

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie,
internistische Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie,
Rheumatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Professor Dr. med. S. Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die Rolle von wnt5a und sFRP5 in der Pathogenese verschiedener chronisch entzündlicher Erkrankungen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ruben Raphael Winkelmann

aus Cuxhaven

Kiel 2020

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Laudes

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Mrowietz

Tag der mündlichen Prüfung:

14.06.2021

zum Druck genehmigt, Kiel den

20.04.2021

gez.:

Priv.-Doz. Dr. Konrad Aden
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

The more I study nature, the more I stand amazed at the work of the Creator.

Louis Pasteur (1822-1895)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
I EINLEITUNG	1
I.1 DIE WNT-SIGNALWEGE	2
I.1.1 Der kanonische Wnt-Signalweg	3
I.1.2 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege	4
I.1.2.1 Wnt-PCP Signalweg	5
I.1.2.2 Wnt/Ca ²⁺ Signalweg	5
I.2 WNT-SIGNALVERMITTLUNG BEI ENTZÜNDUNG	7
I.3 WNT5A CHARAKTERISIERUNG	7
I.4 WNT-SIGNALINHIBITION	8
I.4.1 sFRP5 Charakterisierung	9
I.5 CHRONISCH ENTZÜNDLICHE ERKRANKUNGEN UND DAS WNT5A-/ sFRP5 SYSTEM	9
I.5.1 Psoriasis	10
I.5.2 Rheumatoide Arthritis	11
I.5.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	12
I.5.4 Spondylitis ankylosans	14
I.6 MAKROPHAGEN UND IHRE ROLLE BEI ENTZÜNDUNG	15
I.7 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	17
II MATERIAL UND METHODEN	18
II.1 STUDIENTYP UND STUDIENPOPULATION	18
II.1.1 Die Kieler Biologica follow-up Kohorte (BFU)	18
II.1.1.1 Krankheitsaktivitätsscores	19
II.1.2 Die Kieler Food Chain plus Kohorte (FoCus)	19
II.1.3 Blutentnahme und -analyse	20
II.1.4 Bestimmung der sFRP5 und wnt5a Serumlevel mittels ELISA	20
II.2 THP-1 ZELLKULTUREXPERIMENT	23
II.2.1 Kultivierung der THP-1 Zellen	24
II.2.2 Aussaat und Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen	25
II.2.3 Stimulation der Zellen	25
II.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	27

II.2.5	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	28
II.2.6	Semidry Westernblot	29
II.2.7	Immundetektion	30
II.3	STATISTIK	31
II.4	ETHIK	31
II.5	MATERIAL UND VERWENDETE REAGENZIEN	32
III	ERGEBNISSE	39
III.1	CHARAKTERISIERUNG DER STUDIENKOHORTE	39
III.2	WNT5A SERUMLEVEL BEI CHRONISCHER ENTZÜNDUNG	40
III.3	sFRP5 SERUMLEVEL BEI CHRONISCHER ENTZÜNDUNG	41
III.4	UNTERSUCHUNG DER PATIENTEN MIT ANTI-TNF α THERAPIE	42
III.4.1	Krankheitsdauer vor Anti-TNF α Therapie	42
III.4.2	Krankheitsaktivität unter Anti-TNF α Therapie	43
III.4.3	wnt5a Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie	45
III.4.4	sFRP5 Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie	46
III.4.5	CRP Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie	48
III.4.6	Patienten mit anderer Biologikatherapie	49
III.4.7	wnt5a und sFRP5 Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie in einzelnen Krankheitsgruppen	50
III.4.7.1	Kein Effekt der Anti-TNF α Therapie auf die wnt5a Serumlevel bei Pso, RA, CED und SpA	50
III.4.7.2	Kein Effekt der Anti-TNF α Therapie auf die sFRP5 Serumlevel bei Pso, RA und SpA	51
III.4.7.3	sFRP5 sinkt in der CED-Gruppe kurzzeitig ab	52
III.4.7.4	CRP-Serumlevel sinkt bei CED Patienten von T0 auf T6	53
III.5	IN VITRO WNT5A EXPRESSION NACH PROINFLAMMATORISCHER STIMULATION	54
IV	DISKUSSION	57
IV.1	MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DER CHRONISCHEN ENTZÜNDUNG MIT BIOLOGIKA	57
IV.2	WNT5A UND sFRP5 IN PSORIASIS	58
IV.3	WNT5A UND sFRP5 IN RHEUMATOIDER ARTHRITIS	60
IV.4	WNT5A UND sFRP5 IN CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN DARMERKRANKUNGEN	62
IV.5	WNT5A UND sFRP5 IN SPONDYLITIS ANKYLOSANS	63
IV.6	WNT5A MODULIERT ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN DURCH MAKROPHAGEN	65
IV.7	KRITIK AN DER METHODIK	66
V	ZUSAMMENFASSUNG	69
VI	LITERATURVERZEICHNIS	71
VII	ANHANG	82
VIII	PUBLIKATIONEN	90
X	DANKSAGUNG	91
XI	ERKLÄRUNG	92

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: vereinfachte Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges	4
Abbildung 2: vereinfachte Darstellung der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege	6
Abbildung 3: vereinfachte Skizze der Effekte von Wnt5a in Makrophagen	16
Abbildung 4: Skizze der Funktionsweise eines <i>Sandwich</i> -ELISA	21
Abbildung 5: Standardherstellung in einer Verdünnungsreihe	22
Abbildung 6: Neubauer-improved Zählkammer	24
Abbildung 7: Pipettierschema der 6-well-Platte	26
Abbildung 8: Aufbau Westernblot Semidry	29
Abbildung 9: Box-Whisker-Plot der Wnt5a-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung und entsprechenden Kontrollen	40
Abbildung 10: Box-Whisker-Plot der sFRP5-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung und entsprechenden Kontrollen	41
Abbildung 11: Box-Whisker-Plot der DAS 28 Werte von Patienten mit RA unter Anti-TNF α Therapie im Zeitverlauf	43
Abbildung 12: Box-Whisker-Plot der BASDAI Werte von Patienten mit SpA unter Anti-TNF α Therapie	44
Abbildung 13: Box-Whisker-Plot der sFRP5 Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung Pso, RA, CED oder SpA unter Anti-TNF α Therapie im Zeitverlauf	47
Abbildung 14: Box-Whisker-Plot der CRP-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung Pso, RA, IBD oder SpA und Anti-TNF α Therapie im Zeitverlauf	48
Abbildung 15: Box-Whisker-Plot der sFRP5-Serumlevel von Patienten mit CED unter Anti-TNF α -Therapie im Zeitverlauf	52
Abbildung 16: Box-Whisker-Plot der CRP-Serumlevel von Patienten mit CED unter Anti TNF α Therapie im Zeitverlauf	54

	Seite
Abbildung 17: Westernblot der wnt5a Proteinexpression	55
Abbildung 18: Westernblot der Aktin Proteinexpression	55
Abbildung 19: Säulendiagramm der wnt5a Proteinexpression	56
Abbildung 20: Vereinfachtes medikamentöses Therapieschema chronisch entzündlicher Erkrankungen am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis	57

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Verwendete BSA Konzentrationen für die Standardkurve	28
Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS Gele	29
Tabelle 3: Material für quantitative Proteinbestimmung nach ELISA	32
Tabelle 4: Material für Zellkulturexperiment	33
Tabelle 5: Validierung der Kontrollen und Patienten	39
Tabelle 6: Krankheitsdauer vor Anti-TNF α Therapie	42
Tabelle 7: Krankheitsaktivitätsindices unter Anti-TNF α Therapie nach Krankheitsgruppen	45
Tabelle 8: wnt5a Serumlevel bei Patienten mit Anti-TNF α Therapie	46
Tabelle 9: sFRP5 Serumlevel bei Patienten mit Anti-TNF α Therapie	47
Tabelle 10: CRP Serumlevel bei Patienten mit Anti-TNF α Therapie	49
Tabelle 11: wnt5a Serumlevel bei Patienten mit Pso, RA, CED und SpA mit Anti-TNF α Therapie	50
Tabelle 12: sFRP5 Serumlevel bei Patienten mit Pso, RA, und SpA mit Anti-TNF α Therapie	51
Tabelle 13: sFRP5 Serumlevel bei Patienten mit CED unter Anti-TNF α Therapie	53
Tabelle 14: CRP Serumlevel bei Patienten mit CED unter Anti-TNF α Therapie	53

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis Coli gene product
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
bDMARD	biologic disease-modifying antirheumatic drugs
BFU	Biologica follow up
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CAI	Colitis Activity Index
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II
CCC	Cloud-Clone Corporation
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives-Protein
CU	Colitis ulcerosa
DAAM	Dishevelled-associated activator of morphogenesis
DAG	Diacylglycerin
DAS28	Disease Activity Score 28
DKK	Dickkopf
DMARD	Disease modifying anti-rheumatic drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-ribonucleic acid
DSS	Dextran sodium sulfat
Dvl	Dishevelled
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FLS	Fibroblast-like synoviocytes
FoCus	Food Chain plus
Fz	Frizzled

GSK	Glykogensynthase-Kinase
HAEC	Human aortic endothelial cells
HEK293	Human Embryonic Kidney
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human umbilical venous endothelial cells
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
Int-1	integration site 1
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MC	Morbus Crohn
miRNA	Micro ribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NFAT	nuclear factor of activated T cell
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
n.s.	nicht signifikant
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCP	Planar cell polarity
PDZ	Psd-95/discs large/Z01
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pso	Psoriasis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
ROCK	Rho-associated kinase

ROR	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
rpm	revolutions per minute
RYK	related to receptor tyrosine kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sFRP5	Secreted frizzled-related protein 5
SpA	Spondylitis ankylosans
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFi	Tumornekrosefaktor-alpha Inhibitoren
Wif1	Wnt-inhibitory factor 1
Wnt	Wingless-related integration site
Wnt5a	wingless-type MMTV integration site family member 5a

I Einleitung

Chronisch entzündliche Erkrankungen stellen eine besondere Herausforderung in der Medizin dar. Da die Ursache der meisten Erkrankungen unbekannt ist und eine kausale Therapie nicht besteht, stehen Symptomlinderung und das Aufhalten des Fortschreitens der Erkrankungen im Vordergrund (Piper 2013). Für die Verbesserung der Therapien ist die Erforschung der Pathophysiologie chronischer Entzündung unabdingbar. Entzündung ist allgemein definiert als die lokalisierte und systemische Antwort auf eine Zell- oder Gewebeschädigung (Medzhitov 2008). Der entzündliche Prozess wird dabei durch das Immunsystem engmaschig reguliert und involviert sowohl Signale, die die Entzündung anstoßen und aufrechterhalten als auch Signale zur Beendigung (Pahwa et al. 2020). Obwohl die Aktivierung des Immunsystems generell einen Schutz darstellt, kann eine überschießende, oder unkontrollierte Immunreaktion dem Körper schaden. Dabei verändert sich die physiologische Homöostase proinflammatorischer und antiinflammatorischer Signale hin zu einem pathologischen Milieu, welches zu unkontrollierter Zell- und Gewebsschädigung führt. Jede Entzündungsreaktion stellt keine einfache lineare Kaskade dar, sondern viel mehr eine hoch komplex arrangierte und fein abgestimmte Interaktion verschiedener Zelltypen. Dazu zählen unter anderem dendritische Zellen, Mastzellen, basophile Zellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Lymphozyten und Makrophagen (Bröker et al. 2019).

In den letzten beiden Jahrzehnten konnten durch Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge neue zielgerichtete Therapieverfahren für chronisch entzündliche Erkrankungen, wie z.B. die Tumornekrosefaktor-alpha Inhibitoren (TNFi), entwickelt werden (Breedveld et al. 2006; Fiorino et al. 2014). Trotz dieser Errungenschaften sind viele Zusammenhänge der Pathophysiologie chronischer Entzündung noch unverstanden und die Suche nach kausalen und nebenwirkungsarmen Therapieansätzen, sowie Markern für die Vorhersage eines Therapieansprechens oder eventueller Risikofaktoren, bleibt von weitreichender Bedeutung. Über die letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die *wingless-related integration site* (Wnt)-Signalwege und insbesondere das dazugehörige Zytokinsystem bestehend aus den Signalproteinen *wingless-type MMTV integration site family member 5a* (wnt5a) und *secreted frizzled-related protein 5* (sFRP5) eine wichtige Rolle für das

Gleichgewicht des Immunsystems spielen und an der Pathophysiologie chronischer Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Bilkovski et al. 2011; Laudes 2011; Schulte et al. 2012; Schulte et al. 2015; Schulz et al. 2019).

I.1 Die Wnt-Signalwege

Das WNT-Netzwerk ist ein zentraler Regulator für die Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung, -bewegung, -polarität und den Zelltod (Ljungberg et al. 2019). Das erste wnt-Gen wurde zunächst in der *Drosophila melanogaster* Fliege als *wingless* benannt (Sharma und Chopra 1976). In der Maus wurde dieses Gen als *integration site 1* im Zusammenhang mit Brustkrebs entdeckt (Nusse und Varmus 1982). Daraus bildete sich das Mischwort: wnt für *wingless-related integration site*, welches die aktuelle Nomenklatur auch für die menschliche Genfamilie darstellt. Es konnte festgestellt werden, dass auch im Menschen vielfältige Funktionen für die Gewebsentwicklung auf die wnt-Signalwege zurückgeführt werden können. Zum Beispiel wurde der wnt-Signalweg im Zusammenhang mit der hereditären familiären adenomatösen Polyposis bekannt, bei der das mutierte Tumorsuppressorgen *Adenomatous Polyposis Coli gene product* (APC) zu einer Deregulierung des wnt-Signalweges führt, was zur Entstehung von Darmkrebs beiträgt (Fodde et al. 2001).

