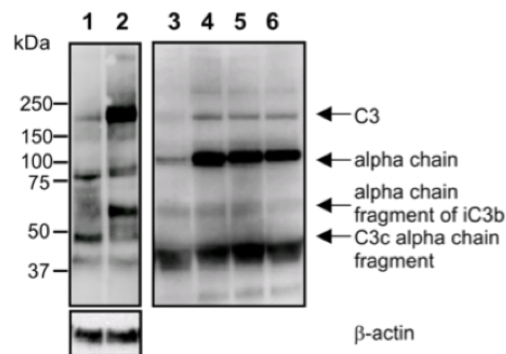


Abbildung 11: Western Blot zellulärer Proteinextrakte (1+2) und der Überständen (3-6) von unbehandelten (1+3) oder mit LPS stimulierten (2, 4-6) IEC-1-Zellen. Spalte 2 und 5: 100 ng/ml LPS; Spalte 4: 1000 ng/ml LPS; Spalte 6: 10 ng/ml LPS für jeweils 24 h. β -Actin als Positivkontrolle.

3.7 Isolation von primären intestinalen Epithelzellen (pIEZ) der Maus

Um eine differenziertere Aussage über die intestinale C3 Expression treffen zu können, wurde eine Isolation von primären Epithelzellen des murinen Intestinums mithilfe ilealer und kolonischer Biopsieproben durchgeführt.

Eine Markierung des epithelspezifischen Antigens EpCam und dessen Messung in der Durchflusszytometrie (**Abbildung 12**) bestätigt den Erfolg der Isolation. Ein niedriger Wert des CD45-Antigens steht für eine geringe Verunreinigung der isolierten Zellen mit CD45-positiven Leukozyten.

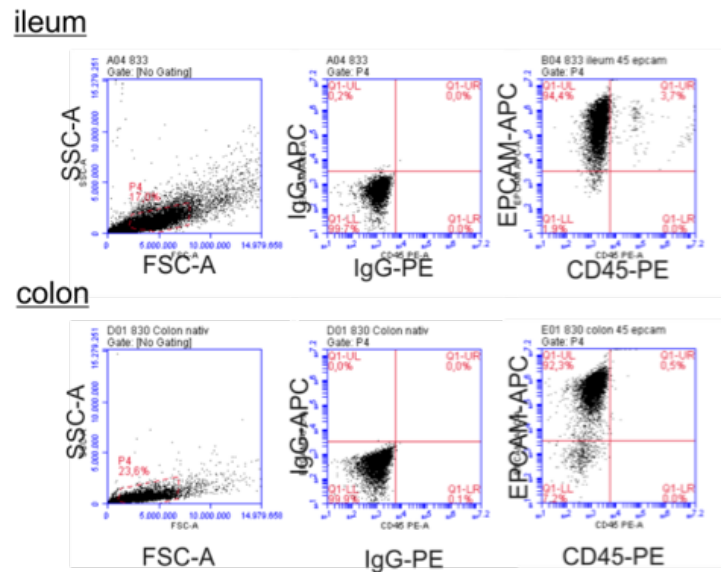


Abbildung 12: Durchflusszytometrie. Isolation primärer intestinaler Epithelzellen (pIEZ) aus ilealen und kolonischen Biopsien der Wildtyp-Mäuse.

3.8 pIEZ exprimieren C3 und Komplementrezeptoren auf RNA-Ebene

Im Anschluss an deren Isolierung wurde auch in primären Epithelzellen die mRNA-Expression in Bezug auf das Komplementsystem anhand von Real-Time-PCR charakterisiert.

Der Faktor C5 wird im Epithel des Kolons (**Abbildung 14A**) exprimiert ($M=4.580 \pm 2.516$), das Epithel des Ileums (**Abbildung 13**) weist nur eine sehr geringe C5 mRNA-Produktion ($M=0,93 \pm 0,77$) auf. Die Abbildungen zeigen, dass der Komplementfaktor C3 sowohl im Dünndarm ($M=1.480 \pm 582,6$), als auch im Dickdarm ($M=59.001 \pm 14.844$) in hoher Konzentration auf mRNA-Ebene exprimiert wird. In beiden Darmabschnitten zeigt sich eine signifikant höhere mRNA-Expression des Komplementfaktors C3 im Vergleich zum Komplementfaktor C5 (*Ileum*: $p<0,01$; *Kolon*: $p<0,001$). **Abbildung 14B** verdeutlicht zudem den deutlich höheren Anstieg der C3 mRNA Expression in primären Zellen des Kolons im Gegensatz zu den Epithelzellen des Ileums. Der C3aR zeigt unter den Komplementrezeptoren die stärkste Expression (*Ileum*: $M=107,3 \pm 31,12$; *Kolon*: $M=2714 \pm 1374$). Der C5aR1 wird im Ileum kaum auf mRNA-Ebene exprimiert ($M=0,36 \pm 0,16$). Im Kolon ist die Expression ebenfalls gering ausgeprägt ($M=197,4 \pm 197,4$). Auch der C5aR2 (C5L2) wird in beiden Darmabschnitten nur sehr gering auf mRNA-Ebene exprimiert (*Ileum*: $M=24,02 \pm 14,70$; *Kolon*: $M=5,64 \pm 5,64$).

Abbildung 14C zeigt die Extraktion des Komplementfaktors C3 und seiner Spaltprodukte aus unstimulierten pIEZ des Ileums und des Kolons anhand eines Western Blots. Die Banden der Proteinextraktion aus Ileumepithelzellen zeigen dabei keine deutliche Bande des gesamten C3-Proteins. Die Banden der Spaltprodukte α -Kette, α -Kette des iC3b und C3c stellen sich schmal und deutlich in entsprechender Größe dar. Die Proteinextraktion aus kolonischen Epithelzellen ergibt deutliche Banden für den Faktor C3. Auch für die Spaltprodukte α -Kette, α -Kette des iC3b und C3c lassen sich im Ansatz Nr.6 schwache Banden erkennen.

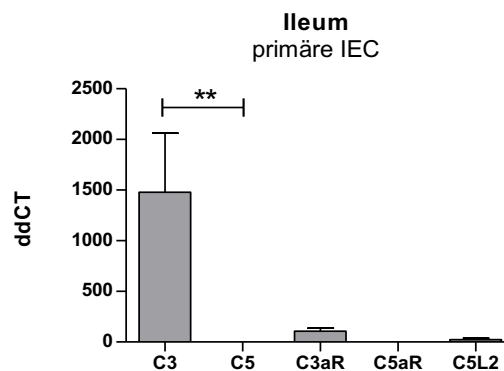


Abbildung 13: Real-Time PCR. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (C3, C5, C3aR, C5aR und C5L2) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen ACTB unter Kontrollbedingungen in den primären IEC des Ileums. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen (n=4).

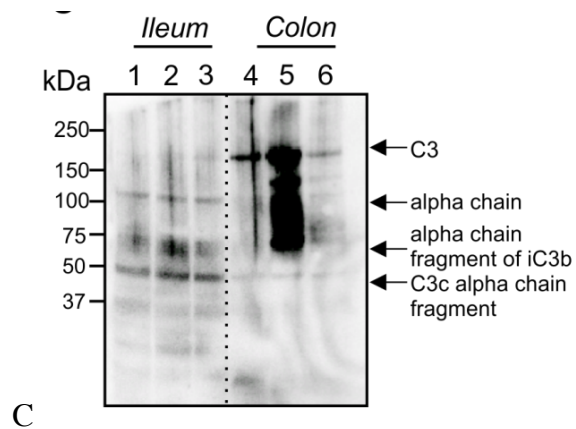
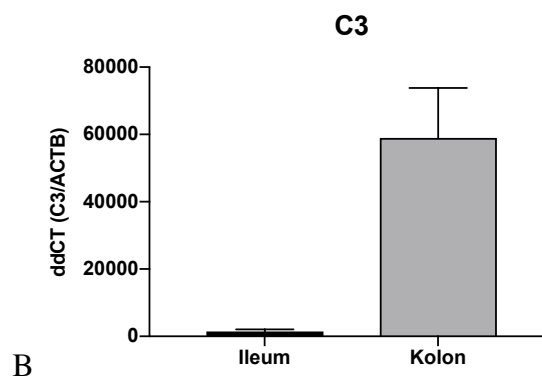
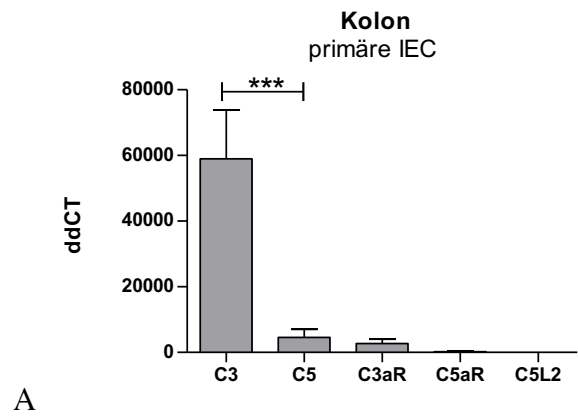


Abbildung 14: Real-Time PCR und Western Blot. (A) Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (C3, C5, C3aR, C5aR und C5L2) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen ACTB unter Kontrollbedingungen in den primären IEZ des Colons. (B) Vergleich der relativen C3 mRNA Expression in primären IEZ von Kolon und Ileum. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen (n=4). (C) Western Blot der C3-Expression in pIEZ des Ileums (1-3) und des Colons (4-6)

3.9 LPS Stimulation erhöht die C3-Expression in pIEZ

In Konsequenz zu den positiven Stimulationsergebnissen in den Zelllinien, wurde ebenfalls eine Stimulation der isolierten primären Epithelzellen mit 100 ng/ml LPS durchgeführt (**Abbildung 15**). Nach dreistündiger Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der C3 mRNA Produktion (*ctrl*: $M=2,63 \pm 0,82$; *LPS*: $M=4,08 \pm 1,16$; $p<0,05$).