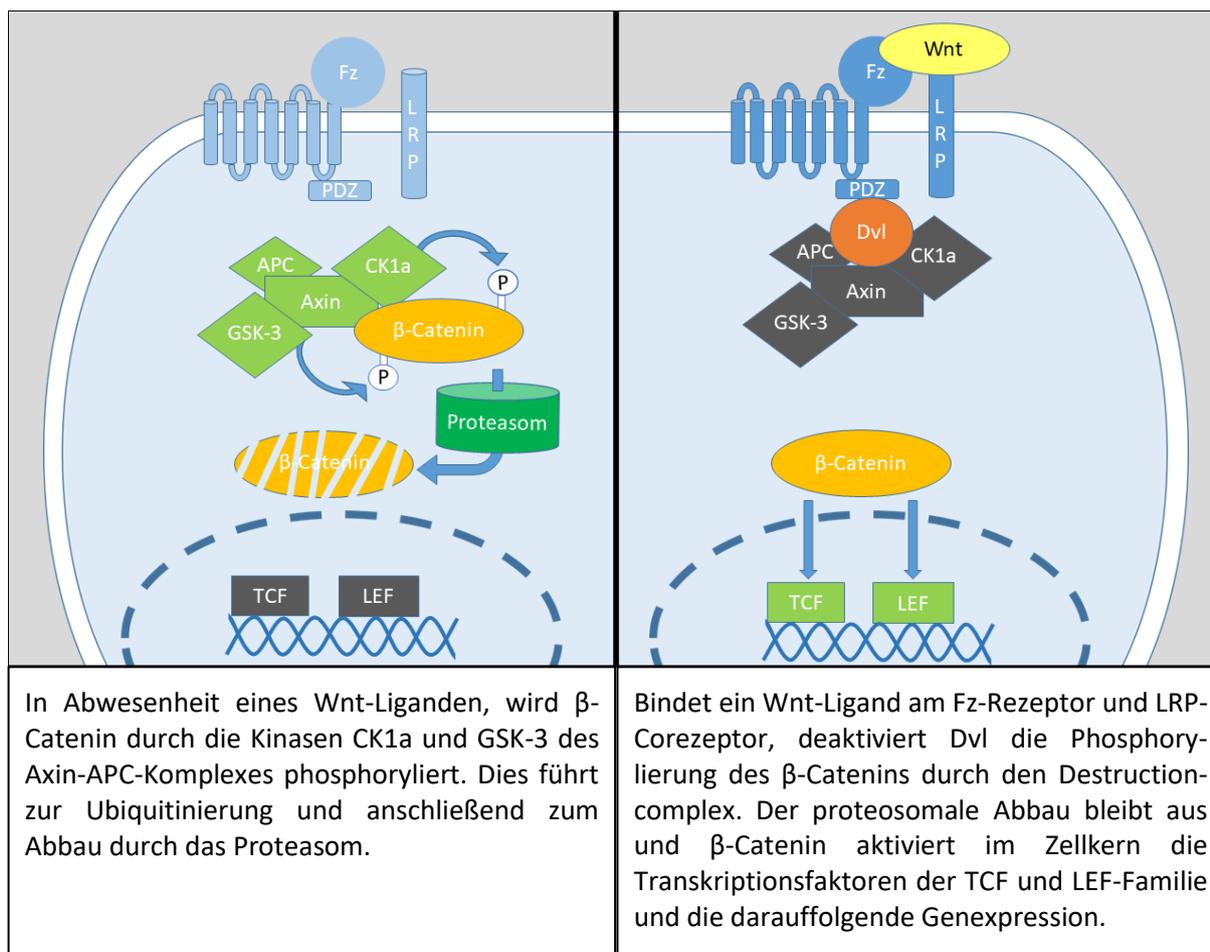
19 verschiedene Wnt Proteine (Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, und Wnt16) sind bisher beschrieben worden. Wnt Proteine sind phylogenetisch hochkonservierte, cysteinreiche Glykolipoproteine. Die sezernierten Proteine sind sehr hydrophob (Reichsman et al. 1996) und werden vor der Sezernierung stark modifiziert (Mikels A. J. und Nusse 2006). Sie sind Liganden der *Frizzled* (Fz) Rezeptoren, welche klassische G-Proteingekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen an der Oberfläche verschiedener Zelltypen darstellen (Sen et al. 2000). Bisher wurden 10 unterschiedliche Fz Rezeptoren (Fz 1-10) beschrieben. Diese Rezeptoren benötigen die *low-density lipoprotein-related proteins* (LRP5, LRP6) als Co-Rezeptoren für eine effektive Signalgebung. Außerdem vermitteln wnt-Proteine Signale über die Rezeptortyrosinkinasen ROR 1/2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1/2) und RYK (related to receptor tyrosine kinase) an die Zellen (Ljungberg et al. 2019).

Die Wnt-Signalwege werden klassisch in zwei große Hauptsignalwege unterteilt: Den kanonischen und den nicht-kanonischen Signalweg. Je nachdem, welche Signalkaskade durch

die Bindung eines Wnt-Proteins an einen Rezeptor ausgelöst wird, wird es als kanonischer oder nicht-kanonischer Faktor bezeichnet. Einige wnt-Proteine können jedoch auch in Abhängigkeit vom vorherrschenden Rezeptorkontext auf der Oberfläche der Zielzelle entweder den einen, oder den anderen Signalweg aktivieren (van Amerongen et al. 2008). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Rezeptorexprimierung einen entscheidenden Einfluss auf das funktionelle Ergebnis einer wnt-Ligandenbindung hat (Niehrs 2012).

I.1.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Allgemein ist der kanonische Signalweg durch die Aktivierung und Stabilisierung von β -Catenin gekennzeichnet, welche zu einer Translokation des zytosolischen β -Catenins in den Zellkern führt. Dort interagiert β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren und beeinflusst die Transkription verschiedener Gene. Ausgeschüttete wnt-Proteine binden an der Oberfläche der Zielzellen an einen Rezeptorkomplex aus FZ und dem essentiellen Co-Rezeptor LRP. Dieser Komplex übermittelt ein Signal an verschiedene intrazelluläre Proteine. In Abwesenheit von rezeptorgebundenen wnt-Proteinen, wird die zytosolische Konzentration von β -Catenin niedrig gehalten. Dies erfolgt durch den proteolytischen Abbau von β -Catenin durch den „Destruction complex“, welcher sich aus den Proteinen Axin, APC, *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3), und *casein kinase 1a* (CK1a) zusammensetzt (Kikuchi 1999). GSK-3 und CK1a phosphorylieren β -Catenin, welches nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut wird. Durch die Bindung eines wnt-Proteins an die cysteinreiche Bindungsdomäne des Rezeptors an der Zelloberfläche, wird das Protein *Dishevelled* (Dvl) über die intrazelluläre PDZ (*Psd-95/discs large/Z01*)-Domäne des Transmembranrezeptors rekrutiert. Das aktive Dvl bindet an Axin und inhibiert dadurch den „Destruction complex“, was dazu führt, dass β -Catenin weniger phosphoryliert vorliegt, vermindert proteolytischem Abbau unterliegt und im Zytoplasma und Zellkern akkumuliert. Erhöhte β -Catenin Spiegel führen im Zellkern durch Interaktion mit DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren der *T-cell factor* Familie (TCF 1-4) und des *lymphoid enhancer factor 1* zu einer veränderten Transkription und Genexpression (z.B. der Proto-onkogene Cyclin-D oder c-myc) (Kikuchi et al. 2007). Der kanonische Signalweg spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung, der Embryonalentwicklung und eine Störung des Signalweges ist verbunden mit der Entstehung und Progression verschiedener Tumoren (Logan und Nusse 2004; Bhatt und Malgor 2014).



In Abwesenheit eines Wnt-Liganden, wird β -Catenin durch die Kinasen CK1a und GSK-3 des Axin-APC-Komplexes phosphoryliert. Dies führt zur Ubiquitinierung und anschließend zum Abbau durch das Proteasom.

Bindet ein Wnt-Ligand am Fz-Rezeptor und LRP-Corezeptor, deaktiviert Dvl die Phosphorylierung des β -Catenins durch den Destruction-complex. Der proteosomale Abbau bleibt aus und β -Catenin aktiviert im Zellkern die Transkriptionsfaktoren der TCF und LEF-Familie und die darauffolgende Genexpression.

Abbildung 1: vereinfachte Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges (modifiziert nach Kikuchi et al. 2007 und Bhatt und Malgor 2014)

I.1.2 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

Die meisten Untersuchungen der Wnt-Signalwege beziehen sich auf den β -Catenin abhängigen Wnt-Signalweg. Es gibt aber auch zunehmend Beispiele dafür, dass wnt-Proteine oder andere Schlüsselkomponenten des kanonischen Signalweges an β -Catenin-unabhängigen Prozessen beteiligt sind. Dabei können zwei Kategorien unterschieden werden: der *planar cell polarity* (PCP) und der *wnt/Ca²⁺* Signalweg. Diese Signalwege werden unabhängig von LRP Co-Rezeptoren aktiviert, wenn ein wnt-Ligand bindet. Allerdings sind andere Co-Rezeptoren des nicht-kanonischen Signalweges wie z.B. RYK und ROR2 Gegenstand der aktuellen Forschung (Lu et al. 2004; Komiya und Habas 2008).

I.1.2.1 Wnt-PCP Signalweg

Der PCP Signalweg reguliert eine Reihe von zellulären Prozessen, wie beispielsweise die planare Zellpolarität oder die embryonale Gastrulation und Migration der Neuralleistenzellen (Calisto et al. 2005). Planare Zellpolarität bezeichnet im Gegensatz zur apikal-basalen Polarität, eine Polarisierung von (Epithel-) Zellen in der Ebene der Zellschicht. Diese kann beispielsweise durch die Umorganisation des Zytoskeletts und der Zelladhäsion beeinflusst werden (Boutros et al. 1998). Störungen planarer Polarität, z.B. im Innenohr-Epithel des Menschen, führen zu Taubheit (Eaton 1997). Bindet ein wnt-Ligand an einen Fz Rezeptor wird das Protein Dvl rekrutiert und mit *Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1* (DAAM1) verbunden. DAAM1 beeinflusst das Zytoskelett dadurch, dass es zum einen Profilin bindet, welches mit Aktin interagiert (Sato et al. 2006). Zum anderen aktiviert DAAM1 die GTPase Rho, welche die *Rho-associated kinase* (ROCK) aktiviert. Dvl bildet außerdem über die DEP Domäne unabhängig von DAAM1 einen Komplex mit Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*). Rac aktiviert JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), was zur Polarisation von Aktin und einer Veränderung der Zellpolarität führen kann (Komiya und Habas 2008).

I.1.2.2 Wnt/Ca²⁺ Signalweg

Ein weiterer nicht kanonischer Wnt-Signalweg ist der Wnt/Ca²⁺ Signalweg. Er reguliert die Zellbewegung, -proliferation und -einwanderung, sowie Entzündungsreaktionen und Zellstrukturveränderungen. Die Aktivierung dieses Signalweges setzt die Bindung eines wnt-Liganden an einen Fz Rezeptor voraus. Dieser Fz Rezeptor aktiviert Dvl, welches wiederum über Phospholipase C zu einer intrazellulären Ca²⁺ Ausschüttung des endoplasmatischen Retikulums führt. Diese erhöhte Ca²⁺ Konzentration führt wiederum zu einer Aktivierung der *Calcium/Calmodulin-dependent kinase 2* (CamKII), der Proteinkinase C oder von Calcineurin (Kohn und Moon 2005). Nachfolgend werden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. der *nuclear factor of activated T cell* (NFAT) dephosphoryliert und in den Zellkern verschoben. Dort wird die Transkription verschiedener Zielgene beeinflusst (Bhatt und Malgor 2014). Ein weiterer durch den Wnt/Ca²⁺ Signalweg aktivierter Transkriptionsfaktor ist NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), welcher eine große Bedeutung für die Immunantwort, den Zelltod und die Zellproliferation hat (Kim et al. 2010). Diese klassische Sicht auf die wnt-Signalwege bildet nur einen Teil der Komplexität der

Wnt-Signalvermittlung ab. Es konnte gezeigt werden, dass der kanonische und die nicht-kanonischen Signalwege sich häufig überschneiden, gegenseitig beeinflussen und antagonisieren. Ein Beispiel dafür ist das Protein Diversin. Es agiert als molekularer Schalter, indem es unter anderem über eine Interaktion mit Dvl den β -Catenin abhängigen Signalweg unterdrückt, aber den PCP Signalweg stimuliert (Schwarz-Romond et al. 2002, Itoh et al. 2009). Einige wnt-Liganden sind an mehreren Signalwegen beteiligt und je nach Rezeptorkontext in der Lage eine Vielzahl biologischer Prozesse zu beeinflussen. In dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf die Rolle des wnt-Systems bei Entzündungsreaktionen gelegt.