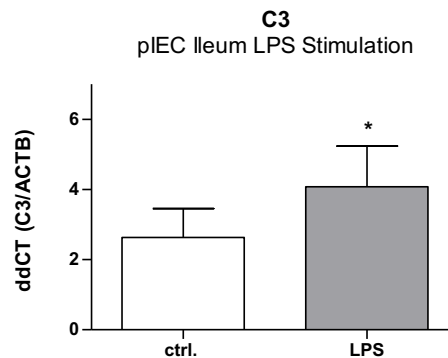


Abbildung 15: Real-Time PCR. Relative C3-mRNA-Produktion in primären IEC des Ileums zu Kontrollbedingungen (ctrl.) im Vergleich zur Stimulation mit 100 ng/ml LPS für 3 h (n=10). Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus unabhängigen Experimenten mit Zweifachansätzen.

3.10 pIEZ der DSS-Mäuse exprimieren mehr C3 als pIEZ der Kontrollmäuse

Im Rahmen des etablierten DSS-Modells entsteht ein Kolitis-ähnliches Entzündungsbild im GIT der Maus [74, 114]. Es erfolgte ein Vergleich der komplementassoziierten mRNA-Produktion in primären Epithelzellen der Kontrollmäuse gegenüber der pIEZ von DSS-Mäusen (**Abbildung 16**). Die Ergebnisse zeigen, dass sich während der Entzündung keiner der Komplementrezeptoren in ihrer Expression signifikant steigert (*C3aR* $p=0,64$; *C5aR* $p=0,83$; *C5L2* $p=0,62$). Auch CFB wird in den pIEZ der DSS-Mäuse nicht verstärkt exprimiert ($p>0,05$). Der Komplementfaktor C3 wird in den primären Epithelzellen der DSS-Mäuse dagegen signifikant ($p<0,05$) höher exprimiert ($M=16.150 \pm 2.693$) als in den Kontrollmäusen ($M=4.080 \pm 1.976$). Der Komplementfaktor C5 konnte auf mRNA-Ebene nicht detektiert werden.

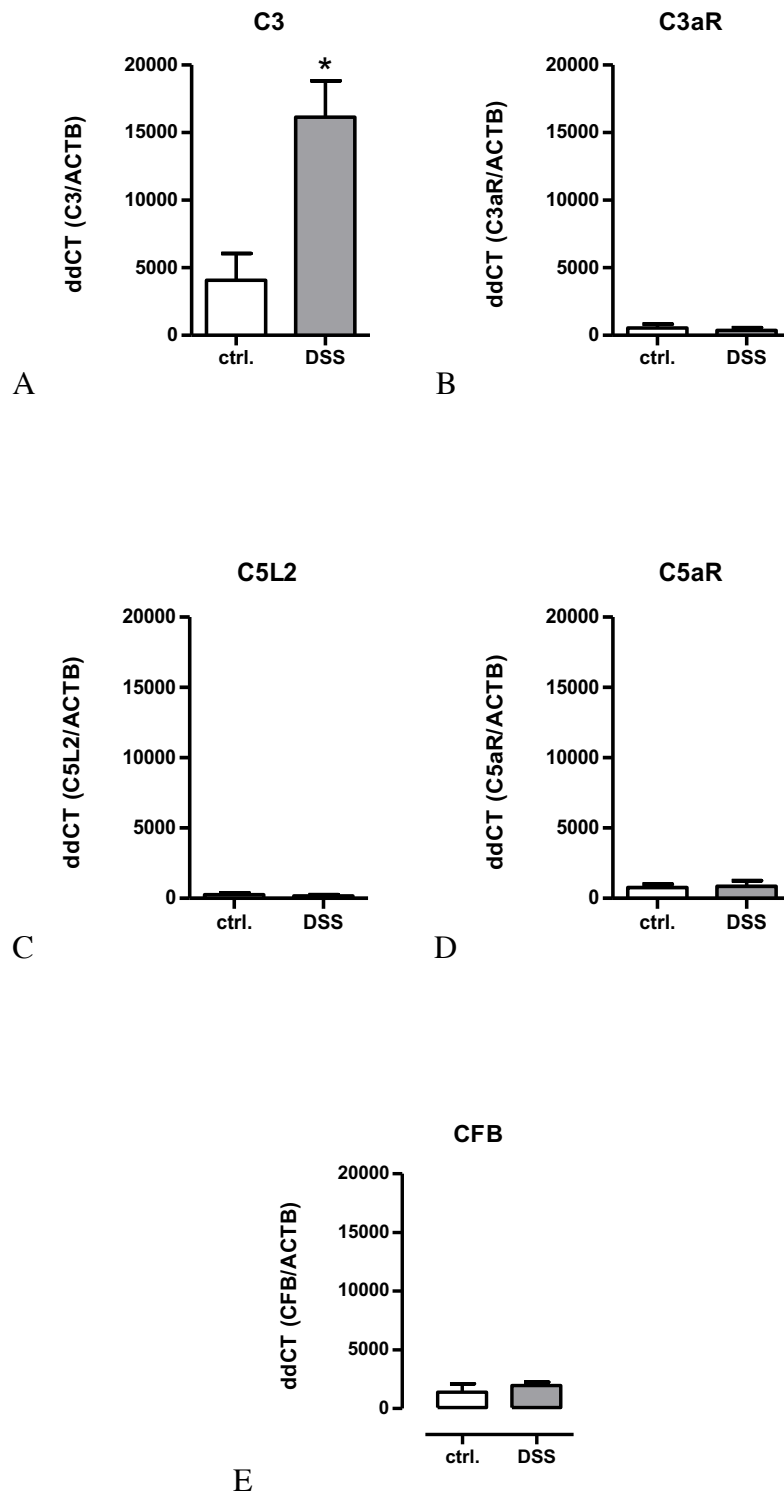


Abbildung 16: Real-Time PCR. Relative mRNA-Expression verschiedener Komplementfaktoren und -rezeptoren zu Kontrollbedingungen und im DSS-Versuch (n=4, CFB: n=2) in pIEZ des Ileums. (A) C3 (B) C5 (C) C5L2 (D) C5aR (E) CFB

3.11 Stärkere C3 Expression im Darm der DSS-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen

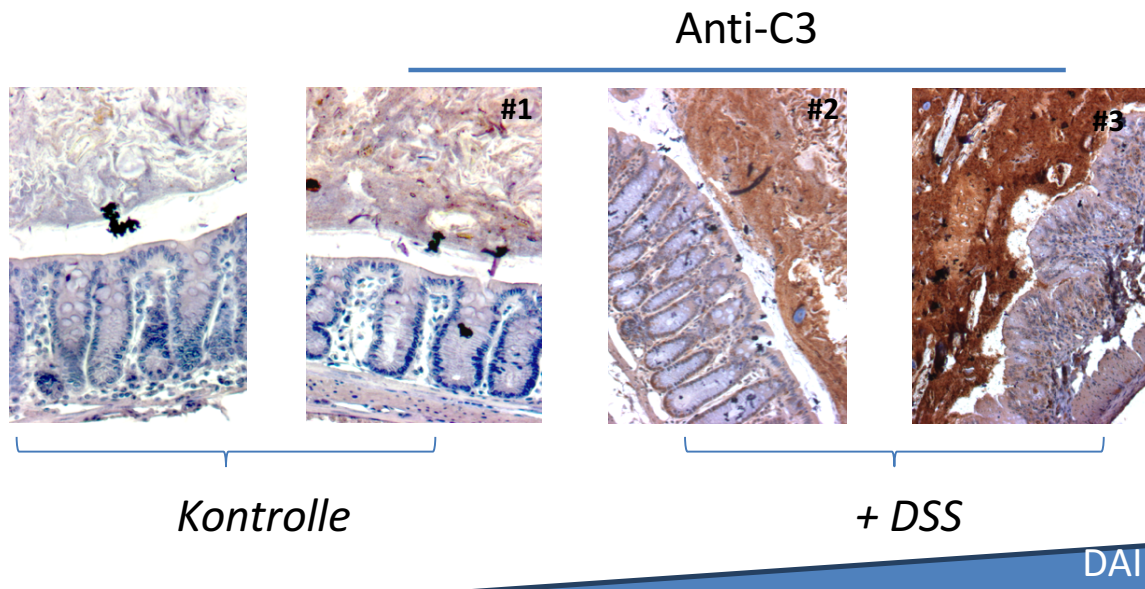


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung. 10-fache Vergrößerung. Abgebildet sind repräsentative Biopsien aus murinen Kolonabschnitten im Rahmen eines 2%igen DSS-Versuchs. Eine Markierung von C3 wurde durch eine IHC mit einem Anti-C3-Antikörper in den histologischen Schnitten #1, #2 und #3 durchgeführt. #2 und #3 entsprechen Mäusen des DSS-Versuchs, #1 entspricht einer Kontrollmaus. Die Entzündungsaktivität (Disease Activity Index (DAI)) ist aufgezeigt.

Zur abschließenden Exploration der C3-Produktion im Rahmen einer chronischen intestinalen Entzündung wurde eine *in vivo*-Untersuchung unter DSS-Bedingungen durchgeführt. **Abbildung 17** zeigt die immunhistochemische Färbung von Darmmukosa und -mukus unter Kontroll- und unter DSS-Bedingungen mit einem Anti-C3-Antikörper. Unter Kontrollbedingungen zeigt sich nur eine geringe C3-Konzentration in den mukosalen Zellen der Darmwand und dem luminalen fäkalen Darminhalt. Nach Abschluss des DSS-Versuchs steigt sowohl auf mRNA-Ebene (#1=1,61; #2=5,6; #3=18,38) (**Abbildung 18A**), als auch auf Proteinebene (**Abbildung 17**) die C3-Konzentration in Korrelation zur Entzündungsaktivität (engl. disease activity index, DAI). Die Intensität der C3-Färbung (braun) in der Lamina Propria, den Epithelzellen und dem fäkalen Darminhalt ist insbesondere in den histologischen Schnitten #2 und #3 verstärkt, die den Tieren des DSS-Versuchs entstammen und einen hohen DAI erzielen.

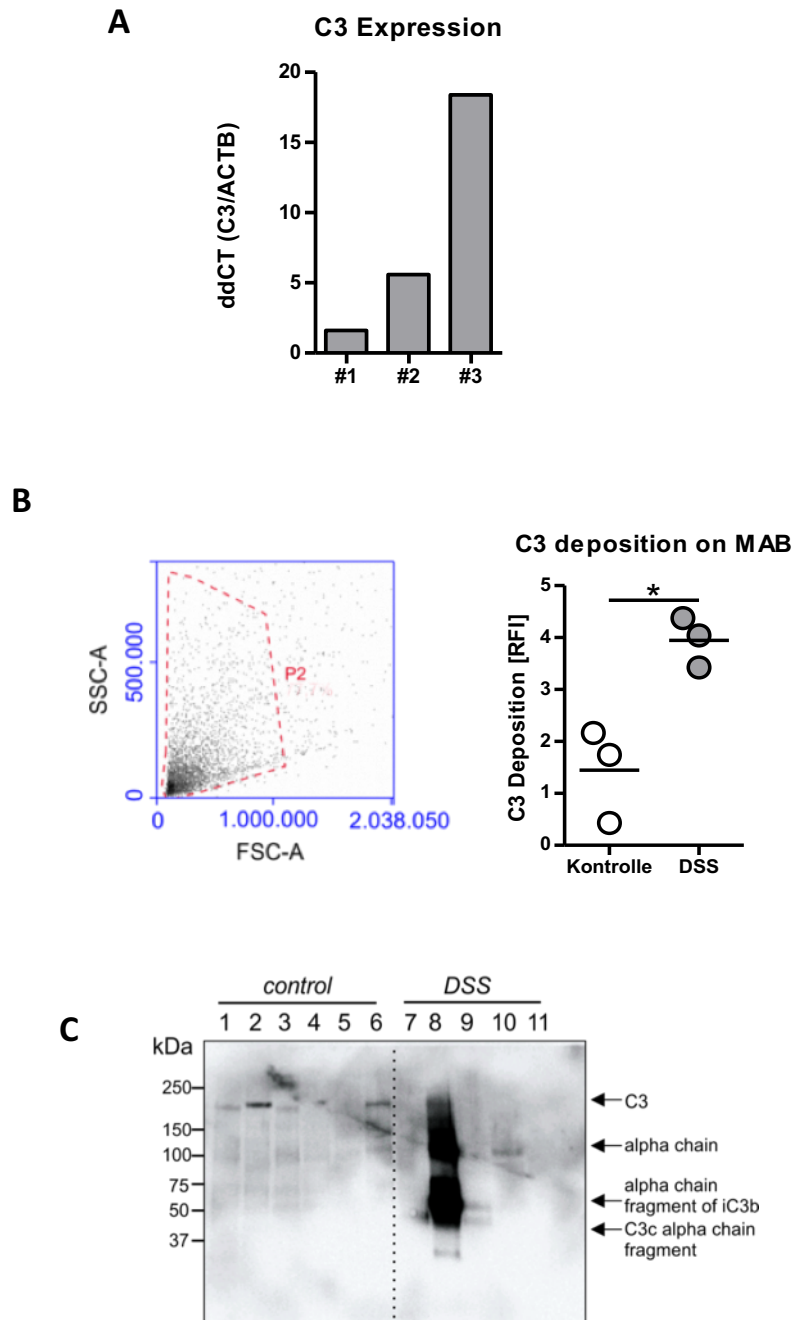


Abbildung 18: (A) **Real-Time PCR.** C3 mRNA Expression in Kolonbiopsien aus Abb. 17. (B) **Durchflusszytometrie.** C3 Deposition auf kolonischen MAB (je n=3). Die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des Anti-C3-AK wurde auf die MFI eines irrelevanten Kontroll-AK bezogen. (C) **Western Blot.** C3-Proteinexpression in Stuhlproben von DSS-Versuchstieren (7-11) und Kontrolltieren (1-6).

Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurde die C3-Deposition auf Mukosa-assoziierten Bakterien (engl. Mucosa-attached bacteria, MAB) untersucht (**Abbildung 18B**). Im Vergleich zu den Kontrolltieren, konnte in Darmabschnitten von Tieren des DSS-Versuchs eine erhöhte C3-Deposition auf MAB festgestellt werden (*Kontrolle: $M = 1,45 \pm 0,52$; DSS: $M = 3,95 \pm 0,28$; $p = 0,013$*).

Abbildung 18C zeigt die Western Blot Analyse des Stuhls von DSS-Versuchstieren im Vergleich zu dem Stuhl von Kontrolltieren bezogen auf die C3-Proteine und seine Spaltprodukte. In den Proben der Kontrolltiere (insbesondere 1,2,3,6) stellt sich eine C3-Bande dar. Die Banden der Spaltprodukte sind nur sehr schwach ausgeprägt (Probe 3). In den Stuhlproben der DSS-Tiere kann das murine C3-Gesamtprotein nicht detektiert werden. In den Proben 9 und 10 konnten aber die Proteine der α -Kette, α -Kette des iC3b und C3c in Form einer schmalen Bande nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Es gibt einige Hinweise auf eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathophysiologie von CED. In der vorliegenden Arbeit wurde eine systematische Charakterisierung der Komplementfaktoren in murinen Epithelzelllinien und pIEZ vorgenommen und die Expression des Komplementfaktors C3 unter bakterieller Stimulation und während einer chemisch-induzierten chronischen intestinalen Entzündung der Maus untersucht.

4.1 Murine Epithelzelllinien und primäre IEZ exprimieren Komplementfaktoren

Bereits 1993 wiesen *Andoh et al.* anhand von SDS-PAGE und ELISA die Produktion von C3, C4 und fB (CFB) in der humanen kolorektalen Karzinomzelllinie Caco-2 nach. Des Weiteren zeigten sie, dass die Expression der Komplementfaktoren nicht nur konstitutiv stattfindet, sondern auch durch verschiedene Zytokine wie z.B. IL- β und TNF- α gesteigert werden kann [2]. 1996 zeigte die gleiche Arbeitsgruppe auch in der IEC-6 Zelllinie, einer nicht-transformierten Kryptenzell-ähnlichen Zelllinie der Ratte, eine konstitutive C3 mRNA Expression auf [3]. Im selben Jahr untersuchte die Arbeitsgruppe um *Bernet-Camard et al.* die Produktion von Komplementfaktoren und -regulatoren in humanen intestinalen Zelllinien. Sie wiesen anhand von indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie sowohl in den humanen Adenokarzinom-Zelllinien T84 und HT-29, als auch in den humanen embryonalen Darmzellen INT407 und einem Caco-2-Stamm die Produktion der Komplementfaktoren C3 und C4, nicht aber die Expression von C5 und C5b-C9 nach [7].

Die Expression des Rezeptors C3aR kann, wie einleitend erwähnt, in vielen Geweben auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, wobei die Intensität jedoch stark variiert. Das Protein konnte bisher u.a. aus endothelialen und epithelialen Zellen isoliert werden [21, 57].

Im Rahmen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie wurde die Expression der Komplementfaktoren und -rezeptoren in den Zelllinien IEC-1 und Mode K untersucht. Bei

diesen Zelllinien handelt es sich um murine Zelllinien des Dünndarms (Mode K: Duodenum; IEC-1: E 19 embryonale Dünndarmzellen) [98, 110].

Die erlangten Ergebnisse zeigen ebenfalls eine konstitutive Expression von C3 mRNA in beiden Zelllinien, die signifikant oberhalb der KC mRNA Expression liegt. Der Vergleich zu KC, welches dem humanen Interleukin-8 (IL-8) entspricht und als Chemokin vieler Epithelzellen fungiert, erlaubt eine relative Aussage zur Höhe der mRNA-Expression der Komplementfaktoren. Der Komplementfaktor CFB wurde nur geringfügig auf mRNA-Ebene exprimiert. mRNA des Faktors C1q als Vertreter des CP, sowie C6-C9 als Bestandteile des MAC konnten nicht detektiert werden. In weiteren Ansätzen zeigt sich eine signifikant höhere mRNA-Produktion des Faktors C3 im Vergleich zu Faktor C5. Unter den Rezeptoren ließ sich in beiden Zelllinien mRNA für C3aR nachweisen. Eine sehr geringe Expression des C5aR2 konnte in Mode-K nachgewiesen werden. Der C5aR1 wird weder in IEC-1 noch in Mode-K exprimiert. Diese Ergebnisse stellen eine mögliche Relevanz von C3 im Gegensatz zu anderen Komplementfaktoren heraus.

Mittels semiquantitiver PCR wurde die mRNA-Produktion der Komplementbestandteile validiert. Die Ergebnisse decken sich insgesamt mit denen der quantitativen RT-PCR, so zeigen sich deutliche C3-Banden. In Proben der IEC-1 bildet sich eine deutliche C3aR-Bande – ganz im Gegensatz zu den Proben der Mode-K, die nur eine schwache C3aR-Bande aufweisen. Ebenfalls nur in Mode-K zeichnet sich eine leichte Bande für C5aR1 ab, die sich in den Ergebnissen der RT-PCR kaum widerspiegelt.

Auch *Klos et al.* zeigten 2009, dass die Expression von C5aR1 auf epithelialen Zellen eher unwahrscheinlich ist [57]. *Cao et al.* wiesen 2012 dagegen die Produktion von C5aR1-mRNA in diversen kolorektalen Zelllinien (T84, HT29, Caco-2) nach [15]. Dieser unterschiedliche Befund ist eventuell dadurch zu erklären, dass es sich bei Mode-K-Zellen um duodenale Zellen handelt, die ein anderes Expressionsmuster als kolonische Epithelzellen aufweisen.

Insgesamt zeigt sich unter konstitutiven Bedingungen eine signifikante mRNA-Expression des Komplementfaktors C3. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit denen vorangegangener Arbeiten insofern, als dass C3 in intestinalen Epithelzelllinien in hoher Konzentration exprimiert wird, andere Komplementfaktoren dagegen wenig bis gar nicht exprimiert werden. In den untersuchten Dünndarmzelllinien konnten C4 und CFB nicht verstärkt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen

von z.B. *Andoh et al.*, die 1993 eine vermehrte Expression von C3, C4 und CFB in der Kolonzelllinie Caco-2 nachgewiesen hatten.

Um die bisherigen Ergebnisse in murinen Epithelzelllinien zu überprüfen, erfolgte die Isolierung primärer Epithelzellen (pIEZ) der Maus. Primäre IEZ zeigen unter Kontrollbedingungen eine deutliche C3 mRNA Expression, die signifikant höher ist als die C5 mRNA Expression. Unter den Rezeptoren wird C3aR auf mRNA-Ebene am stärksten exprimiert.