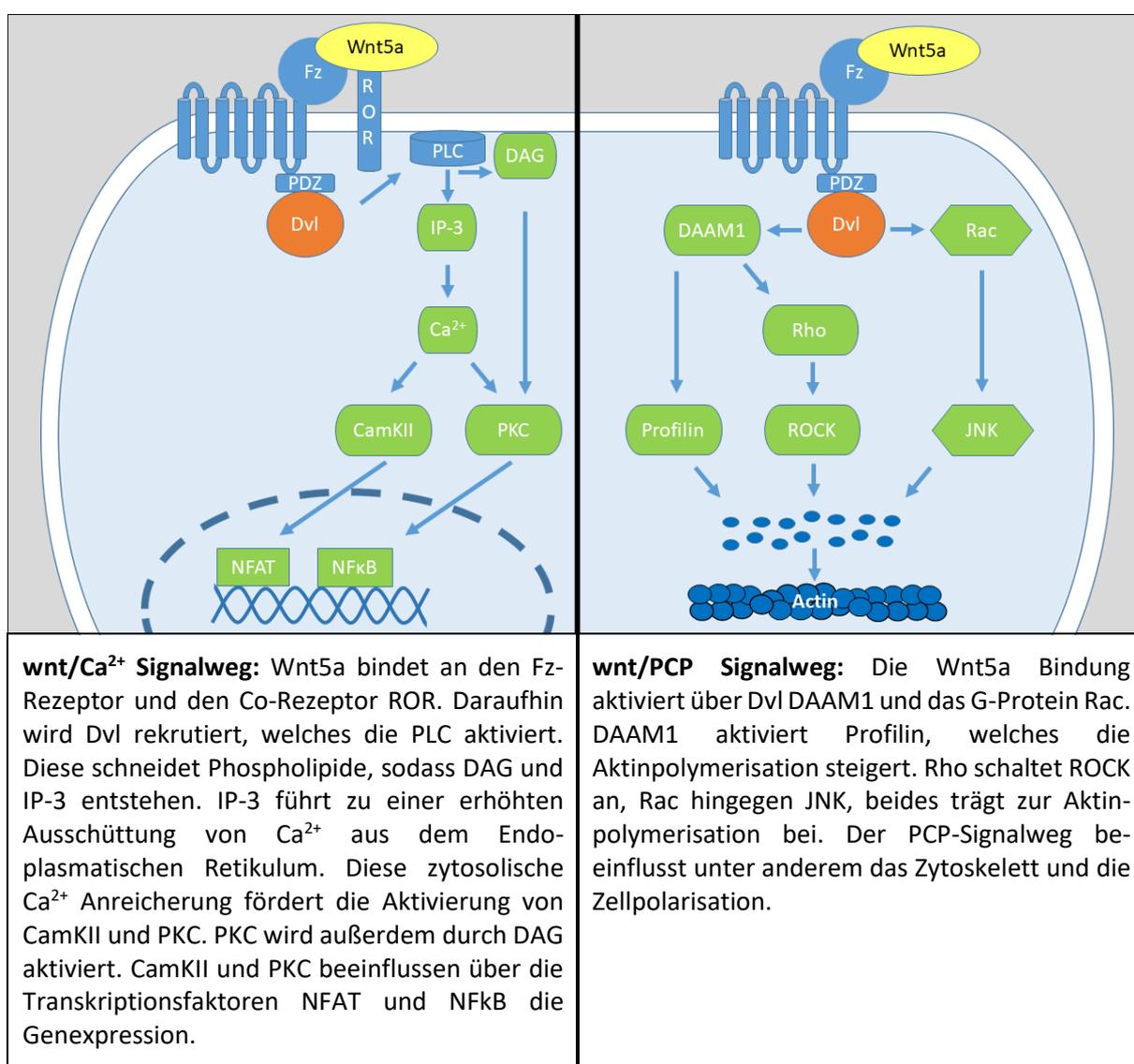


Abbildung 2: vereinfachte Darstellung der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege (modifiziert nach Komiya und Habas 2008 und Kim et al. 2010)

I.2 Wnt-Signalvermittlung bei Entzündung

Wnt-Signalwege spielen eine Schlüsselrolle bei der Proliferation, Differenzierung und Erneuerung von hämatopoetischen Stammzellen. Diese Zellen können sich in hämatopoetische Vorläuferzellen differenzieren, welche sich weiter in Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen entwickeln können. Der kanonische Weg reguliert z.B. die T-Zell Differenzierung im Thymus und in peripheren Lymphknoten (Ma et al. 2012). Durch eine Fehlregulierung der Transkriptionsfaktoren, welche auf den Wnt-Signalweg reagieren, kann es zu einer gestörten Entwicklung von T- und B-Zellen kommen, was wiederum zu Autoimmunität und Immunschwäche führen kann. Außerdem beeinflussen Wnt-Signalwege die Balance zwischen Immuntoleranz und Entzündung über die Aktivierung dendritischer Zellen (Cici et al. 2019). Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung des β -Catenin abhängigen Signalweges antiinflammatorische oder immunmodulatorische Wirkungen hat, während die Aktivierung der β -Catenin unabhängigen Signalwege proinflammatorische Wirkungen zeigt (Shao et al. 2016, Suryawanshi et al. 2016). Dabei scheint dem Wnt-Liganden wnt5a und seinen komplexen Interaktionen eine besondere Bedeutung in der Pathophysiologie chronischer Entzündung zu zukommen.

I.3 Wnt5a Charakterisierung

Das wnt5a Gen befindet sich auf dem Chromosom 3 (3p14-p21) (Clark et al. 1993). Die Transkription von wnt5a erfolgt unter anderem durch die NF κ B-, Hedgehog-, *Transforming growth factor beta* (TGF β)- und Notch-Signalwege (Katoh und Katoh 2009). Die hohe Komplexität der wnt5a Funktion ergibt sich zum einen daraus, dass die wnt5a Promotoren A und B jeweils unterschiedlich reguliert werden (Katula et al. 2012) und jeweils zu einer langen (wnt5a-L) und einer kurzen (wnt5a-S) Isoform der wnt5a mRNA führen können. Es konnte gezeigt werden, dass die wnt5a-L Proteinisoform die Proliferation verschiedener Tumorzellen verhindert, während wnt5a-S das Wachstum fördert (Bauer et al. 2013, Huang et al. 2017). Eine posttranslationale Glykosylierung ist entscheidend für die Faltung und Sezernierung von wnt5a und eine posttranslationale Palmitoylierung ermöglicht z.B. die Bindung an den Rezeptor Fz 5 (Kurayoshi et al. 2007). Wnt-Proteine wirken weitgehend parakrin und autokrin (Sen et al. 2000). Für wnt5a konnte in einem *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC)

Zellkulturmodell gezeigt werden, dass es von Makrophagen durch Exosomen und Mikrovesikel über weite Strecken zu den Zielzellen transportiert wird (Menck et al. 2013).

Klassischerweise wurde *wnt5a* zu den nicht-kanonischen Wnt-Liganden gezählt (Sen und Ghosh 2008). So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass *wnt5a* über einen Rezeptorkomplex aus Fz7 und ROR2 den PCP Signalweg in Mausfibroblastenzellen aktivieren kann (Nishita et al. 2010). In *human aortic endothelial cells* (HAECs) konnte gezeigt werden, dass *wnt5a* über den nicht-kanonischen *wnt/Ca²⁺* Signalweg durch vermehrte COX-2 Expression zu endothelialer Entzündung beiträgt (Kim et al. 2010). Diese Sicht, scheint aber nur einen Teil der Realität abzubilden. So konnte in *Human Embryonic Kidney* (HEK293) Zellen gezeigt werden, dass *wnt5a* je nach Rezeptorkontext auch den kanonischen Weg aktivieren oder deaktivieren kann. Die Bindung von *wnt5a* an ROR2 führte zu einer Inaktivierung des kanonischen Signalweges, die Bindung an Fz4 und LRP5 jedoch zur Aktivierung des kanonischen Signalweges (Topol et al. 2003; Mikels A. J. und Nusse 2006). In *human umbilical venous endothelial cells* (HUVEC) wurde ebenfalls nachgewiesen, dass *wnt5a* den nicht kanonischen Signalweg fördert und gleichzeitig den kanonischen Signalweg hemmt (Masckauchán et al. 2006).

Weiter ist Wnt5a ein direkter Ligand der Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 (Blumenthal et al. 2006; Yu et al. 2014). Über diese Bindung führt *wnt5a* unabhängig von typischen *wnt*-Rezeptoren über das Adapterprotein *myeloid differentiation primary response 88* zu einer Signaltransduktion durch einen NFkB-Subtyp (Mehmeti et al. 2019).

I.4 Wnt-Signalinhibition

Die Wnt-Signalvermittlung wird durch viele sezernierte Modulatoren antagonisiert. Dazu gehören unter anderem die *secreted frizzled-related proteins* (sFRPs) 1-5, der *Wnt-inhibitory factor 1* (Wif1) und die *Dickkopf* (DKK 1-4) Proteine. Dickkopf fördert die Internalisierung der LRP-Corezeptoren und verhindert dadurch die *wnt*-Signaltransduktion. Die sFRPs und Wif1 binden *wnt*-Liganden und verhindern dadurch die Interaktion dieser *wnt*-Proteine mit Fz Rezeptoren (Hsieh et al. 1999; Kawano und Kypta 2003; Logan und Nusse 2004; Niehrs 2012). sFRPs können die Signaltransduktion der *wnt*-Liganden durch verschiedene Mechanismen blockieren. Einerseits können sFRPs direkt an *wnt*-Proteine binden, andererseits können sie an Fz Proteine binden oder nicht funktionale Komplexe mit Fz bilden. Die Funktionen von sFRPs scheinen allerdings nicht auf die Antagonisierung der *wnt*-Signalgebung beschränkt zu

sein, sondern sie interagieren auch mit anderen Rezeptoren oder Matrixproteinen (Bovolenta et al. 2008).

I.4.1 sFRP5 Charakterisierung

sFRP5 ist ein Rezeptor für wnt5a. Das sFRP5 Gen befindet sich auf dem Chromosom 10q24.1 und besteht aus 317 Aminosäureresten und besitzt 3 Exons (He et al. 1997). Es hat ein molekulares Gewicht von 30-40 kDa und besitzt eine cysteinreiche Domäne am N-Terminus, welche homolog zu der des wnt5a Fz Rezeptors ist (Agostino et al. 2017; Tong et al. 2019). Als wnt5a-Inhibitor verhindert sFRP5 die Aktivierung nachgeschalteter Moleküle des wnt-Signalweges und moduliert dadurch unter anderem Entzündungsreaktionen (Ouchi et al. 2010).

Als erstes wurde festgestellt, dass sFRP5 von retinalen Pigmentepithelzellen stark exprimiert wird (Chang et al. 1999). Mittlerweile konnte sFRP5 mit vielen verschiedenen Zellarten und Prozessen in Verbindung gebracht werden. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass sFRP5 an der Regulation der Zellpolarität und Organbildung während der Embryonalentwicklung, der Tumorentstehung und dem metabolischen Gleichgewicht beteiligt ist (Ouchi et al. 2010; Fujii et al. 2017; Lin et al. 2018).

Einige Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass sFRP5 eine antiinflammatorische Rolle in verschiedenen mit Entzündung assoziierten Erkrankungen einnimmt. In einem Mausmodell für Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) verringerte rekombinantes sFRP5 signifikant die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und verminderte die NASH (Chen L et al. 2017). sFRP5 Knock-out Mäuse wiesen konsistent dazu eine größere Infarktgröße im Vergleich zu wild-typ Mäusen nach einer induzierten Herzischämie und -reperfusion auf. Nakamura et al. führten das darauf zurück, dass fehlendes sFRP5 zu einer verstärkten Inflammation und dadurch einem größeren Infarktareal führte (Nakamura et al. 2016).

I.5 Chronisch entzündliche Erkrankungen und das wnt5a-/ sFRP5 System

Forschungsergebnisse der Arbeitsgemeinschaft um Prof. Dr. med. Matthias Laudes konnten zeigen, dass das wnt5a/sFRP5 System bei verschiedenen mit chronischer Entzündung assoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, Sepsis und Parodontitis

dysreguliert ist (Laudes 2011; Schulte et al. 2012; Schulte et al. 2015; Relling et al. 2018; Schulz et al. 2019). Aus diesen Forschungsergebnissen wurde die für diese Arbeit grundlegende Arbeitshypothese abgeleitet, dass auch bei weiteren chronisch entzündlichen Erkrankungen eine Dysregulation dieses Systems vorliegen könnte. Daher wurden in dieser Arbeit in einer translationalen Humanstudie die wnt5a- und sFRP5-Blutserum Level mittels ELISA bei verschiedenen chronisch entzündlichen Krankheiten untersucht. Die Patienten bekamen eine Biologikatherapie. Biologika sind hochmolekulare Wirkstoffe, die in lebenden Organismen hergestellt werden und auch als *biologic disease-modifying antirheumatic drugs* (bDMARD) bezeichnet werden. Dazu zählt unter anderem die Gruppe der Tumornekrosefaktor-alpha Inhibitoren (TNFi). TNFi blockieren die Signaleffekte des TNF α , welches wie Interleukin (IL) 6 ein wichtiger Mediator lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen ist (Weckmann und Alcocer-Varela 1996; Kameda 2016; Freissmuth et al. 2020). Solche zielgerichteten antientzündlichen Therapien führten in den letzten Jahren zu einer deutlichen Verbesserung der medikamentösen Behandlung von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen (Cici et al. 2019; Sullivan et al. 2020). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass das wnt5a und sFRP5 System unter anderem durch TNF α und IL-6 beeinflusst wird (Shao et al. 2016). Deshalb wurde in dieser Studie erforscht, wie sich eine zielgerichtete antientzündliche Biologikatherapie auf die wnt5a und sFRP5 Serumspiegel auswirkt. Dazu wurden primär die entzündlich rheumatischen Autoimmunerkrankungen Psoriasis (Pso), Rheumatoide Arthritis (RA) und Spondylitis ankylosans (SpA), sowie die immunassoziierten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (UC) untersucht.

I.5.1 Psoriasis

Unter dem Namen Psoriasis (auch Schuppenflechte genannt) werden verschiedene Entitäten einer chronisch entzündlichen Haut- und Systemerkrankung zusammengefasst. Die Prävalenz beträgt 2-3 % in der Bevölkerung (Puchner 2017). Die Erkrankung zeichnet sich durch eine charakteristische silbrig-weiße Schuppung auf scharf begrenzten roten Plaques hauptsächlich an den Streckseiten der Extremitäten, der Kopfhaut und am sakralen Rumpf aus. Diesen chronisch rezidivierenden Haut- und Nagelveränderungen liegt eine veränderte Differenzierung und Hyperproliferation von Keratinozyten zu Grunde. In gesunder Haut liegt der Anteil sich teilender Keratinozyten bei ca. 20 %. In der Haut von Psoriatikern beträgt dieser

Anteil fast 100 % und die mittlere Zellzykluszeit ist von 13 Tagen auf 36 Stunden reduziert (Weinstein et al. 1985). Der Hintergrund dieser abnormalen Teilungsrate und Differenzierung wurde noch nicht vollständig verstanden. Allerdings wurde nachgewiesen, dass die Immunaktivität in den Psoriasis-Läsionen verändert ist (Valdimarsson et al. 1995). Psoriasis ist mit einem erhöhten Risiko für Komorbiditäten, wie Psoriasis arthritis, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes Mellitus, Adipositas, CED und NASH assoziiert (Korman 2020). Die systemischen Zusammenhänge dieser immunassoziierten Auswirkungen der Psoriasis sind Gegenstand der aktuellen Forschung und werden zum Teil mit der wnt-Signalgebung in Verbindung gebracht.