Eine Western Blot Analyse der Ileum- und Kolonzellen bestätigt eine konstitutionelle C3-Proteinproduktion, die im Kolon stärker ausgeprägt ist als im Ileum. Des Weiteren weist dieses Verfahren die Bildung von C3-Spaltprodukten nach.

4.2 Die Expression von C3 ist durch Lipopolysaccharide (LPS) stimulierbar

Murine intestinale Epithelzelllinien exprimieren konstitutionell C3 mRNA. Eine vermehrte Expression ist nach Stimulation der Zelllinien mit LPS zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen in IEC-1 einen konzentrationsabhängigen Anstieg der C3 mRNA Expression. Bei einer Stimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml LPS zeigt sich jeweils die stärkste Expression, bei 1000 ng/ml LPS bereits ein Abfall der Expression. Bereits bei drei- und sechsständiger Stimulation ist eine zeitabhängige Expressionssteigerung zu beobachten, die bei einer Stimulation für 24 und 48 h signifikant ist. Auch bei Stimulation der pIEZ mit LPS zeigt sich eine signifikant gesteigerte C3 mRNA Expression der Zellen. Eine Stimulation mit weiteren TLR-Liganden, wie z.B.: Flagellin, PDG oder LD-MDP, führte zu keinem signifikanten Anstieg der C3 mRNA Expression in IEC-1.

Ein Nachweis des C3-Proteins gelang mittels Western Blot Analyse. Diese zeigt die C3-Proteinexpression bereits innerhalb nicht-stimulierter IEC-1. Auch in den Überständen nicht-stimulierter Zellen ist das C3-Protein nachweisbar. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine kontinuierliche Expression und aktive Sekretion des Komplementfaktors C3.

Unter Stimulation mit LPS kommt es zu einer verstärkten C3 Proteinexpression innerhalb der Zelle, sowie zu einer stärkeren Proteinsekretion im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Des Weiteren zeigt sich eine Veränderung im Profil der C3-

Spaltprodukte. Während das gesamte C3-Protein unter LPS Stimulation nur noch in geringer Konzentration in den Überständen nachweisbar ist, zeichnet sich eine deutliche Proteinbande für die α -Kette des iC3b-Fragments ab. Dies deutet auf eine Aktivierung und Spaltung des Komplementfaktors C3 in C3a und C3b hin, in Folge dessen ereignet sich dann der weitere Abbau. CR1g auf Makrophagen bindet zellgebundenes iC3b, C3b und C3c und initiiert Phagozytose. Auch über CR3 und 4 kann iC3b die Phagozytose und Zytokinausschüttung stimulieren. Diese Mechanismen bilden mögliche Effektorfunktionen der vermehrten C3-Bildung und -Spaltung [17, 44].

DSS-Versuche zur Induktion von chronischen intestinalen Entzündungen an C3-defizienten Mäusen zeigten ein verschlechtertes Ergebnis der Versuchstiere gegenüber dem Wildtyp in Bezug auf Gewichtsentwicklung, Histopathologie, Inflammation und Mortalität [27]. Die oben beschriebenen Mechanismen zur Induktion der Phagozytose könnten einen wichtigen protektiven Mechanismus des Komplementsystems gegen Infektion und Mukosaschädigung in Rahmen von CED darstellen.

Es stellt sich im Folgenden die Frage, über welchen Signalweg es durch die LPS-Stimulation zu einer vermehrten C3-Expression kommt. Zum einen stellt LPS einen Liganden des TLR4 dar. Kommt es zur Bindung von LPS an TLR4, wird der Rezeptor aktiviert. Es folgt eine Dimerisierung des Rezeptors, eine Rekrutierung von Adapterproteinen und folglich die Aktivierung mehrerer Proteinkinasen (MyD88 in allen TLRs außer TLR3) [54, 102]. Für eine Entzündungsreaktion wichtige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, AP-1 und IRF3 (interferon regulatory factor 3), werden aktiviert. Es schließt sich eine vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine an [102]. *Pope et al.* stellten 2010 eine vermehrte Bildung von C3 und fB (CFB) in Folge einer TLR4-Aktivierung in intestinalen Zellen fest [85]. *Mogilenko et al.* wiesen eine TLR4-abhängige C3-Expression auch in Makrophagen nach [68].

Zum anderen scheint auch eine direkte Aktivierung der Komplementkaskade und somit parallele Aktivierung des angeborenen Immunsystems denkbar. So wird der klassische Weg des Komplements durch Antigen-Antikörper-Reaktion und C1q-Bindung, aber auch durch direkte C1q-Bindung aktiviert [12, 69]. Da unsere Zellen in vorangegangenen Versuchen keinen Anhalt für eine C1q-Expression zeigten, wird dieser Mechanismus in dem vorliegenden Fall für unwahrscheinlich gehalten.

Song et al. beobachteten in ihrer Arbeit, dass die TLR4-vermittelte C3-Expression durch das Regulatorprotein DAF moduliert wird. In DAF^{-/-}-Mäusen fiel die LPS-assoziierte Komplement- und Entzündungsreaktion stärker aus als in Kontrolltieren. In einem Erklärungsmodell kommt es demnach durch parallele Aktivierung des TLR4 und des Komplementsystems (C3aR-/C5aR-vermittelt) zu einer insgesamt stärkeren Aktivierung im Bereich der Proteinkinasen (MAPKs), welche in eine verstärkte Expression von Transkriptionsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen resultiert. DAF hemmt den beschriebenen Signalweg des Komplements durch Inhibition der C3- und C5-Konvertasen. *Song et al.* beschrieben DAF 2012 außerdem als Teil des TLR4, der somit bei Bindung von LPS an TLR4 mit aktiviert wird. Folglich bildet sich eine Feedback-Schleife und Regulation der LPS-assoziierten Immunantwort [62, 85, 102].

Um zu überprüfen, ob eine TLR4-vermittelte Immunantwort in murinen Epithelzelllinien möglich ist, erfolgte die Untersuchung ihrer TLR mRNA Expression. Es zeigte sich, dass beide Zelllinien die Rezeptoren TLR2 und TLR4 auf mRNA-Ebene exprimieren.

Die vorliegenden Ergebnisse führen zur Bildung folgender Hypothese: Unter Stimulation der intestinalen Zellen mit dem bakteriellen Stimulus LPS kommt es TLR4-vermittelt zu einer gesteigerten Expression des Komplementfaktors C3 auf mRNA- und Proteinebene. Zusätzlich wird C3 vermehrt sezerniert und prozessiert, sodass die Spaltprodukte C3a und C3b anfallen. Diese Spaltprodukte könnten zum einen als Anaphylatoxin und C3aR-Ligand fungieren (C3a) und zum anderen als Opsonin eine Phagozytose und proinflammatorische Zytokinantwort auslösen (C3b).

4.3 Primäre IEZ der DSS-Versuchstiere exprimieren mehr C3 als pIEZ der Kontrollmäuse

Mittels DSS-Versuch erfolgte die Untersuchung der Komplementfaktoren in intestinalen Epithelzellen von Mäusen mit chronischer intestinaler Entzündung. Der Vergleich der RT-PCR von pIEZ der DSS-Versuchstiere mit denen der Kontrolltiere zeigt lediglich in der Expression der C3-mRNA signifikante Unterschiede. Die Komplementfaktoren C5 und CFB sowie die Rezeptoren blieben durch die chronische Entzündung in ihrer Expression unbeeinflusst. Schlussfolgernd sind diese Faktoren und Signalwege (C3aR, C5, AP via CFB) daher für die chronische Entzündung gegebenenfalls nicht von großer Relevanz.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen des Weiteren eine stärkere C3 mRNA Expression in Darmanteilen mit hoher Entzündungsaktivität (DAI). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es erst bei großer Entzündungsaktivität und Mukosaschädigung zu einer Aktivierung der Komplementkaskade kommt. Eine alternative Erklärung liegt darin, dass es bei starker Entzündung zu größerer Präsenz von bakteriellen Stimuli am Epithel und somit zu einer stärkeren Aktivierung der TLR und anderer Vertreter des angeborenen Immunsystems kommt. Auch auf Proteinebene zeigt sich anhand der immunhistochemischen Färbung, dass die C3-Expression und -Sekretion in den Mukus mit steigender Entzündungsaktivität an Intensität gewinnt.

Eine Korrelation zwischen Komplementexpression und intestinaler Entzündung beschrieben auch *Hodgson et al.* und *Richens et al.* in CED Patienten [47, 51, 90].

2015 untersuchten *Elvington et al.* die Bedeutung des Komplements im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im DSS-Modell. Anhand von Knockout-Mäusen explorierten sie die Relevanz verschiedener Komplementfaktoren in Bezug auf die intestinale Entzündung. Auch ihre Ergebnisse stellen die Relevanz des Faktors C3, weniger CFB, im Rahmen der mukosalen Protektion im DSS-Modell heraus [27].

4.4 Gesteigerte C3-Spaltung und C3b-Deposition auf MAB in DSS-Versuchstieren

Unsere Ergebnisse weisen also sowohl im murinen Zelllinienmodell, als auch im *in vivo* Modell einer chronischen intestinalen Entzündung der Maus, auf eine gesteigerte C3-Expression und -Sekretion hin. Es stellt sich nun die Frage, welche Funktion C3 erfüllt.

C3 wird durch Proteasen zunächst in C3a und C3b gespalten. Das Anaphylatoxin C3a vermittelt seine Signale über den Rezeptor C3aR. Dieser, so zeigen insgesamt unsere Ergebnisse, wird in murinen Epithelzellen auf mRNA-Ebene exprimiert. Eine Modulation seiner Expression konnte durch bakterielle Stimuli oder das DSS-Modell nicht beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass C3aR im Rahmen dieser Entzündungsmodelle nicht vermehrt benötigt wird bzw. seine Kaskade nicht vermehrt abläuft.