In Biopsien von Psoriasis-Hautläsionen konnte eine 4-fach erhöhte wnt5a Expression festgestellt werden (Reischl et al. 2007) einhergehend mit erhöhten wnt5a Proteinleveln. Die sFRP5 Genexpression war hingegen erniedrigt (Gudjonsson et al. 2010). In einem in vitro Zellkultorexperiment mit humanen Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass TNF α die wnt5a Expression steigerte und rekombinantes wnt5a selbst zu einer verstärkten Ausschüttung von TNF α führte (Kim et al. 2016). Gerdes et al. konnten erhöhte zirkulierende wnt5a Serumlevel bei Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu gesunden Patienten feststellen (Gerdes et al. 2014). Vor diesem Hintergrund wird in dieser Studie untersucht, wie die wnt5a und sFRP5 Serumlevel sich bei Psoriasispatienten unter einer TNFi Therapie verhalten.

I.5.2 Rheumatoide Arthritis

Die RA ist mit einer Prävalenz von 0,5 % in der Bevölkerung die häufigste chronisch entzündliche Gelenkerkrankung. Als chronisch fortschreitende Autoimmunerkrankung befällt sie häufig symmetrisch die kleinen Gelenke der Hände und Füße. Ohne Behandlung mündet die RA häufig in einer Gelenkdestruktion. Von der Erkrankung sind Frauen 3-mal häufiger betroffen als Männer. Sie kann in jedem Lebensalter auftreten, bevorzugt zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr. Klinisch manifestiert sich die RA durch eine synoviale Entzündung mit Gelenkschwellung, -rötung, -überwärmung, -schmerz und einer Funktionseinschränkung (Miao et al. 2013; Puchner 2017). Die RA zeigt neben den klassischen lokalen Gelenkentzündungen weitere Organmanifestationen an der Lunge (z.B. Pleuritis), dem Herzen (z.B. Perikarditis), den Augen (z.B. Keratokonjunktivitis sicca) und den Gefäßen (z.B. Raynaud Syndrom). Nicht alle Patienten profitieren gleichermaßen von den vorhandenen Therapien

und es besteht eine hohe Heterogenität innerhalb der Krankheitsverläufe. Deshalb ist es nicht nur für eine frühzeitige Diagnosestellung und einen frühzeitigen Therapiestart wichtig neue molekulare Mechanismen zu identifizieren, sondern auch um ein Therapieansprechen und eine individuelle Prognose im Sinne der *precision medicine* (Präzisionsmedizin) voraussagen zu können (Robinson 2012; Neumann et al. 2018). Das wnt5a/sFRP5 System ist in der Pathophysiologie der RA involviert und könnte Antworten auf diese Herausforderungen geben.

Bisher konnte gezeigt werden, dass synoviale Gewebeproben aus RA-Patienten im Vergleich zu Arthrose-Patienten und im Vergleich zu 12 anderen adulten Humangeweben signifikant mehr wnt5a und Fz5 mRNA exprimierten (die zum Vergleich herangezogenen Gewebearten waren: Leukozyten aus peripherem Blut, Lunge, Plazenta, Dünndarm, Leber, Niere, Milz, Thymus, Colon, Skelettmuskel, Herz und Gehirn) (Sen et al. 2000). Kim et al. konnten mittels Immunhistochemie darstellen, dass sowohl aktivierte Synoviozyten, als auch kapilläre Endothelzellen in RA Gewebeproben verstärkt wnt5a exprimierten (Kim et al. 2010). Kohärent zu diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass *fibroblast-like synoviocytes* (FLSs) von RA Patienten eine niedrigere sFRP5 mRNA Expression zeigten als FLS von Patienten mit Arthrose. Außerdem konnten durch Transfektion eines sFRP5-Vektors in FLS die inflammatorischen Effekte einer TNF α Stimulation vermindert werden. Diese antiinflammatorischen Effekte konnten darauf zurückgeführt werden, dass sFRP5 die nicht kanonische Wnt/PCP-Signalgebung verminderte (Kwon et al. 2014).

Unter Berücksichtigung dieser ex vivo Forschungsergebnisse wurden in dieser Arbeit erstmalig in vivo die zirkulierenden Serumlevel von wnt5a und sFRP5 bei Patienten mit RA und ihre Veränderung unter einer Therapie mit TNFi gemessen.

I.5.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehören Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Prävalenz liegt in der westlichen Welt bei ca. 200 pro 100.000 Einwohner (Puchner 2017). Pathophysiologisch liegt eine immunassoziierte komplexe Darmbarrierestörung vor, wobei die Ursache unklar ist. Während Morbus Crohn den gesamten Gastrointestinaltrakt, am Häufigsten das terminale Ileum und den Dickdarm, befallen kann, tritt die Colitis ulcerosa häufig zunächst im Rektum auf und breitet sich dann

von aboral nach oral über den weiteren Dickdarm aus. Dabei weist Morbus Crohn ein transmurales diskontinuierliches Entzündungsmuster auf, Colitis ulcerosa hingegen eine auf die Mukosa beschränkte kontinuierliche Entzündung. Beide Erkrankungen zeigen schubartige und anhaltende Verlaufsformen, welche mit dem Leitsymptom eines chronischen Durchfalls einhergehen. Bei CU sind diese Durchfälle im Gegensatz zu MC häufig blutig und schleimig. MC kann zu Stenosen und Fisteln im Darm führen, was für CU eher untypisch ist (Piper 2013). Beide Erkrankungen gehen häufig mit extraintestinalen Manifestationen einher, welche z.B. die Gelenke (Arthritis), die Augen (Uveitis), die Leber bzw. Gallenwege (Primär sklerosierende Cholangitis) und die Haut (Erythema nodosum) einschließen (Keller 2007). Nach aktuellem Forschungsstand resultieren die CED aus verschiedenen Umweltfaktoren, Mikrobiomveränderungen und Immunreaktionen kombiniert mit einer genetischen Prädisposition (Glassner et al. 2020).

Bei der Suche nach neuen Erkenntnissen über die Pathophysiologie der CED sind in den letzten Jahren die wnt-Signalwege in Verbindung mit CED gebracht worden. So konnte in einem Mausmodell mit induzierter ulzerativer Colitis gezeigt werden, dass die genetische Deletion der wnt-Co-Rezeptoren LRP5/6 in CD11c⁺ Antigen-präsentierenden Zellen zu einer verstärkten Inflammation führte und mit erhöhten histopathologischen Schäden im Kolongewebe einherging (Swafford et al. 2018). Um in Mausmodellen CED zu untersuchen, wird häufig eine Colitis mittels *dextran sodium sulfat* (DSS)- induziert (Eichele und Kharbanda 2017). Es wurde beschrieben, dass Wnt5a sowie ROR2 Knockout-Mäuse weniger DSS-induzierte Kolitis entwickelten und eine geringere proinflammatorische mRNA Zytokinexpression von TNF α und IL-6 im Vergleich zu Mäusen ohne wnt5a- Knockout im Kolon zeigten (Sato et al. 2015).

Außerdem konnten epigenetische sFRP5-Gen Methylierungen statistisch signifikant häufiger bei Colitis-Gewebeproben von CED Patienten als bei Gesunden festgestellt werden (Dhir et al. 2008). Kim et al. zeigten kohärent dazu, dass bei MC in Gewebeproben die sFRP5 Promotorregion zusammen mit weiteren Tumorsuppressorgenen hypermethyliert ist (Kim et al. 2020). Hypermethylierungen führen häufig zur Repression der Transkription (Lehmann 2010).

Aufbauend auf diesen Forschungsergebnissen wurden in dieser Arbeit erstmalig in vivo die wnt5a und sFRP5 Blutserumspiegel von CED Patienten untersucht. Außerdem wurde erforscht, wie sich die wnt5a und sFRP5 Level unter einer Therapie mit TNFi verhalten.

I.5.4 Spondylitis ankylosans

Die Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew, ankylosierende Spondylitis) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die zur Gruppe der axialen Spondyloarthritiden gehört und befällt hauptsächlich die Wirbelsäule und die Kreuz-Darmbein-Gelenke. Sie kann zur Versteifung der gesamten Wirbelsäule führen (Bambuswirbelsäule). Die Prävalenz beträgt 0,2 - 1,4 % in Europa je nach Häufigkeit des Auftretens des genetisch prädisponierenden HLA-B27-Merkmals. In 90 % der Fälle manifestiert sich die Krankheit zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr klassisch mit langanhaltenden nächtlichen Rückenschmerzen. Die Ursache der Erkrankung ist bis heute nicht geklärt und sie ist nicht heilbar (Puchner 2017). In der Pathophysiologie spielen TNF α und IL-17 eine relevante Rolle. Passend dazu konnten TNFi und IL-17-Inhibitoren als wirksame Therapiestrategien etabliert werden. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen Inflammation und Knochenumbau in SpA weiterhin unklar. Ein tieferes Verständnis dieser pathophysiologischen Vorgänge ist aber insbesondere deshalb wichtig, um Langzeitschäden des Knochens vorbeugen zu können (Sieper und Poddubnyy 2017). Die wnt-Signalwege könnten eine neue Verbindung zwischen Knochenstoffwechsel und Entzündung eröffnen, da sie sowohl im Knochenstoffwechsel als auch bei Entzündung von Bedeutung sind (Hoepfner et al. 2009). Bougault et al. konnten beispielsweise mittels ELISA zeigen, dass wnt5a in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit SpA im Vergleich zu Patienten mit Arthrose erhöht war. Außerdem beschrieben sie, dass die wnt5a Expression und Sekretion in Mäusenchondrozyten, -osteoblasten und -sehnenzellen durch TNF α reversibel vermindert wurde (Bougault et al. 2015). Auch sFRP5 scheint in den Knochenstoffwechsel involviert zu sein. Es wurde beschrieben, dass die sFRP5 mRNA Expression in Knochenmarks-fettgewebeprobe mit der Knochendichte und bekannten Knochenumbau markern (z.B. Osteocalcin und Alkalische Phosphatase) korrelieren (Chen H et al. 2017). Daher könnte sFRP5 auch mit dem gestörten Knochenstoffwechsel bei SpA assoziiert sein.

Auf diesen Forschungsergebnissen aufbauend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die wnt5a und sFRP5 Level bei Patienten mit SpA verändert sind, und wie sie sich unter einer Therapie mit TNFi verhalten. Viele SpA Erkrankungen werden zu spät oder gar nicht erkannt, da ein einfacher und zuverlässiger Biomarker für die Erkrankung fehlt. Deshalb wird untersucht, ob wnt5a und sFRP5 als serologische Biomarker für SpA in Frage kommen könnten.

I.6 Makrophagen und ihre Rolle bei Entzündung

Ob eine Zelle wnt5a exprimieren und/ oder empfangen kann, scheint maßgeblich vom Zelltyp, der Zelldifferenzierung und der daraus resultierenden Expression der Zellrezeptoren an der Zelloberfläche abzuhängen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Lymphozyten im Gegensatz zu Zellen der myeloischen Reihe kein wnt5a exprimieren (Blumenthal et al. 2006). Zu den Zellen der myeloischen Reihe, welche sowohl Zielzellen als auch wnt5a Produzenten sind, zählen Makrophagen. Sie spielen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündung eine Schlüsselrolle, welche durch die wnt5a-Signalgebung moduliert werden könnte. Makrophagen entstehen aus CD34 positiven Monozyten des Knochenmarks, welche im Blut zirkulieren und sich im peripheren Gewebe zu verschiedenen reifen gewebsständigen Makrophagen differenzieren können. Solche Gewebsmakrophagen zeichnen sich durch einen geringen Sauerstoffbedarf, eine geringe Proteinsyntheserate und Zytokinproduktion aus. Sie werden während einer Entzündung aktiviert und deaktiviert und spielen eine Schlüsselrolle für den Beginn, die Aufrechterhaltung und die Beendigung eines Entzündungsprozesses. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt beispielsweise bei Gewebsschädigung oder Infektion durch Zytokine wie z.B. TNF α , durch LPS oder durch extrazelluläre Matrixproteine (Fujiwara und Kobayashi 2005). Aktivierte Makrophagen erfüllen drei Hauptfunktionen: Antigen-Präsentation, Phagozytose und Immunmodulation durch die Produktion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren. Makrophagen werden häufig vereinfacht in die aktivierten (polarisierten) M1 und M2 Phänotypen unterteilt (Martinez und Gordon 2014). M1 Zellen werden klassischerweise über Interferon-gamma (IFN- γ) aktiviert und exprimieren z.B. IL-12 stark, aber IL-10 wenig. Sie produzieren inflammatorische Zytokine, agieren als Effektorzellen einer Th1-Immunantwort und bekämpfen intrazelluläre Parasiten und Tumoren. Im Gegensatz dazu beschreibt der M2 Phänotyp eine Reihe anderer antiinflammatorisch wirkender Makrophagen, welche z.B. durch IL-10 aktiviert werden und wenig IL-12 produzieren (Martinez et al. 2006). Manche Studien kommen zu dem Ergebnis, dass M1 Makrophagen die größte Quelle von wnt5a seien (Bhatt und Malgor 2014), andere beschreiben, dass M2 Makrophagen nach einer Aktivierung ebenfalls wnt5a ausschütten können (Bergenfelz et al. 2012; Mehmeti et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass Wnt5a selbst in vitro über den nicht kanonischen PCP-Signalweg durch JNK und NF κ B an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt ist (Kim et al. 2012). In tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) führt wnt5a zur

Ausbildung eines M2 Phänotyps über eine autokrine Sekretion von IL-10 (Liu et al. 2020). Zusätzlich trägt durch Makrophagen sezerniertes wnt5a zur Chemotaxis weiterer Makrophagen über eine gesteigerte Expression von CCL2 (CC-Chemokinligand 2) bei (Zhao et al. 2014).