Eine weitere Funktion vermittelt C3b als wichtiger Faktor des Alternativen Aktivierungswegs der Komplementkaskade zusammen mit CFB. Im Falle einer vermehrten

Aktivierung des Alternativen Weges (AP) im Rahmen des DSS-Modells oder unter bakterieller Stimulation der Zellen würde auch CFB vermehrt exprimiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse weisen sowohl im DSS-Modell, als auch in Stimulationsversuchen der Zelllinien (nicht gezeigt) keine signifikante Steigerung der CFB-Expression auf.

Elvington et al. zeigten im DSS-Versuch an CFB^{-/-}-Mäusen, dass sich ihr Entzündungsphänotyp kaum von dem der Kontrollmäuse unterschied [27]. Insgesamt deutet es also auf eine weniger große Rolle des Alternativen Weges im Rahmen von chronischer intestinaler Entzündung hin.

Unter Ausschluss dieser möglichen Signalwege, rückt die Funktion von C3b und seiner Spaltprodukte als Opsonin immer mehr in den Vordergrund. Eine signifikant vermehrte C3b-Deposition auf Mukosa-assoziierten Bakterien (MAB) in DSS-Versuchstieren konnte mittels FC festgestellt werden.

Tiere mit intestinaler Entzündung scheiden mit ihrem Stuhl mehr C3-Spaltprodukte aus als Kontrolltiere. Ungespaltene C3-Proteine können dagegen vermehrt aus dem Stuhl gesunder Tiere isoliert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte Aktivierung und Prozessierung des C3-Proteins durch entzündliche Prozesse der Mukosa hin.

Aus unseren Ergebnissen leiten sich folgende Hypothesen ab:

1. Durch bakterielle Stimulation der epithelialen TLR (in unserem Modell insbesondere TLR4) kommt es zu einer gesteigerten C3-Produktion und –Sekretion.
2. C3 wird im Mukus gespalten und opsoniert als C3b und als dessen Spaltprodukte Mukosa-assoziierte Bakterien.
3. Durch die Opsonierung kommt es zur Initiierung der Phagozytose und verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.
4. Im Rahmen von CED kommt es z.B. durch Ineffektivität der Mukusbarriere zu einem vermehrten Kontakt zwischen Bakterien und Mukosa, der zu einer Sezernierung von C3 führt.

4.5 Limitation und Ausblick

Diese Arbeit liefert Erkenntnisse über das Komplementsystem in murinen Zelllinien und pIEZ im Rahmen von bakterieller Stimulation und einem chemischen intestinalen Entzündungsmodell. Die Ergebnisse deuten auf eine gesonderte Rolle des Komplementfaktors C3 als Reaktion auf diese Reize hin. Auch in humanen CED Patienten konnten erhöhte C3-Konzentrationen, insbesondere in entzündeten Schleimhautarealen, detektiert werden [38, 39]. Weitere Untersuchungen sind aber nötig, um die Funktion dieser C3-Sekretion genau zu verstehen. Durch die Daten dieser Arbeit geraten die Funktionen des C3 als Anaphylatoxin und Faktor des Alternativen Aktivierungsweges in den Hintergrund. Vielmehr deutet insbesondere die gesteigerte C3b-Deposition auf MAB auf eine wichtige Funktion als Opsonin hin.

Die Übertragung auf das humane Krankheitsbild der CED ist nicht vollends möglich. Liegt bei den Patienten eine Defizienz der Komplementinhibitoren vor und führt diese zu einer dysregulierten Inflammation? Oder kommt es durch Veränderungen des Mukus und einer stärkeren Präsenz von Bakterien an der Mukosa zu einer vermehrten TLR-Aktivierung und daraufhin zu einer vermehrten C3-Produktion, Opsonierung und in Folge dessen zu einer chronischen Inflammation?

Genmutationen des Komplementsystems, die durch eine verminderte Inaktivierung der Komplementkaskaden zu einer Suszeptibilität für die Entwicklung einer CED führen, konnten bislang nicht durch entsprechende Studien nachgewiesen werden [51]. Erste Untersuchungen haben eher eine vermehrte Expression des Komplementregulators DAF (CD55) in CED-Patienten ergeben, sodass dieser Weg der ungehemmten Komplementreaktion bislang nur theoretisch in Frage kommt [10, 67].

Der intestinale Mukus von CED-Patienten ist weniger protektiv gegenüber der mikrobiellen Darmflora und führt daher zu einer gesteigerten Quantität luminaler Bakterien in der tiefen Mukusschicht mit direktem Epithelkontakt [84, 96]. Möglich wäre eine dadurch ausgelöste permanente Aktivierung von epithelialen TLRs und ihrer proinflammatorischen Signalkaskaden inklusive der C3-Expression und –Sekretion.

Als weitere Limitation dieser Arbeit ist der fehlende Nachweis des genauen Signalwegs, von der LPS-Stimulation bis zur C3-Sekretion zu sehen. Genauere Untersuchungen bezüglich der TLR4-Aktivierung und einer eventuellen Interaktion mit der C3aR-Kaskade, wie sie in

anderen Arbeiten beschrieben wurde, sollten ergänzend durchgeführt werden. Auch weitere Komplementfaktoren des klassischen und Lektin-vermittelten Aktivierungsweges, sowie die Anaphylatoxine sollten auf ihre Reaktion innerhalb eines chronischen DSS-Modells untersucht werden, um das Komplementsystem ganzheitlich betrachten zu können.

Zuletzt führen all diese Untersuchungen schließlich zu weiteren Erkenntnissen bezüglich des Komplementsystems als Teil der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Ziel wird es sein, diese Erkenntnisse durch Entwicklung neuer Therapieoptionen zu nutzen. Einige Arbeitsgruppen haben bereits erste Inhibitoren des Komplementsystems (z.B. CR2-fH, PMX53) als Therapeutikum der intestinalen Entzündung erprobt [27, 52]. Diese Arbeit stellt die Relevanz des Komplementfaktors C3 in CED besonders heraus. Doch würde es nicht durch eine Inhibition dieses Faktors als möglichen therapeutischen Ansatz und dadurch die fehlende C3b-Opsonierung von Mukosa-assoziierten Bakterien zu einer Invasion und folglich zu einer umso größeren Inflammation und Zerstörung des Epithels kommen? In C3^{-/-}-Mäusen stellte sich die DSS-assoziierte intestinale Entzündung besonders gravierend dar und zeugt diesbezüglich von einer protektiven Funktion von C3 [27].

Eine eingehende Exploration der genauen Funktion der C3b-Spaltprodukte in Rahmen von CED sollte vorgenommen werden, um eventuell darin ein mögliches Target für die Entwicklung neuer Therapeutika ausmachen zu können.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über das Komplementsystem in murinen Zelllinien und pIEZ im Rahmen von bakterieller Stimulation und einem chemischen intestinalen Entzündungsmodell zu erlangen. Die Ergebnisse deuten auf eine gesonderte Rolle des Komplementfaktors C3 als Reaktion auf diese Reize hin. Auch im Kontext der chronischen DSS-Kolitis konnte dieses Ergebnis wiederholt und validiert werden. Stimulationsexperimente in den Zelllinien sowie in pIEZ weisen darauf hin, dass es zu einer TLR4-vermittelten C3-Expression und –Sekretion kommt. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine mögliche Funktionalität der gesteigerten C3-Expression im Rahmen von bakterieller Stimulation und chronischer Entzündung eruiert werden.

Dass der Komplementfaktor C3 im Zusammenhang mit CED eine wichtige Rolle spielt, spiegelt sich u.a. auch in Proben humaner CED-Patienten wider, in denen elevierte C3-Konzentrationen, insbesondere in entzündeten Schleimhautarealen, detektiert werden konnten [10]. C3 ist aber nicht nur als Teil des Alternativen Aktivierungsweges des Komplementsystems oder als Spaltprodukt C3a als Anaphylatoxin ein relevanter Faktor des Komplementsystems. Vielmehr rückt in dieser Arbeit, insbesondere durch die gesteigerte C3b-Deposition auf Mukosa-assoziierten Bakterien, die Funktion des C3b als Opsonin im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in den Vordergrund. Auch weist u.a. das vermehrte Auftreten von C3b-Spaltprodukten im Stuhl chronisch erkrankter Tiere auf eine luminale Aktivierung von C3b und somit einem Anfallen weiterer Bindungspartner für Komplementrezeptoren hin. Die genaue Funktion dieser Spaltprodukte im Rahmen von CED bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit Untersuchungen in murinen sowie humanen intestinalen Epithelzelllinien und Biopsien von CED-Patienten insofern überein, als dass dem Faktor C3 und über diesen Mediator auch dem Komplementsystem, die Rolle als ein möglicher Baustein in der Pathophysiologie der CED zugetragen wird [2, 7, 10]. Weiterführend zeigt diese Arbeit einen möglichen Signalweg auf, über den eine C3-Expression vermittelt werden könnte. Durch Herausstellen der möglichen Effektorfunktion von C3b und seinen Spaltprodukten als Opsonin entstehen neue Fragestellungen zur Exploration des Komplementsystems im Rahmen der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

6 Materialliste

6.1 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Substanz	Firma
1,4-Dithiotreit (DTT)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland</i>
Alkohol	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Aceton, Methanol	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Agarose MetaPhor	<i>Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA</i>
Albumin fraction V blotting grade (BSA)	<i>AppliChem GmbH, Deutschland</i>
Aqua destillata	Eigene Herstellung
Aquatex	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Bromphenolblau	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Chloroform	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland</i>
Clarity Western ECL Substrat (Entwicklersubstrat)	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., USA</i>
Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	<i>Dako Deutschland GmbH, Deutschland</i>
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	<i>PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland</i>
Dextran-Sulfat Natrium (DSS) (Batch: DB001-27)	<i>TdB Consultancy, Schweden</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Dispase II	<i>Roche Deutschland Holding GmbH</i>
Dithioerythritol	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
DNA-Primer	<i>biomers.net GmbH, Deutschland</i>
DreamTaq PCR Master Mix2x (1000reac)	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
Dulbecco's modified Eagle's Medium	<i>PAA Laboratories GmbH, Deutschland</i>

(DMEM) Lösungen	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Eisessig	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Essigsäure	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
fetales Kälberserum (FCS)	<i>PAA Laboratories GmbH, Deutschland</i>
Flagellin (von <i>Salmonella typhimurium</i>)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland</i>
Gene Ruler DNA Ladder 100bp (DNA-Leiter)	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
Glycerin	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
L-Glutamin	<i>PAA Laboratories GmbH, Deutschland</i>
Hämalaunlösung	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Lipopolysaccharide (LPS-EB) ultrapure	<i>InvivoGen, Frankreich</i>
Loading Dye Solution	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
Magermilch 5%	<i>AppliChem GmbH, Deutschland</i>
Master Mix, Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	<i>Thermo Fisher Scientific Inc USA</i>
Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Moviol 4.88	<i>Polysciences, Inc., USA</i>
muIN TEPI Medium	<i>InSCREENeX GmbH, Deutschland</i>
Muramyldipeptide L-D Isomer (LD-MDP)	<i>InvivoGen, Frankreich</i>
NaH ₂ OPO ₄ x H ₂ O	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Natrium-Chlorid	<i>AppliChem GmbH, Deutschland</i>
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>

NP 40	<i>AppliChem GmbH, Deutschland</i>
Paraffin	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland</i>
Paraformaldehyd (PFA)	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Peptidoglycan (PDG) von <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland</i>
Penicillin/ Streptomycin P/S	<i>PAA Laboratories GmbH, Deutschland</i>
Peroxidase	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Phosphatase II	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Phosphatase III	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Proteaseinhibitor	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Randomprimer	<i>biomers.net GmbH, Deutschland</i>
Reverse Transkriptase (RevertAid H Minus)	<i>Thermo Fisher Scientific, Deutschland</i>
RNase-freies Wasser	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
SDS 0,5%	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
TRIS Base	<i>Merck KGaA, Deutschland</i>
Triton X 100	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Trypanblau	<i>Biochrom GmbH, Deutschland</i>
Trypsin EDTA Solution, 1x Konzentrat	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
Tween 20	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland</i>
Xylol	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland</i>

6.2 Zellkultur- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendetes Material

Material	Firma
Deckgläser	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
Elektrophoresekammer	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., USA</i>
Kanüle (20Gx1½)	<i>Becton Dickinson GmbH, USA</i>
Latexhandschuhe (Peha-soft)	<i>PAUL HARTMANN AG, Deutschland</i>
Mikropipetten: Eppendorf Research (0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1.000 µL)	<i>Eppendorf AG, Deutschland</i>
Mikroreaktionsgefäße	<i>SARSTEDT AG & Co., Deutschland</i>
muIN TEPI basal supplements	<i>InSCREENeX GmbH, Deutschland</i>
Murine Duodenal Epithelial Cell – Clone K (MODE-K)	<i>Freundlicherweise bereitgestellt von Dominique Kaiserlian, INSERM U851, Lyon</i>
Murine IEC Klon 1 (wt IEC)	<i>Freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Matthias Hornef, Germany</i>
Neubauerzählkammer	<i>Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Deutschland</i>
PVDF-Membran	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., USA</i>
Objektträger	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i> <i>SuperfrostPLUS, Gerhard Menzel GmbH, Deutschland</i>
Petrischale	<i>SARSTEDT AG & Co., Deutschland</i>
Polyacrylamid-Gel (10-20% Criterion TGX Gel 18 Well)	<i>Bio-Rad Laboratories Inc., USA</i>
Transferpipetten	<i>SARSTEDT AG & Co., Deutschland</i>
Zellkulturflasche (25cm ²)	<i>SARSTEDT AG & Co., Deutschland</i>
Zellkulturplatte (24 Well, 96 Well)	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
Zellsieb (Cell Strainer, 70µm)	<i>Life Science Avanced Technologies Inc., USA</i>

6.3 Medien und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer in destilliertem Wasser hergestellt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer. Zellkultur

<u>Medium für Mode-K und IEC-Zelllinie</u>	
DMEM	
10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS	
100 U/ml Penicillin	
100 U/ml Streptomycin	
+ 1,9 μ l β -Mercaptoethanol	

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer. Genexpressionsanalyse

<u>PCR Master Mix</u>	<u>TAE-Puffer, 50x</u>
Maxima TM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	2 M TRIS Base
	1 M Essigsäure
	0,1 M Na-EDTA

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer. Histologische Schnitte

<u>Carnoy'sche Lösung:</u>	<u>Paraffin-Matrix:</u>
60% Methanol,	1:1 Ethanol/Paraffin-Mischung für 24 h
30% Chloroform	bei 60°C und für je 3 x 24 h bei 60°C in reinem Paraffin
10% Eisessig	
ad pH 3,25.	

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer. Immunhistochemie

<u>5x PBS Stammlösung:</u>	<u>Permeabilisierungsmedium:</u>
90 g NaCl	0,2% Triton X-100 in PBS
3,058 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	
14,24 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	
pH 7,4 ad 2 l	
Mit Aqua dest. 1:5 verdünnen	

<u>Blocking Puffer:</u> 1% BSA 0,05% Tween 20	<u>Paraformaldehyd 4 % auf 2l (PFA):</u> 80 g PFA 1000 ml Aqua dest. lösen bei 80°C 5N NaOH abkühlen lassen und filtrieren 2x PBS ad 2 l pH 7,4
---	--

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer. FC

<u>FC-Puffer:</u> 500 ml PBS 5 g BSA (1%) 500 mg NaN ₃ (0,1%)	
---	--

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer. Western Blot

<u>Blockpuffer:</u> 5% Magermilch in T-TBS	<u>5x Elektrophoresepuffer:</u> 125 mM TRIS 0,5% SDS 960 mM Glycerin vor Gebrauch 1:5 verdünnen
<u>2x RIPA-Puffer:</u> 50 mM TRIS 150 mM NaCl 1 mM EDTA	<u>SDS Puffer:</u> 250 mM Tris-HCl, pH 7,8 40% Glycerol 200 mM DTT 0,6% Bromphenolblau
<u>10x TBS:</u> 200 mM TRIS 1,4 M NaCl pH 7,6	<u>T-TBS:</u> 100 ml 10x TBS + 900 ml Aqua dest. 0,1% Tween 20
<u>WB-Lysis-Puffer:</u> 1x RIPA-Puffer	

1% NP40	
1:100 Proteaseinhibitor	
1:50 Phosphatase II	
1:50 Phosphatase III	

6.4 Antikörper, Primer

6.4.1 Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Firma
7AAD (FC)	<i>BD Pharmington Bioscience, USA</i>
Anti- β -Actin-Antikörper (WB)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
C3b/iC3b/C3c-Antikörper (FC)	<i>Hycult Biotech, The Netherlands</i>
Anti-C3-Antikörper (IHC, WB)	<i>MP Biomedicals GmbH, Deutschland</i>
Anti-CD326 (EpCAM)-APC-Antikörper (FC)	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland</i>
Anti-CD45-Antikörper PE (FC)	<i>BD Pharmingen Bioscience, USA</i>

Sekundärer Antikörper	Firma
Anti-Ziege-Antikörper (HRP-konjugiert in 3% MNS) (IHC)	<i>Santa Cruz Technology, Inc., USA</i>
Anti-Maus-Antikörper (HRP-konjugiert) (WB)	<i>Cell Signaling Technology, Inc., USA</i>
Anti-Ratte-Antikörper Alexa Fluor 488 (FC)	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>

6.4.2 Primer

Tabelle 13: Verwendete Primer für murine cDNA-Proben

Gen	Primer vorwärts	Primer rückwärts
β-Actin	GAT GCT CCC CGG GCT GTA TT	GGG GTA CTT CAG GGT CAG GA
C1qA	ACC AGG TCC TCA CCA ACC AG	AAG ATG CTG TCG GCT TCA GT
C2	CTC ATC CGC GTT TAC TCC AT	TGT TCT GTT CGA TGC TCA GG
C3	GAC GCC ACT ATG TCC ATC CTG	GAA GGT CAG GCA GTC TTC TTC
C4	ACC CCC TAA ATA ACC TGG	CCT CAT GTA TCC TTT TTG GA
C5	GCA TTT CTG ACA CCA GGC TTC	AGC GCA CAG TCA GCT TCC A
C6	CTC AAC CAC CTC TCC CAG AA	CCA GCA ACA ACA AAG CCT CT
C7	CCT CCC AGA GAT GAT GGA A	CTG GCA ACA GGA TCT CCA AT
C8	ACT GGG TAG AGG GCT TCC AT	TGG TCT GTC TGC TTG TCC AG
C9	AAG GTT TCG CTC AAG AAG CA	TCC ACA GTC GTT GTC ACC AT
CFB	CCC AGG AGA ACA GCA GAA GA	ACT CGC CAC CTT CTC AAT CA
C3aR	CAG GCA AGG GAT TAC TTT TGG	TGT GAG GAC ATT AGG AGG CTT TCC
C5aR1	TTC CTG CTG GTG TTC AAG	CTG AGT AGA AGT CCT TAT ATG C
C5aR2	GCT CCT CCG CAC TCC TT	ACC GCA CTT TCC TCA TCC
KC	GCT GGG ATT CAC CTC AAG AA	TGG GGA CAC CTT TTA GCA TC
TLR1	ACT GGG GCT TTC CTC TGT CT	TTC TTC TCT GTG GGC CAT TC

TLR2	CAG ACG TAG TGA GCG AGC TG	GAG CAG GGA ACC AGG AAG AC
TLR3	ACC CCC ACCT CA CAG AGA AG	CCT CAG GCT TGG GAG ATA GG
TLR4	GCT ACCT GG AAT GGG AGG AC	CTC TCG GTC CAT AGC AGA GC
TLR5	GTC AGT CCT GGA GCC TGT GT	CAA GCG TAG GTG CTC TGA GG
TLR6	GCA ACA TGA GCC AAG ACA GA	CTG GGA GCA GAT CCA GTT GT
TLR7	GCT ACC AGG ACA GCC AGT TC	AGG CCA CTC AAG GAC AGA GC
TLR8	GGT CCC CTG TAC TCC ATC CT	CTC ACT GCG GAC AAC CTA CC
TLR9	GAG CAG GAG GAG CTG TTG TC	GGC TCA GGC TAA GAC ACT GG
TLR11	GGC TGG CTC TCT CAT CTT CC	CTC TAG CAC ACG TAG CCT GG
TLR12	TGA AGC TGG ATG GAA ACC CC	GAG CTG CCA GAG GAA AAG GT
TLR13	CAA GTG CCA GCT CTC CTT CA	AGC TTT TCA AGG CCC GAG AA