Es ist von großer Bedeutung zu erfassen, welche Faktoren zu einer Ausschüttung von wnt5a durch Makrophagen beitragen, um die Signaltransduktion über wnt5a besser beleuchten zu können. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage, um chronische Entzündungsreaktionen im Rahmen einer dysregulierten Immunantwort zu verstehen und durch Interventionen beherrschen zu können. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob ein pro-inflammatorisches Milieu die Ausschüttung von wnt5a fördert.

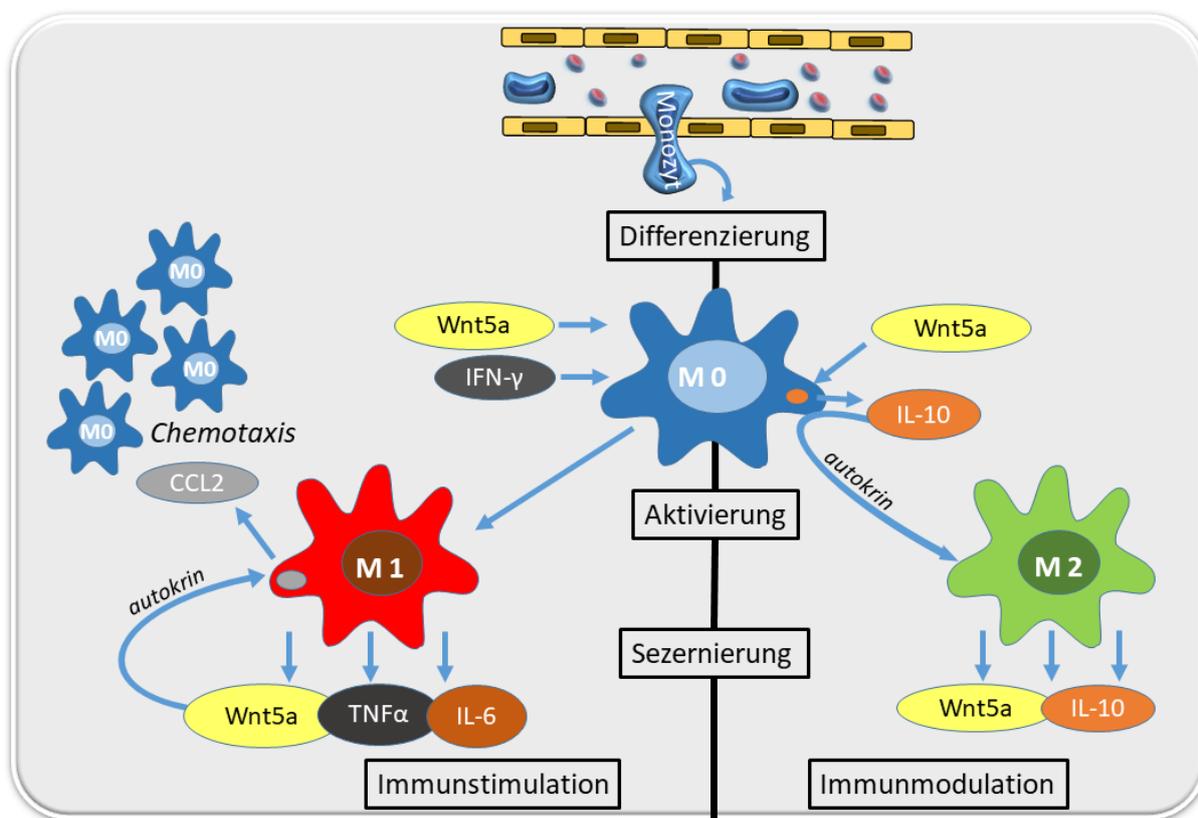


Abbildung 3: Vereinfachte Skizze der Effekte von Wnt5a in Makrophagen. Monozyten wandern aus dem Blut in das Gewebe ein und differenzieren sich zu Makrophagen (M0). Diese Makrophagen werden über verschiedene Signale aktiviert. Links: wnt5a und IFN-γ aktivieren M1 Makrophagen. Diese sezernieren wnt5a und proinflammatorische Signale wie TNFα und IL-6 und führen zu einer Immunstimulation. Wnt5a steigert über CCL2 die Chemotaxis und damit Rekrutierung und Migration weiterer Makrophagen. Diese Signaltransduktion wurde allgemein für Makrophagen beschrieben und nur aus Darstellungsgründen den M1 Makrophagen zugeordnet. **Rechts:** In tumorassoziierten Makrophagen führt wnt5a zu einer autokrinen Sekretion von IL-10, die M2 Makrophagen aktiviert. Diese sezernieren wnt5a und IL-10 und fördern die Immunmodulation.

I.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, eine quantitative Bestimmung der wnt5a- und sFRP5-Serumkonzentrationen bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen durchzuführen. Es soll ferner bestimmt werden, wie sich diese Serumkonzentrationen longitudinal über die Zeit unter einer Therapie mit Biologika verhalten. Diese Untersuchungen sollen das Verständnis des entzündungsassoziierten wnt5a-/ und sFRP5 Systems bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen vertiefen. Daraus sollen Schlüsse gezogen werden, ob eine Dysregulation auf systemischer Ebene vorliegt und wie diese durch eine Therapie mit Biologika beeinflusst wird. Diese Fragestellungen wurden in einer translationalen Humanstudie aus der *Biologica follow up* (BFU) - und der *Food Chain plus* (FoCus) - Kohorte untersucht. Weiter soll in einem Zellkulturexperiment untersucht werden, welchen Einfluss ein proinflammatorisches Milieu auf die wnt5a Signalgebung durch Makrophagen hat, um Rückschlüsse auf die Signaltransduktion im Kontext einer Entzündungsreaktion zu ziehen.

II Material und Methoden

II.1 Studientyp und Studienpopulation

Es wurde eine prospektive, monozentrische Beobachtungsstudie durchgeführt bei der 133 Patienten mit verschiedenen chronisch entzündlichen Krankheiten von 2011 bis 2013 untersucht wurden. In Form einer Fall-Kontrollstudie wurden 133 gesunde Individuen mit den erkrankten Individuen verglichen. Dazu wurden die wnt5a und sFRP5 Serumspiegel der Probanden mittels ELISA gemessen. 107 Patienten bekamen eine Anti-TNF α Therapie.

II.1.1 Die Kieler Biologica follow-up Kohorte (BFU)

Die BFU-Kohorte wurde durch das Comprehensive Centre for Inflammation Medicine (CCIM) an der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland rekrutiert. Zur Teilnahme an der Studie wurden Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen eingeladen, die ein Therapieversagen unter konventionellen DMARDs (Disease modifying anti-rheumatic drugs) erlitten hatten. Die Aufnahme in die Studie wurde durch eine interdisziplinäre Entzündungskonferenz entschieden. Der Konferenz gehörten Rheumatologen, Gastroenterologen, Dermatologen, Pädiater, Ophthalmologen und Endokrinologen an. Vom Dezember 2011 bis Oktober 2013 wurden die Patienten rekrutiert. Insgesamt wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit 133 Patienten eingeschlossen. 107 Patienten bekamen eine Anti-TNF α Therapie und wurden vier Krankheitsgruppen zugeteilt. Darunter waren n = 35 Patienten mit CED, n = 33 Patienten mit RA, n = 18 Patienten mit SpA und n = 18 Patienten mit Pso. Es wurde nicht zwischen Patienten mit Pso und Psoriasis-Arthritis unterschieden, sondern beide Krankheiten wurden in der Gruppe der Psoriasispatienten zusammengefasst. Die Gruppe CED setzte sich aus Patienten mit Morbus Crohn (n = 23) und Colitis ulcerosa (n = 12) zusammen. Es kamen die TNF α Inhibitoren Infliximab (n = 44), Etanercept (n = 33), Adalimumab (n = 18), Certolizumab (n = 10) oder Golimumab (n = 2) zum Einsatz. Ein Patient mit Acne inversa und zwei Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis erhielten ebenfalls eine Anti-TNF α Therapie und wurden in die Studie einbezogen. 26 Patienten hatten diverse chronisch entzündliche Erkrankungen, die mit anderen Biologika behandelt wurden: Panniculitis (n = 1, Therapie: Tocilizumab), Polychondritis (n = 2, Therapie: Tocilizumab), Psoriasis pustulosa palmoplantaris (n = 1,

Therapie: Anakinra), RA (Therapie: Abatacept (n = 3), Tocilizumab (n = 3), Rituximab (n = 1), adulter M. Still (n = 1, Anakinra), Sarkoidose (n = 2, Therapie: nicht angegeben), SLE (Therapie: Belimumab (n = 7), Sifalimumab (n = 1)), Vaskulitis (Therapie: Rituximab (n = 1), Tocilizumab (n = 2)).

II.1.1.1 Krankheitsaktivitätsscores

Es wurden klinische Krankheitsaktivitätsscores zu den drei Zeitpunkten erhoben. Diese sollten dazu dienen, die Wirksamkeit der Therapie zu überprüfen. Bei RA wurde der Disease Activity Score 28 (DAS 28) bestimmt. Dieser Score dient der quantitativen Beurteilung des Krankheitszustandes und -fortschritts. Die Werte gehen von 2,0 bis 10,0 und ein Wert unter 2,6 wird als Remission gewertet. Bei MC wurde der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) angewendet. Dieser Index setzt sich aus 8 Faktoren zusammen, welche je mit einem Gewichtungsfaktor multipliziert werden. Ein Wert < 150 definiert eine Remission der Erkrankung. Bei CU wurde der Colitis Activity Index (CAI nach Rachmilewitz) erhoben. Ein Wert >5 Punkte spricht dabei für eine aktive Erkrankung. Bei SpA wurde der Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) erhoben. Der BASDAI ist ein Fragebogen, welchen der Patient selbst ausfüllt. Er bezieht unter anderem die Morgensteifigkeit mit ein. Ein Wert < 4 spricht für eine Remission.

Bei Pso wurde je nach Befall der Psoriasis Area and Severity Index (PASI), der BASDAI oder DAS 28 angewandt. Der PASI bezieht sich auf den Hautbefall, der BASDAI und DAS 28 auf den Gelenkbefall bei Psoriasisarthritis (Langhorst et al. 2008; Puchner 2017).

II.1.2 Die Kieler Food Chain plus Kohorte (FoCus)

Als Kontrollkohorte wurden Patienten aus der Food Chain plus Kohorte (FoCus) gewählt. Diese populationsbasierte Studie untersucht mittels klinischer und experimenteller Verfahren, ob bestimmte Nahrungsmittel entzündungshemmend wirken. Die FoCus-Patienten wurden aus einer monozentrischen Querschnittsstudie von 2011-2015 rekrutiert. Die Studie wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung als Verbundprojekt gefördert. (Müller et al. 2015). Bei 1153 Probanden wurden im Rahmen dieser Studie bis Dezember 2015 Daten erhoben. 653 dieser Probanden wurden durch das Einwohnermeldeamt Kiel einbezogen. Weitere 500 adipöse Probanden rekrutierte die Adipositassprechstunde der Ambulanz des

Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Jedem der 133 Patienten der BFU Kohorte wurde in der vorliegenden Studie ein Patient aus dem Kontingent des Einwohnermeldeamts der FoCus Kohorte als Kontrolle zugeordnet. Diese Zuteilung erfolgte unter Berücksichtigung des Alters, Geschlechts und des Body-Mass-Index (BMI). Größe und Gewicht wurden nicht per Selbstauskunft erhoben, sondern vor Ort gemessen.

II.1.3 Blutentnahme und -analyse

Bei den Patienten wurde spätestens eine Woche vor dem Start der Anti-TNF α Therapie, sowie 6 und 26 Wochen während der Therapie eine venöse nüchterne Blutentnahme durchgeführt und bei -80 °C bis zur Untersuchung eingefroren. Im Analyseautomaten des Zentrallabors des Universitätsklinikums SH wurden folgende Blutparameter zu allen drei Zeitpunkten bestimmt: AST, ALT, gGT, AP, ges. Bilirubin, Leukozyten, Kreatinin und das C-reaktive Protein (CRP). Der kleinste Messbare CRP-Wert lag bei 0,9 mg/L. Werte unter 0,9 mg/L wurden auf 0,9 mg/L gesetzt. In der FoCus Kohorte wurde der CRP-Wert zum Zeitpunkt 0 bestimmt.

II.1.4 Bestimmung der sFRP5 und wnt5a Serumlevel mittels ELISA

Die quantitative Proteinbestimmung der wnt5a und sFRP5 Blutserumspiegel wurde mit Hilfe eines *Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Im Allgemeinen beruht die Wirkungsweise eines ELISA auf einer Antigen-Antikörperbindung und wurde 1971 von Engvall und Perlmann 1971 entwickelt (Engvall und Perlmann 1971). Ein *Sandwich*-ELISA zeichnet sich im Gegensatz zum direkten ELISA dadurch aus, dass das Antigen, zwischen zwei Antikörpern liegt. Auf der ELISA Platte befinden sich 96 Vertiefungen, die mit immobilisierten, spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Nachdem diese primären Antikörper an ein Epitop des gesuchten Antigens gebunden haben, werden weitere sekundäre Antikörper hinzugegeben, welche an ein weiteres Epitop des Antigens binden. Anschließend werden tertiäre Antikörper verwendet, die eine *Horseradish Peroxidase* (HRP) an ihrer konstanten Domäne tragen und an die zuvor eingesetzten Antikörper binden. Die anschließende Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat der Peroxidase führt zu einer Farbreaktion. Diese Reaktion wird durch den Einsatz einer Schwefelsäurelösung gestoppt und anschließend wird der Farbumschlag anhand eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die wnt5a bzw. sFRP5 Konzentration der einzelnen Proben wurde dann im Vergleich zur

Standardkurve bestimmt. Für die Bestimmung der wnt5a Konzentrationen wurde das SEP549Mi ELISA Kit der Firma *Cloud-Clone Corporation* (CCC) verwendet. Der Detektionsbereich lag bei 0,156-10 ng/mL und die kleinste messbare Konzentration bei 0,058 ng/mL. Bei den Bestimmungen der sFRP5 Konzentrationen wurde das SEC842HU ELISA Kit von CCC eingesetzt. Der Detektionsbereich lag bei 6,25-100 ng/mL. Die kleinste messbare Konzentration lag bei 2,53 ng/mL. Die ELISAs wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und anschließend ein Mittelwert bestimmt.

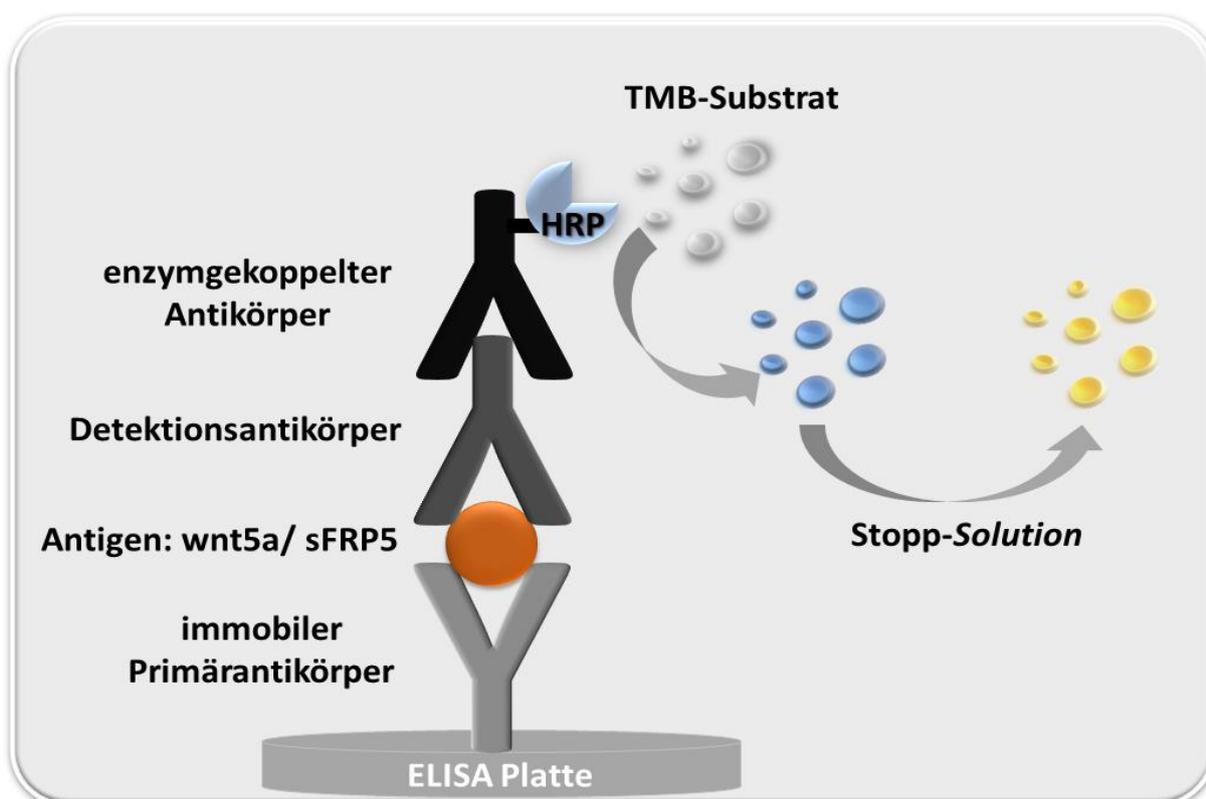


Abbildung 4: Skizze der Funktionsweise eines *Sandwich*-ELISA zur quantitativen Proteinbestimmung von wnt5a oder sFRP5. Das Antigen bei Anwendung des SEC842Hu ist sFRP5, bei Anwendung des SEP549Hu handelt es sich um Wnt5a. HRP = *horsradish peroxidase*; TMB = Tetramethylbenzidin (modifiziert nach Kummitha et al. 2010).

Nachfolgend wird die Vorgehensweise bei der Durchführung des ELISA für sFRP5 und wnt5a exemplarisch am SEP549MI ELISA Kit erklärt. Die Angaben richten sich nach den Herstellerangaben der CCC. Der Standard, das Detektionsreagenz A, das Detektionsreagenz B und die verschlossene 96-well-Platte wurden bei -20 °C gelagert und erst 30 min vor Beginn auf Raumtemperatur aufgetaut. Alle weiteren Substanzen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die bei -80 °C eingefrorenen Serumproben wurden über 2 Stunden bei 4 °C aufgetaut und anschließend bis zum Beginn des ELISA auf Raumtemperatur gebracht. 15 min vor dem Assay

wurde der Standard hergestellt. Eine Standardtablette wurde in 1 mL Standard-Verdünnungsmittel im ersten Reaktionsgefäß gelöst und per Vortexer durchmischt. Dies ergab eine Konzentration von 40 ng/mL. Diese Standardkonzentration wurde nun auf 10 ng/mL verdünnt, indem 250 µL der Standardkonzentration in das zweite Reaktionsgefäß gegeben und 750 µL Standard-Verdünnungsmittel dazugegeben wurden. Um eine Verdünnungsreihe herzustellen wurden 500 µL Standard-Verdünnungsmittel in die Reaktionsgefäße 3-9 vorgelegt und anschließend jeweils 500 µL der vorherigen Verdünnung in die 500 µL des vorgelegten Standards umgefüllt (Abb. 5). Das achte Gefäß enthielt somit eine Konzentration von 0,156 ng/mL. Das neunte Reaktionsgefäß enthielt ausschließlich Standard-Verdünnungsmittel und somit die Konzentration 0 ng/mL.

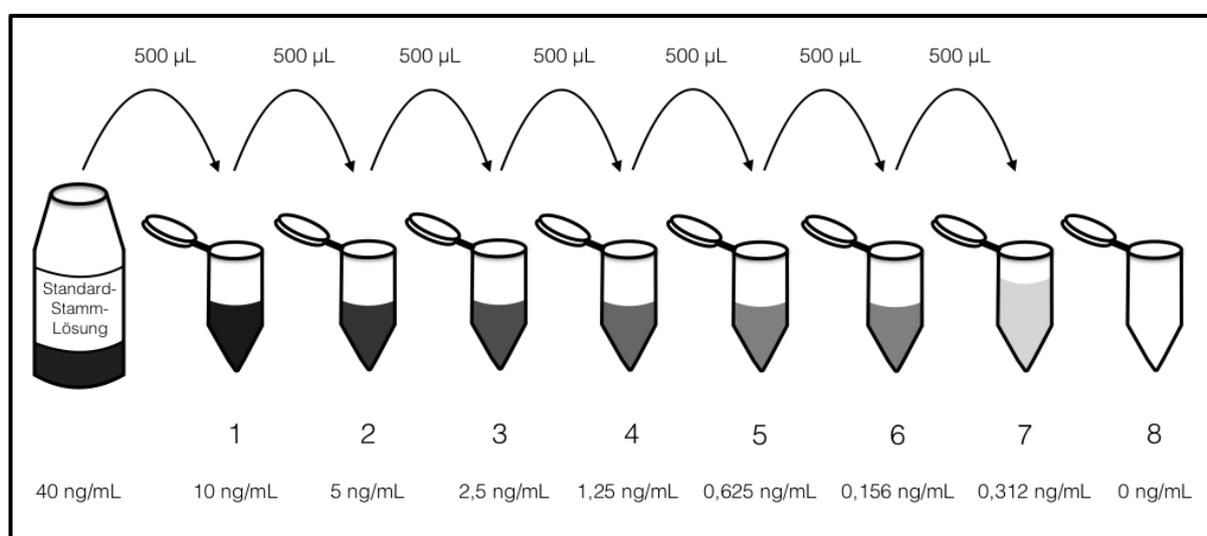


Abbildung 5: Standardherstellung in einer Verdünnungsreihe. Skizze aus der Bedienungsanleitung des SEC842Hu der Cloud-Clone Corp.

Die Proben wurden vor jeder Verdünnung jeweils gevortext und abzentrifugiert. Von den Standardkonzentrationen wurden je 100 µL dazupipettiert. Ebenso wurden 100 µL der Serumproben nach kurzer Zentrifugation in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen, in Alufolie eingewickelt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. 10 min vor dem Ende der Inkubationszeit wurde das Detektionsreagenz A hergestellt. Dazu wurden 12 mL Verdünnungsmittel A mit 120 µL Reagenz A vermischt, sodass eine 1:100 Verdünnung entstand. Am Ende der Inkubation wurde der Inhalt der Vertiefungen ausgekippt und sanft auf einem Tuch ausgeklopft. Darauffolgend wurden 100 µL der Lösung A (ein biotinygebundener Antikörper) in jede Vertiefung pipettiert und wieder mit der Folie verschlossen, mit Alufolie eingewickelt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. 15 min vor dem

Ende der Inkubationszeit wurden die Waschlösung, das Detektionsreagenz B und das Verdünnungsmittel B auf Raumtemperatur gebracht und hergestellt. Um eine 1:100 Verdünnung des Lösung B zu gewinnen, wurden wieder 12 mL Verdünnungsmittel B mit 120 μ L Reagenz B vermischt. Die Waschlösung wurde aus 580 mL destilliertem Wasser und 20 mL konzentrierter Waschlösung (30-fach) zusammengemischt.

Zum Ende der Inkubationszeit wurde der Inhalt der ELISA Platte ausgekippt und anschließend dreimal gewaschen. Jeder einzelne Waschgang bestand darin, dass 300 μ L Waschlösung in jede Vertiefung pipettiert wurden und nach 1 min wieder ausgeschüttet wurden. Nach dem letzten Waschgang wurde überprüft, ob auch wirklich die komplette Waschlösung entfernt wurde. Anschließend wurden 100 μ L der Lösung B in jede Vertiefung pipettiert, die Platte abgedeckt, in Alufolie eingewickelt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden das TMB Substrat und die Stopplösung lichtgeschützt auf Raumtemperatur gebracht. Am Ende der Inkubationszeit wurde der oben genannte Waschvorgang fünfmal wiederholt und anschließend 90 μ L TMB Substrat in jede Vertiefung pipettiert. Es konnte ein blauer Farbumschlag in verschiedenen Intensitäten beobachtet werden. Die ELISA Platte wurde danach wieder abgedeckt, in Alufolie eingewickelt und für 20 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50 μ L Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert und gemischt. Damit die photometrische Messung nicht durch Wassertropfen und Luftblasen verfälscht wurde, wurden sie vor der Messung entfernt. Im unmittelbaren Anschluss daran wurde die photometrische Messung bei 450 nm durchgeführt. Es wurde bei Doppelbestimmungen der Mittelwert errechnet und die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte anschließend in Bezug auf die ermittelten Standardkurven.

II.2 THP-1 Zellkulturexperiment

Die THP-1 Zellen wurden vom Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen. Sie wurden aus dem Blut eines 1-jährigen an Akuter monozytärer Leukämie leidenden Jungen kultiviert (Tsuchiya et al. 1980). Die Teilungszeit beträgt 35 - 50 Stunden. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL Einfriermedium. Das THP-1 Nährmedium enthielt Zusatzstoffe, um das Zellwachstum zu optimieren und wurde vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt.

II.2.1 Kultivierung der THP-1 Zellen

Unter stetigen Inkubationsbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration erfolgte die Kultivierung der THP-1 Zellen im Nährmedium. Die dafür verwendeten 72 cm² Zellkulturflaschen waren mit einer austauschaktiven Verschlusskappe versehen. Alle 3-4 Tage wurde das Nährmedium ausgetauscht. Dazu wurde die Zellsuspension in ein Falcon überführt, bei 1200 *revolutions per minute* (rpm) 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand des Mediums mit einer Pasteurpipette abgesaugt, bis nur noch das Zellpellet am Boden des Falcon verblieb. Die Zellen wurden in 10 mL neuem vorgewärmten Nährmedium resuspendiert und anhand der Neubauer-*improved* Zählkammer gezählt.

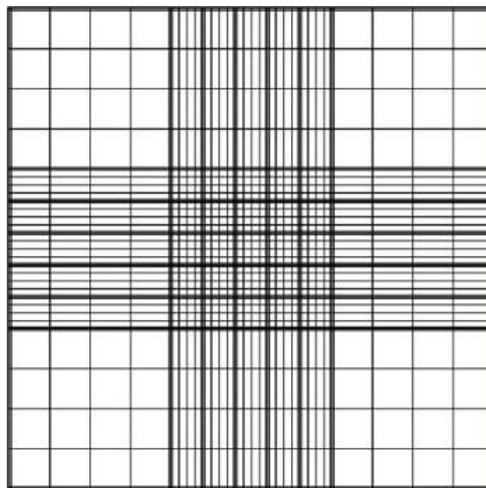


Abbildung 6: Neubauer-*improved* Zählkammer. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Mittelwert von den vitalen Zellen der äußeren Quadranten gebildet (Gstraunthaler und Lindl 2013).

Vor der Zählung, wurden 10 µL der Zellsuspension zu 90 µL Trypanblau hinzugegeben und mehrmals durchmischt. Diese Mischung wurde zwischen die Neubauer-*improved* Zählkammer und das darüber liegende Deckglas gegeben. Der Farbstoff Trypanblau dringt in die beschädigten Membranen toter Zellen ein, sodass diese sich unter dem Lichtmikroskop farblich von den transparent erscheinenden vitalen Zellen unterscheiden lassen (Schmitz und Desel 2018). Aus den gezählten lebenden Zellen der vier äußeren Quadrate der Zählkammer wurde der Mittelwert gebildet. Eine dreifache Linie bildet die Grenze zu den anderen Quadranten. Die mittlere dieser drei Linien diente als Begrenzung.