6.5 Kits

Tabelle 14: Verwendete Kits

Methode	Kit, Firma
Disease Activity Index (DAI)	Haemocult-Test, <i>Beckman-Coulter GmbH, Deutschland</i>
DNase Verdau	DNase Kit I, <i>Sigma-Aldrich Co. LLC., USA</i>
PCR	Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x), <i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i>
RNA-Isolation	innuPREP RNA Mini Kit, <i>Analytik Jena AG, Deutschland</i>

6.6 Geräte und Auswertungsprogramme

Tabelle 15: Verwendete Geräte und Auswertungsprogramme

Methode	Geräte, Auswertungsprogramme
Agarose-Gelelektrophorese	Gerät: Bio-Rad 3000Xi, <i>Bio-Rad Laboratories, Inc., USA</i> Detektionsgerät: E-Box VX5, <i>VILBER LOURMAT GmbH, Deutschland</i>
Durchflusszytometrie (FC)	BD Accuri™ C6, Flow Cytometer, <i>Becton Dickonson Biosciences, USA</i> Programm: BD Accuri C6, <i>Becton Dickonson GmbH, USA</i>
Histologische Präparate	Schlittenmikrotom: N-40, <i>Fa. Jung, Deutschland</i> Heißwasserbad: Typ 1052, <i>GFL, Deutschland</i>
Immunhistochemie (IHC)	Mikroskop: Axiophot, <i>Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland</i> Kamera: AxioCam, <i>Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland</i>

	<p>Programm: AxioVission SE 64, <i>Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland</i></p>
Isolierung IEZ	<p>Inkubator: BT 5042 E <i>Heraeus GmbH, Deutschland</i></p> <p>Zentrifuge: Megafuge 1.0R, <i>Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland</i></p>
PCR	<p>Gerät: TB1 Thermoblock, <i>Biometra GmbH, Deutschland</i></p> <p>Thermocycler: <i>Whatman Biometra, Deutschland</i></p> <p>Zentrifuge: MC 6 Centrifuge, <i>SARSTEDT AG & Co., Deutschland</i></p> <p>Programm: ABI Prism 7000 Sequence Detection System, <i>Applied Biosystems, Deutschland</i></p>
Reverse Transkription	<p>Zentrifuge: Megafuge 1.0R, <i>Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland</i></p> <p>Thermocycler: T1 Thermocycler, <i>Biometra GmbH, Deutschland</i></p>
RNA-Konzentrationsbestimmung	<p>Programm: NanoDrop 2000/2000c, <i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i></p> <p>Gerät: NanoDrop 1000 Spektralphotometer, <i>Thermo Fisher Scientific Inc., USA</i></p>
Western Blot	<p>Turbo Blot System, <i>Bio-Rad Laboratories, Inc., USA</i></p>
Zellkultivierung	<p>Inkubator: Heizschrank T5042 E, <i>Heraeus GmbH, Deutschland</i></p> <p>Zentrifuge: Centrifuge 5702, <i>Eppendorf AG, Deutschland</i></p>

7 Literaturverzeichnis

1. Ahrenstedt Ö, Knutson L, Nilsson B, Nilsson-Ekdahl K, Odland B, Hällgren R (1990) Enhanced Local Production of Complement Components in the Small Intestines of Patients with Crohn's Disease. *N Engl J Med* 322(19):1345–1349
2. Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T, Hosoda S (1993) Differential cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *J Immunol Baltim Md 1950* 151(8):4239–4247
3. Andoh A, Fujiyama Y, Sumiyoshi K, Bamba T (1996) Local secretion of complement C3 in the exocrine pancreas: ductal epithelial cells as a possible biosynthetic site. *Gastroenterology* 110(6):1919–1925
4. Andres PG, Friedman LS (1999) Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28(2):255–281, vii
5. Arbore G, Kemper C (2016) A novel “complement–metabolism–inflammasome axis” as a key regulator of immune cell effector function. *Eur J Immunol* 46(7):1563–1573
6. Bamberg CE, Mackay CR, Lee H, et al (2010) The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 285(10):7633–7644
7. Bernet-Camard MF, Coconnier MH, Hudault S, Servin AL (1996) Differential expression of complement proteins and regulatory decay accelerating factor in relation to differentiation of cultured human colon adenocarcinoma cell lines. *Gut* 38(2):248–253
8. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A (2001) Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 91(4):854–862
9. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N (2001) The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 96(4):1116–1122
10. Berstad AE, Brandtzaeg P (1998) Expression of cell membrane complement regulatory glycoproteins along the normal and diseased human gastrointestinal tract. *Gut* 42(4):522–529

11. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN (2008) The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol* 45(8):2370–2379
12. Bjornson AB, Bjornson HS (1977) Activation of complement by opportunist pathogens and chemotypes of *Salmonella minnesota*. *Infect Immun* 16(3):748–753
13. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (2008) *Pathologie*, 4th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München
14. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH-J, Lochs H (2006) Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55(3):342–347
15. Cao Q, McIsaac SM, Stadnyk AW (2012) Human colonic epithelial cells detect and respond to C5a via apically expressed C5aR through the ERK pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(12):C1731-1740
16. Cario E, Podolsky DK (2000) Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infect Immun* 68(12):7010–7017
17. Carroll MC (2004) The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5(10):981–986
18. Carroll MC, Isenman DE (2012) Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 37(2):199–207
19. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37–40
20. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 69(2):238–249
21. Davoust N, Jones J, Stahel PF, Ames RS, Barnum SR (1999) Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells. *Glia* 26(3):201–211
22. Dobó J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyén E, Závodszy P, Gál P (2009) MASP-1, a

- promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol Baltim Md* 1950 183(2):1207–1214
23. Dommett R, Zilbauer M, George JT, Bajaj-Elliott M (2005) Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Mol Immunol* 42(8):903–912
24. Dunkelberger JR, Song W-C (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20(1):34–50
25. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M (2011) New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med* 17(3–4):317–329
26. Ekbohm A, Adami H-O, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM (1990) Perinatal Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study. *Am J Epidemiol* 132(6):1111–1119
27. Elvington M, Schepp-Berglind J, Tomlinson S (2015) Regulation of the alternative pathway of complement modulates injury and immunity in a chronic model of dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 179(3):500–508
28. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition, 17 edition. McGraw-Hill Professional, New York
29. Fraser DA, Bohlsón SS, Jasinskiene N, Rawal N, Palmarini G, Ruiz S, Rochford R, Tenner AJ (2006) C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol* 80(1):107–116
30. Fraser DA, Laust AK, Nelson EL, Tenner AJ (2009) C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 183(10):6175–6185
31. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ (2004) Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol* 25(7):368–373
32. Gasque P (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41(11):1089–1098

33. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26(22):3122–3142
34. Graham MF (1995) Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-an update. *Inflamm Bowel Dis* 1(3):220–227
35. Haas P-J, van Strijp J (2007) Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol Res* 37(3):161–175
36. Hajishengallis G, Lambris JD (2010) Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol* 31(4):154–163
37. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Färkkilä M, Kontula K (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol WJG* 12(23):3668–3672
38. Halstensen TS, Mollnes TE, Garred P, Fausa O, Brandtzaeg P (1990) Epithelial deposition of immunoglobulin G1 and activated complement (C3b and terminal complement complex) in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 98(5 Pt 1):1264–1271
39. Halstensen TS, Mollnes TE, Garred P, Fausa O, Brandtzaeg P (1992) Surface epithelium related activation of complement differs in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 33(7):902–908
40. Hanauer SB (2006) Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12(5):S3–S9
41. Hansson GC (2012) Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol* 15(1):57–62
42. Harboe M, Mollnes TE (2008) The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med* 12(4):1074–1084
43. Harris CL, Pettigrew DM, Lea SM, Morgan BP (2007) Decay-accelerating factor must bind both components of the complement alternative pathway C3 convertase to mediate efficient decay. *J Immunol Baltim Md* 1950 178(1):352–359
44. Helmy KY, Katschke KJ, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M (2006) CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124(5):915–927

45. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA (2002) The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48(10):1819–1827
46. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker H-C, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124(4):993–1000
47. Hodgson HJ, Potter BJ, Jewell DP (1977) C3 metabolism in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 28(3):490–495
48. Hodgson HJ, Potter BJ, Jewell DP (1977) Humoral immune system in inflammatory bowel disease: I. Complement levels. *Gut* 18(9):749–753
49. Hoffmann J, Preiß J, Autschbach F, et al (2008) S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“. *Z Für Gastroenterol* 46(09):1094–1146
50. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599–603
51. Jain U, Otley AR, Van Limbergen J, Stadnyk AW (2014) The complement system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 20(9):1628–1637
52. Jain U, Woodruff TM, Stadnyk AW (2013) The C5a receptor antagonist PMX205 ameliorates experimentally induced colitis associated with increased IL-4 and IL-10. *Br J Pharmacol* 168(2):488–501
53. Johansson MEV, Larsson JMH, Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1:4659–4665
54. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13(5):816–825
55. Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474(7351):307–317
56. Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12(5):319–330
57. Klos A, Tenner AJ, Johswich K-O, Ager RR, Reis ES, Köhl J (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46(14):2753–2766

58. Köhl J (2006) The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 34(2):157–176
59. Koloski N-A, Bret L, Radford-Smith G (2008) Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* 14(2):165–173
60. Lang T, Hansson GC, Samuelsson T (2007) Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(41):16209–16214
61. Laufer J, Oren R, Goldberg I, Horwitz A, Kopolovic J, Chowers Y, Passwell JH (2000) Cellular localization of complement C3 and C4 transcripts in intestinal specimens from patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 120(1):30–37
62. Lin F, Spencer D, Hatala DA, Levine AD, Medof ME (2004) Decay-accelerating factor deficiency increases susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis: role for complement in inflammatory bowel disease. *J Immunol Baltim Md 1950* 172(6):3836–3841
63. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods San Diego Calif* 25(4):402–408
64. Loftus EV (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126(6):1504–1517
65. Lopez J, Grinspan A (2016) Fecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol* 12(6):374–379
66. McVay LD, Keilbaugh SA, Wong TMH, et al (2006) Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest* 116(11):2914–2923
67. Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V (1987) Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med* 165(3):848–864
68. Mogilenko DA, Kudriavtsev IV, Trulioff AS, Shavva VS, Dizhe EB, Missyul BV, Zhakhov AV, Ischenko AM, Perevozchikov AP, Orlov SV (2012) Modified low density lipoprotein stimulates complement C3 expression and secretion via liver X receptor and Toll-like receptor 4 activation in human macrophages. *J Biol Chem* 287(8):5954–5968