Zur Zelldifferenzierung wurde eine 6-*well*-Platte mit $1,5 \times 10^6$ Zellen pro *well* verwendet. Jedes dieser *wells* wurde mit 2 mL Zellsuspension befüllt, sodass ein Gesamtvolumen von 2 mL x 6 *wells* plus 2 mL Sicherheitszuschlag an Nährmedium benötigt wurden. Die

zusätzlichen 2 mL stellten sicher, dass trotz Pipettierfehlern stets genug Zellsuspension für die *wells* verfügbar war. Daraus berechnete sich eine benötigte Zellzahl von $10,5 \times 10^6$ Zellen in 14 mL Zellsuspension. Mit dem Mittelwert (\bar{X}) der gezählten Zellen, ließ sich die benötigte Menge der Zellsuspension in mL (S), die auf ein Volumen von 14 mL aufgefüllt wurde, berechnen:

$$S = 10 \text{ mL} / \left(\frac{\bar{X}}{10,5} \right)$$

Wenn die Zellen nicht zur Differenzierung ausgesät wurden, erfolgte zur Erhaltung der Kultur eine Aufteilung in zwei oder drei Teile, je nach Zelldichte. Anschließend wurde die Kultur auf 15 mL frisches Medium aufgefüllt, in neue Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank bis zur nächsten Passage inkubiert.

II.2.2 Aussaat und Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen

Um die Differenzierung der THP-1 Zellen zu Makrophagen durchführen zu können, wurden jeweils 2 mL Zellsuspension mit $1,5 \times 10^6$ Zellen, in 5 *wells* der 6-*well*-Platte pipettiert. Anschließend wurde eine 1:10 *Phorbol-12-Myristat-13-Acetat* (PMA) Verdünnung angesetzt. PMA wurde in den Händen aufgetaut und anschließend wurden 2 μL (Stocklösungskonzentration: 1 mg/mL Dimethylsulfoxid (DMSO)) zu 18 μL dH_2O gegeben und für 3 Sekunden gevortext. Mit Ausnahme der Negativkontrolle im *well* B3, wurden anschließend in jedes *well* 2 μL dieser PMA-Verdünnung pipettiert. Zur Vermischung mit der Zellsuspension wurde die Platte geschwenkt. Die Zellen der Negativkontrolle in B3 blieben undifferenziert. Die Platte wurde 24 Stunden in den Inkubator gestellt, bevor ein Wechsel des Nährmediums erfolgte. Alle 4 *wells*, denen PMA zugesetzt wurde, wurden abgesaugt und mit 2 mL PBS gewaschen, damit tote oder nicht adhärent gewachsene Zellen entfernt wurden. Das PBS wurde abgesaugt und es wurden 2 mL frisches Nährmedium zu den Makrophagen hinzugegeben, bevor eine weitere Inkubation für 12 oder 24 Stunden erfolgte. Danach wurde die Waschung durch PBS und Zugabe von 2 mL neuem Nährmedium wiederholt.

II.2.3 Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden jeweils mit drei verschiedenen entzündungsfördernden Substanzen stimuliert. In alle *wells* wurden 10 μL DMSO hinzugegeben, um gleiche Bedingungen für die

Zellen in jedem *well* zu gewährleisten, da LPS bereits in DMSO gelöst war. Es wurde eine 1:10 LPS Verdünnung hergestellt. Dazu wurden 2 μ L LPS-Stocklösung (Konzentration 1 mg/mL) mit 18 μ L Medium gemischt. Anschließend wurden 2 μ L dieser LPS-Verdünnung in *well* A2 pipettiert. Für die Stimulation mit IL-6 und TNF α wurden jeweils 2 μ L der jeweiligen Stocklösung (Konzentration 10000 ng/ μ L) in *well* A3 bzw. B1 pipettiert. Die Zielkonzentration der jeweiligen Stimulanzien betrug somit 10 ng/ml. Anschließend wurden die Zellen für 1 min geschwenkt und für 24 h inkubiert.

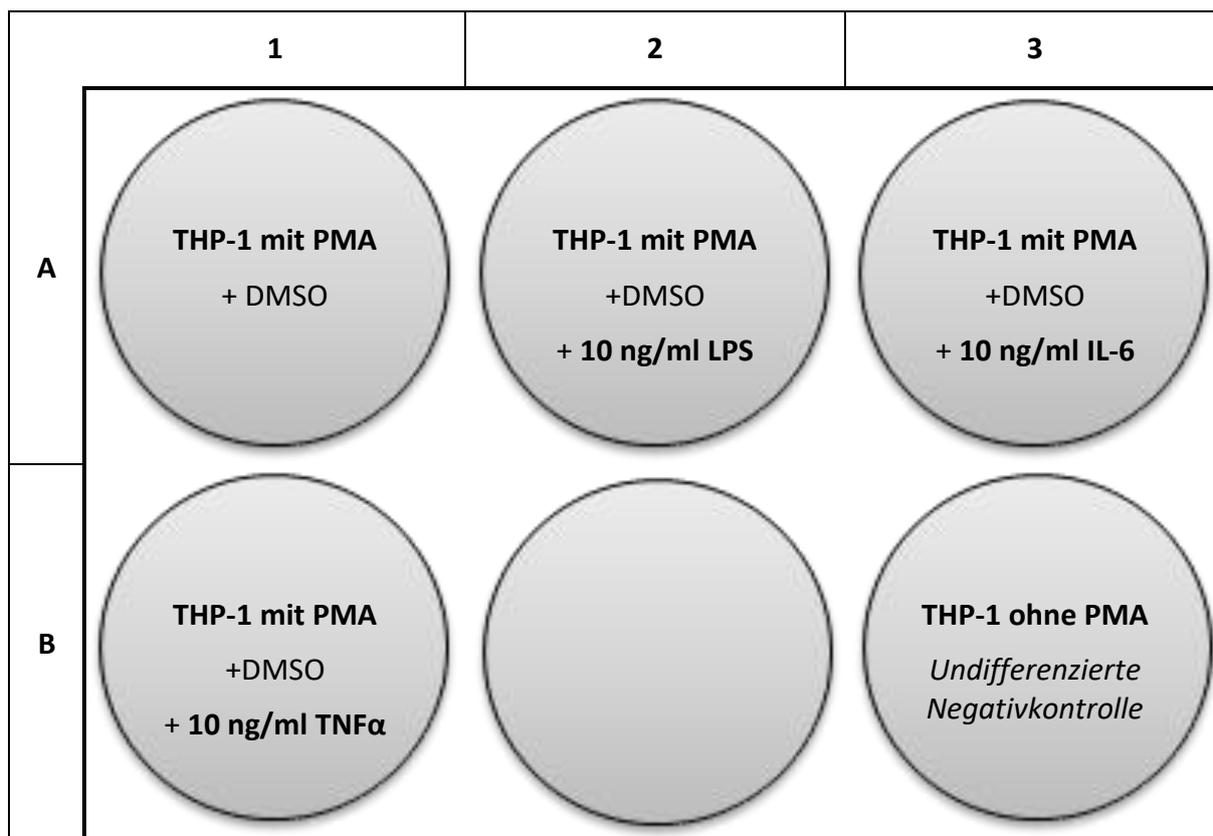


Abbildung 7: Pipettierschema der 6-*well*-Platte: THP-1 ist eine humane monozytäre Zellreihe, die mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zur Differenzierung angeregt wurde und zusätzlich mit jeweils 10ng/ml Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin-6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) stimuliert wurde. DMSO = Dimethylsulfoxid

Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 mL PBS gewaschen und anschließend mit 500 μ L *Radio Immuno Precipitation Assay* (RIPA) -Puffer pro *well* lysiert und mit einem Schaber von der Platte gelöst. Die entstandenen Lysat-Suspensionen wurden durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in 1,5 mL Volumen Reaktionsgefäße überführt. Die undifferenzierte Negativkontrolle B3 wurde als Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Es erfolgte das Absaugen des Überstands. Das verbliebene Zellpellet wurde zum Waschen mit 2 mL PBS resuspendiert, anschließend

wieder zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und darauffolgend das Zellpellet ebenfalls mit 500 μ L RIPA-Puffer resuspendiert. Die Proben in den Reaktionsgefäßen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, bis sie für den nächsten Versuchsschritt auf Eis langsam wieder aufgetaut wurden. Zur Vorbereitung auf den Bradford-Assay wurden den Proben *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) (Konzentration 1:100) und PhosStop (Konzentration 1:10) hinzupipettiert. PIC inhibiert Proteasen und PhosStop verhindert eine Dephosphorylierung. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13330 rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand für die Proteinbestimmung nach Bradford genutzt. Das Zellpellet wurde verworfen.

II.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay dient dazu, die Proteinkonzentration quantitativ photometrisch zu bestimmen. Durch die Verbindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 mit Proteinen kommt es zu einem Farbumschlag. Diese Bindung erfolgt bevorzugt an basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine, am stärksten mit Arginin- und Lysinresten. Im sauren Milieu entsteht durch diese Bindung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Bindet der Farbstoff an Proteine, ändert sich seine Farbe von rot zu blau (Reisner et al. 1975). Für die Durchführung des Assays wurde zur Kalibrierung eine Standardreihe angesetzt, um die Konzentration eines Proteingemisches zu bestimmen. Als Standard-Proben wurden *Bovine Serum Albumin* (BSA) Konzentrationen ausgewählt und eine Blank-Probe, welche ausschließlich aus dH_2O bestand (Tab. 1).

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit dH_2O auf eine Konzentration von 1:10 verdünnt und als Doppelbestimmung mit den Standardproben und der Blank-Probe auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Zusätzlich wurde eine 200 μ L 1:5 BioRad-Reagenz Verdünnung dazupipettiert. Dieses BioRad-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das BioRad Reagenz vermischt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen an der Oberfläche entstanden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde mit Hilfe eines Mikroplattenlesers die Extinktion der einzelnen Proben photometrisch gemessen. Anhand der unterschiedlichen Standardkonzentrationen ließ sich eine Standardkurve bilden. Die Funktion der linearen Ausgleichsgeraden dieser Standardkurve wurde später verwendet, um die Proteinkonzentration der Proben zu berechnen.

Tabelle 1: Verwendete BSA Konzentrationen für die Standardkurve

Standard-Reihe	Massenkonzentration β
S1	1,0 mg/mL
S2	0,5 mg/mL
S3	0,25 mg/mL
S4	0,125 mg/mL
S5	0,060 mg/mL
S6	0,030 mg/mL

II.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese dient dazu, Proteine durch Wanderung an einem elektrischen Gradienten ihrer Größe nach aufzutrennen (Eckert und Kartenbeck 1997). Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine wird die Eigenladung der Proteine maskiert. Die SDS-Protein-Komplexe sind stark negativ geladen und wandern in der Gelelektrophorese Richtung Anode (Horton et al. 2008). Es wurden zwei SDS-Polyacrylamidgele genutzt. Ein 5 %-iges Sammelgel und ein 12 %-iges Trenngel mit einer Stärke von jeweils 1 mm (Tab. 2).

Ein Ladepuffer, der sich aus aus 90 μ L Laemmli-Puffer (4x) und 10 μ L β -Mercaptoethanol zusammensetzte, wurde jeder Probe hinzugefügt. Dieser Schritt führt dazu, dass die Disulfidbrücken der Proteine reduziert wurden. Anschließend folgte eine Denaturierung bei 95 °C im Heizblock für 5 min. Dadurch entfalten sich die Proteine und es verbleibt die Primärstruktur als lineare Polypeptidketten. Das erlaubt eine Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse, da längere Proteine im Gel langsamer wandern. In die einzelnen Taschen des Gels wurden 30 μ g Protein pro Probe pipettiert, nachdem jede Probe mit der gleichen berechneten Menge an RIPA -Puffer versehen wurde. Bei 80 mV durchliefen die Proteine für 10 min das Sammelgel. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 120 V für ca. 1,5 h. Neben den Proben, wurde ein Molekularmassemarker mitgeführt, der aus Proteinen definierter Molekülmassen bestand.

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS Gele

5 %-iges Sammelgel	12 %-iges Trenngel
1,1 mL H ₂ O	2 mL dH ₂ O
0,2 mL SDS (1 %)	0,7 mL SDS (1 %)
0,4 mL Tris HCL (0,658 M)	1,4 mL Tris HCL (1,88 M)
0,3 mL Acrylamid (30 %)	2,9 mL Acrylamid (30 %)
10 µL APS	30 µL APS
2 µL TEMED	6 µL TEMED

II.2.6 Semidry Westernblot

Nach Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS Page, wurden die Proteine mit Hilfe der *Semidry-Blot* Methode von einem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran transferiert. Dieser Transfer ist von Vorteil, da eine Membran stabiler als ein Gel ist und die sich auf der Membran befindenden Proteine wiederholt analysiert werden können. Die Übertragung erfolgte mittels „*Semidry-Blotting*“. Dazu wurde das Elektrophoresegel auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran gelegt. Darüber und darunter wurden mit verschiedenen Puffern getränkte Filterpapiere platziert. Ein Spannungsübertragungsgerät

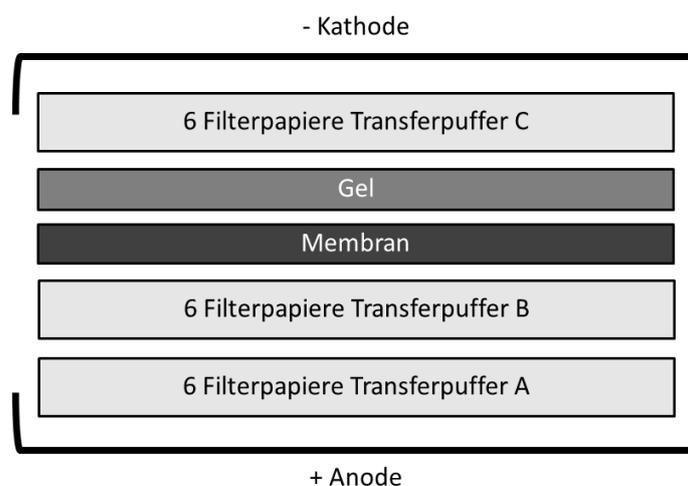


Abbildung 8: Aufbau Westernblot Semidry. Dabei werden die Proteine vom Elektrophoresegel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran, bei einer Spannung von 70 mA transferiert.

wurde so installiert, dass der Stapel die Kathode und Anode berührte und Strom fließen konnte (Abb. 8). Der Proteintransfer erfolgte bei 70 mA für 45 min. Im nächsten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur mit 20 mL 5 %-iger Milchlösung blockiert.