69. Morrison DC, Kline LF (1977) Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol Baltim Md* 1950 118(1):362–368
70. Müller-Eberhard HJ (1985) The killer molecule of complement. *J Invest Dermatol* 85(1 Suppl):47s–52s
71. Mullis KB (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48(8):579–582
72. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, Thanigachalam S (2012) Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol WJG* 18(5):412–424
73. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):603–606
74. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3):694–702
75. Okroj M, Heinegård D, Holmdahl R, Blom AM (2007) Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med* 39(7):517–530
76. Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO (2000) Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 35(10):1075–1081
77. Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A (2008) The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(9):917–923
78. Pangburn MK, Ferreira VP, Cortes C (2008) Discrimination between Host and Pathogens by the Complement System. *Vaccine* 26(Suppl 8):I15–I21
79. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 154(3):856–867
80. Park SJ, Kim WH, Cheon JH (2014) Clinical characteristics and treatment of

inflammatory bowel disease: A comparison of Eastern and Western perspectives. *World J Gastroenterol* WJG 20(33):11525–11537

81. Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghoois Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietinck R, Rutgeerts P (1997) Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 113(3):802–807

82. Pekkarinen PT, Vaali K, Jarva H, Kekäläinen E, Hetemäki I, Junnikkala S, Helminen M, Vaarala O, Meri S, Arstila TP (2013) Impaired intestinal tolerance in the absence of a functional complement system. *J Allergy Clin Immunol* 131(4):1167–1175

83. Peng Q, Li K, Smyth LA, Xing G, Wang N, Meader L, Lu B, Sacks SH, Zhou W (2012) C3a and C5a promote renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol JASN* 23(9):1474–1485

84. Peterson LW, Artis D (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14(3):141–153

85. Pope MR, Hoffman SM, Tomlinson S, Fleming SD (2010) Complement regulates TLR4-mediated inflammatory responses during intestinal ischemia reperfusion. *Mol Immunol* 48(1–3):356–364

86. Preiß J, Bokemeyer B, Buhr H, et al (2014) Aktualisierte S3-Leitlinie – „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ 2014. *Z Für Gastroenterol* 52(12):1431–1484

87. Raine T (2014) Vedolizumab for inflammatory bowel disease: Changing the game, or more of the same? *United Eur Gastroenterol J* 2(5):333–344

88. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP (2008) Activation of Complement Component C5 COMPARISON OF C5 CONVERTASES OF THE LECTIN PATHWAY AND THE CLASSICAL PATHWAY OF COMPLEMENT. *J Biol Chem* 283(12):7853–7863

89. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (2011) *Basislehrbuch Innere Medizin - Studienausgabe: kompakt-greifbar-verständlich*, 4th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München; Jena

90. Richens ER, Thorp CM, Bland PW, Hall ND (1982) Circulating immune complexes in Crohn's disease. Their characterization and interrelationship with components of the complement system. *Dig Dis Sci* 27(2):129–138

91. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010) Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11(9):785–797
92. Riordan SM, McIver CJ, Wakefield D, Andreopoulos PC, Duncombe VM, Bolin TD, Thomas MC (1997) Local and systemic complement activity in small intestinal bacterial overgrowth. *Dig Dis Sci* 42(6):1128–1136
93. Sahu A, Kozel TR, Pangburn MK (1994) Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem J* 302(Pt 2):429–436
94. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL (2007) Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 19(2):70–83
95. Sándor N, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtay Z (2009) A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. *Mol Immunol* 47(2–3):438–448
96. Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J (1999) The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 117(5):1089–1097
97. Schwaeble WJ, Lynch NJ, Clark JE, et al (2011) Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci* 108(18):7523–7528
98. Schwerk J, Köster M, Hauser H, Rohde M, Fulde M, Hornef MW, May T (2013) Generation of Mouse Small Intestinal Epithelial Cell Lines That Allow the Analysis of Specific Innate Immune Functions. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0072700
99. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39(5):690–697
100. Sloand EM, Mainwaring L, Keyvanfar K, Chen J, Maciejewski J, Klein HG, Young NS (2004) Transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to deficient cells after erythrocyte transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 104(12):3782–3788

101. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wirén M, Tagesson C, Sjö Dahl R (2002) Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50(3):307–313
102. Song W-C (2012) Crosstalk between Complement and Toll-Like Receptors. *Toxicol Pathol* 40(2):174–182
103. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE (2007) Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol Baltim Md 1950* 179(4):2600–2608
104. Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A (2010) The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 160(3):386–393
105. Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2(3):168–184
106. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122(1):44–54
107. Thomas GAO, Rhodes J, Green JT, Richardson C (2000) Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J* 76(895):273–279
108. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, et al (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131(1):117–129
109. Van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 9(9):2095–2102
110. Vidal K, Grosjean I, Evillard JP, Gespach C, Kaiserlian D (1993) immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods* 166(1):63–73
111. Waggoner SN, Cruise MW, Kassel R, Hahn YS (2005) gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol Baltim Md 1950* 175(7):4706–4714
112. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaebler WW, Keeble AH (2010) Paths

- reunited: initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 215(1):1–11
113. Walport MJ (2001) Complement. *N Engl J Med* 344(14):1058–1066
114. Wang Q-Y, Chen C-L, Wang J-D, Lai Z-S, Liu R, Zhang Y-L (2002) Establishment of dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis model in mice. *1 Jun Yi Xue Xue Bao Acad J First Med Coll PLA* 22(7):608–610
115. Ward PA (2008) SEPSIS, APOPTOSIS AND COMPLEMENT. *Biochem Pharmacol* 76(11):1383–1388
116. Ward M, Eastwood MA (1975) Serum C3 and C4 complement components in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestion* 13(1–2):100–103
117. Weber BHF, Charbel Issa P, Pauly D, Herrmann P, Grassmann F, Holz FG (2014) The role of the complement system in age-related macular degeneration. *Dtsch Arztebl Int* 111(8):133–138
118. Welsch U, Deller T Sobotta Lehrbuch Histologie, 4.
119. Wende E, Laudeley R, Bleich A, Bleich E, Wetsel RA, Glage S, Klos A (2013) The Complement Anaphylatoxin C3a Receptor (C3aR) Contributes to the Inflammatory Response in Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *PLOS ONE* 8(4):e62257
120. Xavier RJ, Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448(7152):427–434
121. Yoshida N, Isozaki Y, Takagi T, Takenaka S, Uchikawa R, Arizono N, Yoshikawa T, Okanoue T (2006) Review article: anti-tryptase therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther Symp Ser* 2(1):249–255
122. Zaph C, Troy AE, Taylor BC, et al (2007) Epithelial-cell-intrinsic IKK- β expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446(7135):552–556
123. Zhang X, Song W-C, et al (2007) Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* 110(1):228–236
124. Zhang X, Köhl J (2010) A complex role for complement in allergic asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 6(2):269–277

125. Zipfel PF, Skerka C (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9(10):729–740

8 Danksagung

Zuletzt möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich in der Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben.

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Sina, Direktor des Instituts für Ernährungsmedizin, für die Möglichkeit zu dieser Arbeit, für die sehr gute Betreuung und Unterstützung danken. Auch bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Stefanie Derer möchte ich mich für die sehr guten Ideen und die Beantwortung meiner Fragen herzlich bedanken.

Für die ausführliche Anleitung, Unterstützung und die nette Teamarbeit geht mein Dank an alle weiteren Mitarbeitern der AG Molekulare Gastroenterologie. Ohne die Expertise und den ausdauernden Einsatz von Petra Langenstrassen, Ann-Kathrin Brethack, Heidi Schlichting, Dipl. biol. Rene Pagel und Annika Sünderhauf, M. Sc., wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich danken möchte ich meinen Eltern Barbara und Dr. Wilhelm Ebbert für ihre Unterstützung während des Studiums und der Zeit der Anfertigung der Dissertation.

9 Lebenslauf



PERSÖNLICHE DATEN

Geburtstag: 18. Mai 1989
 Geburtsort: Coesfeld, Deutschland

MEDIZINISCH AKADEMISCHE AUSBILDUNG

05/16 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Note 2,0 ; Gesamtnote 2,0

Seit 10/08 Universität zu Lübeck
 Studium der Humanmedizin

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

12/15 – 04/16 Schön Klinik Neustadt
 Klinik für Innere Medizin, 3. Tertial PJ

09/15 – 12/15 Uniklinikum Köln
 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, 2. Tertial PJ

05/15 – 08/15 Uniklinikum Münster
 Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie, 1. Tertial PJ

- 03/14 – 04/14 Krankenhaus Hohenlind, Köln
Klinik für HNO, Famulatur 2 Wochen
- 03/14 Praxis für Dermatologie, Dr. Popal, Köln
Famulatur 2 Wochen
- 09/13 Katutura State Hospital, Windhoek, Namibia
Klinik für Gynäkologie, Famulatur 4 Wochen
- 07/13 Krankenhaus Maria-Hilf, Stadtlohn
Klinik für Anästhesie, Famulatur 2 Wochen
- 10/13 UKSH Lübeck
Klinik für Unfallchirurgie, Famulatur 2 Wochen
- 03/12 Klinik Bremen Nord
Klinik für Gynäkologie, Famulatur 2 Wochen
- 02/12 – 03/12 Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. Ehling, Gescher Famulatur

SCHULAUSBILDUNG

- 09/99 – 06/08 Alexander-Hegius-Gymnasium in Ahaus,
Abschluss; Allgemeine Hochschulreife (Abitur Note 1,5)

ZEITRAUM DER DISSERTATION

Die Forschungsarbeit zur Dissertation erstreckte sich von Juni 2013 bis Juli 2016.