II.2.7 Immundetektion

Ein spezifischer Primärantikörper von wnt5a wurde in einer Konzentration von 1:1000 auf die Membran gegeben und in 10 mL Milchpufferlösung für 16-24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Bei Versuch 1 und Versuch 3 wurde eine 1:250 Konzentration gewählt, da bei 1:1000 das Detektionssignal zu schwach für eine Auswertung ausfiel. Durch das anschließende 3 x 5 minütige Waschen mit *Tris-buffered saline* mit Tween 20 (TBS/T) wurden nicht gebundene, überschüssige bzw. unspezifisch gebundene primäre Antikörper entfernt. Darauf folgend wurde der sekundäre HRP-Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 für 45 min bei Raumtemperatur in 5 %-iger Milchlösung inkubiert und anschließend der Waschvorgang mit TBS/T wiederholt. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 5 min in 1000 µL des Substratgemischs eines *enhanced chemiluminescence* Kits inkubiert. Eine densitometrische Auswertung der Proteinbanden wurde mit dem ChemiDoc XRS+ und der Software Image Lab durchgeführt. Die Chemolumineszenzsubstrate wurden durch erneutes Waschen mit TBS/T von der Membran entfernt. Damit weitere Proteine nachgewiesen werden konnten, mussten zunächst die primären und sekundären Antikörper mit *Restore Plus Western Blot Stripping Buffer* von der Membran entfernt werden. 20 mL des *Stripping*-Puffers wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS/T gewaschen. Nachdem die Antikörper von der Membran gelöst waren, erfolgte erneut ein Blocken mit Milchprotein, da auch unspezifische Bindungsstellen durch das Lösen der Antikörper wieder frei geworden waren. Es folgte die Bestimmung von Aktin (primäre Antikörperkonzentration 1:1000) als Ladekontrolle. Aktin ist eines der am stärksten konservierten Haushaltsproteine, welches eine ubiquitäre und hohe Expression in Zellen hat. Es ist ein Bestandteil des Zytoskeletts. Durch die Bestimmung von Aktin konnte anschließend die Ratio von wnt5a und Aktin errechnet werden und es konnten eventuelle Schwankungen der aufgetragenen Proteingesamtmenge erkannt und rechnerisch korrigiert werden.

II.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm R für Windows Version 3.3.6. und Microsoft Excel 2019. Bei der Testung auf Normalverteilung wurde der Shapiro Wilk-Test angewendet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde der T-Test durchgeführt. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) ausgeführt. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde der Wilcoxon- oder der Mann Whitney-Test angewendet. Für abhängige Stichproben wurde der Friedman-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal Wallis-Test angewendet. In Bezug auf Korrelationsanalysen wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient ausgeführt. Werte mit einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und die Effektstärke wurde über das partielle Eta-Quadrat (η^2) angegeben. Bei multiplem Vergleichen wurden mittels Bonferroni-Korrektur die p-Werte mit der Anzahl der Tests adjustiert: $p^* = p \times n$ (p^* = adjustierter p-Wert; p = p-Wert; n = Anzahl der Tests).

II.4 Ethik

Die Studie wurde der Ethikkommission der Universitätsklinik Kiel vorgestellt und genehmigt: Ethikvotum-Nr.: A156/03 vom 25.11.2003; CCIM-Ergänzungen: 23.3.2010; 13.7.2011 und 28.07.2011.

II.5 Material und verwendete Reagenzien

In den nachfolgenden Tabellen sind alle Materialien aufgelistet, die für den experimentellen Teil der Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Material für quantitative Proteinbestimmung nach ELISA

Verwendete Geräte	Hersteller/ Artikelnummer
(Schüttel-) Inkubator	Inkubator GFL 3032 der Firma Gesellschaft für Labortechnik mbH
Absorptions-Messungs- Photometer	Berthold Technologies, Mithras LB 940
Auswertung	Micro Win 2000
Eisschrank	Thermo Scientific Herafreeze BHFU400B, Temperatur - 80 °C
Eisschrank	Liebherr, Gefrierschrank GNP 3755 Premium NoFrost, Temperatur -20°C
Kühlschrank	FKS 3600-1 der Firma Liebherr, 4°C
Schüttler	Heidolph Reax 2010
Vortexer	Vortex-Genie2, Scientific Industries
Zentrifugen	Micro centrifuge, Model 1 R, 220VAC, 6000 RPM, Firma Roth
Verwendete Kits	Hersteller/ Artikelnummer
ELISA-Kit wnt5a	SEP 549Mi, Organism Species: Multi-species, Cloud-Clone Corp.
ELISA-Kit sFRP5	SEC842Hu, Organism Species: Homo sapiens (Human), Cloud-Clone Corp.
Verbrauchsmaterialien	Hersteller/ Artikelnummer
Destilliertes Wasser	Reinstwasseranalyse Ultra Clear UV plus TM / 0814885-01, Winlab
Pipetten	Research Plus 0,5-10 µL, 100 µL und 1000 µL der Firma Eppendorf
Pipetten	Research Plus 300 µL Multichannel-Pipette Eppendorf, Q48827E
Pipetten-Spitzen	Quality Pipette Tips 20-300 µL der Firma Eppendorf
Pipetten-Spitzen	Biosphere Filter Tips 100-1000 µL der Firma Sarstedt
Reagiergefäße	Reagiergefäß 1,5 ml der Firma Sarstedt

Tabelle 4: Material für Zellkulturexperiment

Verwendete Geräte	Hersteller/ Artikelnummer
Aquariumspumpe	Mini-Membran-Vakuumpumpe, VP 86
Bench	HeraSafe Thermo Electron Corporation
Blotting-Plattform	Fastblot Semi-Dry 014-200 biometra
Brutschrank	Heralcell® 150 Thermo Fisher Scientific
Eisschrank	Thermo Scientific Herafreeze BHFU400B, Temperatur - 80 °C
Eisschrank	Liebherr, Gefrierschrank GNP 3755 Premium NoFrost, Temperatur -20°C
Elektrophorese Guss Rahmen für 10 wells/ Kamm/ Halteapparat für Gele	Mini-PROTEAN Tetra Cell, 165-8001 Bio-Rad
Elektrophoreseapparatur	Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio-Rad
Inkubationsinaktivierungsbad	GFL 1008
Inkubator	Inkubator GFL 3032 der Firma Gesellschaft für Labortechnik mbH
Inkubator	HERA cell 150, Thermo Scientific
Kühlschrank	FKS 3600-1 der Firma Liebherr, 4 °C
Magnetrührer	IKAMAG RCT 519520 Polzin Laborbedarf
Mikroskop	Motic, AE31
Mikrozentrifuge	Micro centrifuge, Model 1 R, 220VAC, 6000 RPM, Roth
Molecular Imager	Molecular Imager, ChemiDoc XRS+
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences
Schüttler	Heidolph Reax 2010
Schwenker groß	WT 17, Biometra, analytic Jena
Schwenker klein	PMR-30, Grant-bio
Sicherheitswerkbank	HS 12, 1/PE AC, THERMO ELECTRON CORP.

Verwendete Geräte	Hersteller/ Artikelnummer
Spannungsquelle	Power Pack P25 T Biometra
Thermomixer	Thermoshaker TSC 20 x 2.0 ml, biometra
Tischzentrifuge	Rotilabo®-mini-centrifuge / T464.1 Roth
Vortexer	MS 1, Minishaker IKA und Vortex-Genie 2 / SI-0256
Waage bis 200g (geschlossen)	KERN AES
Waage bis 6kg (offen)	KERN GAB
Wasseranlage Ultra Clear UV plus TM	Evoqua Water Technologies GmbH
Zellzähler	Zählkammer, Neubauer, improved-bright-line, Marienfeld superior
Zentrifuge	Micro Star 17R, VWR
Zentrifuge	Micro centrifuge, Model 1 R, 220VAC, 6000 RPM, Firma Roth
Zentrifuge	Heraeus® Multifuge® Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge (groß)	Thermo ELECTRON CORP, Heraeus Multifuge 1S-R
Zentrifugen Rotor	TTH-400 Swinging Bucket Rotor / 75002000 Thermo Fisher
Verbrauchsmaterialien	Hersteller/ Artikelnummer
Deckgläschen 20 x 26 mm	ThermoFisher Scientific 2433-14385-02
Einmal-Handschuhe	Best Nitri Care
Falcon 15 mL; 50 mL	Sarstedt
Filter Papier	Whatman™ GE 1003-917
Filter Tips –Low Retention-	Biosphere 0,1- 2,5, 0,1-20, 2- 200, 1250 (extra-long) µL, Sarstedt
Pasteurpipetten ISO 7712	Assistent 40567002
Pipetten	Research Plus 0,5-10 µL, 100 µL und 1000 µL der Firma Eppendorf
Pipetten-Spitzen	Research Plus 300 µL Multichannel-Pipette Eppendorf, Q48827E
Reagiergefäß	0,5/ 1,5/ 2 mL Sarstedt

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/ Artikelnummer
Serologische Pipette	5/ 10/ 25 mL Sarstedt
THP-1 Zellen	DSMZ no.: ACC 16; Cell type: acute monocytic leukemia medium
Zellkulturflasche	T-75, 75 cm ² Sarstedt 83.3911.502
Zellkulturplatten	6-well ThermoFisher Scientific 140675
Zellschaber	mit 2-Positionen Klinge, 25cm, Sarstedt 83.1830
Chemikalien	Hersteller/ Artikelnummer
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, BCBF9538V
2-Propanol	Merk Millipore 1.09634.2500
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich A2504
APS	Roth 9592.3
Destilliertes Wasser	Reinstwasseranalyse Ultra Clear UV plus TM / 0814885-01, Winlab
Ethanol	≥ 99,8 %, 1 % MEK, Roth K928.4
Fetal bovine serum	Biochrom GmbH
Glycin	Roth 3908.2
Interleukin-6	IL-6 human, recombinant, expressed in E. coli, Prod.-Nr.: SRP3096, SIGMA-ALDRICH
Kaliumchlorid (KCl)	Merck 1.049.360.500
L-Glutamin	Biowest X0550-100
Lipopolysaccharide	LPS from Escherichia coli 055:B5, Prod.-Nr. L6529-1MG, SIGMA
Methanol 2,5 L	Roth 4627.2
Milchpulver	Roth T145.2
NaCl	Roth 9265.1
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich D6750
Nonidet-P40	Roche 11754599001

Chemikalien	Hersteller/ Artikelnummer
Penicillin/Streptomycin	Paa Laboratories P11-010
PhosStop	Roche 04906845001
PMA	Sigma-Aldrich P1585
RPMI 1640	Biowest L0501-500
Salzsäure (HCl)	Roth K025.1
SDS	Biomol 04051.1
TEMED	Roth 2367.3
Titriplex II (EDTA)	Merck 1.049.360.500
Tris base	Roth 4855.2
Tris HCl	Sigma-Aldrich T3253
Tumornekrosefaktor-alpha	TNF-alpha human, recombinant, Expressed in Yeast, Prod.- Nr. T 0157, SIGMA
Tween 20	Sigma-Aldrich P2287
Puffer und Lösungen	Hersteller/ Artikelnummer
4 x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad 1610747
Acrylamid-, Bisacrylamid- Stammlösung	Roth T802.1
BioRad Reagenz	Bio-Rad 5000006
DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco
Phosphatase Inhibitor	PhosStop, Roche, REF 04 906845001
Protease Inhibitor Cocktail	Prod.-Nr.: P8340, SIGMA-ALDRICH
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	ThermoFisher Scientific 46430
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Gibco, Thermo Fisher

Puffer, Lösungen und Medien aus eigener Herstellung	Konzentration/ Material
1 x SDS-PAGE-Laufpuffer	100 mL 10 x SDS dH ₂ O ad 1000 mL
1 x TBS/T-Puffer	100 mL 10 x TBS 1 mL Tween-20 dH ₂ O ad 1000 mL
10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	60,4 g Tris base 288 g Glycin 20 g SDS dH ₂ O ad 2000 mL
10 x TBS-Puffer	140 g NaCl 4 g KCl 60 g Tris Base mit Salzsäure auf pH = 7,4 einstellen dH ₂ O ad 2000 mL
Acrylamid 30 %	75 mL Acrylamid-, Bisacrylamid- Stammlösung 20 mL dH ₂ O
Blockierungspuffer	50 g Milchpulver 950 g dH ₂ O
Einfríermedium	6,8 mL RPMI 1650 Medium 70 µL L-Glutamin Stocklösung (2 mM) 70 µL P/S (1 %) 2 mL FCS 1 mL DMSO
Ladepuffer	90 µL Laemmli-Puffer (4x) 10 µL 2-Mercaptoethanol
Nährmedium	500 mL RPMI 1640 Medium 50 mL FCS 5 mL L-Glutamin Stocklösung (2 mM) 5 mL P/S (1 %)
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % SDS 0,5 % Na Deoxycholat 1 % Nonidet-P40
Transferpuffer A	36,34 g Tris Base 200 mL MeOH dH ₂ O ad 1000 mL
Transferpuffer B	3,03 g Tris Base 200 mL MeOH dH ₂ O ad 1000 mL

Puffer, Lösungen und Medien aus eigener Herstellung	Konzentration/ Material
Transferpuffer C	36,34 g Tris Base 200 mL MeOH 5 g Aminocaprinsäure dH2O ad 1000 mL
Tris HCl 0,658 M	7,57 g Tris HCL 70 mL dH2O mit 25 % Salzsäure auf pH = 6,8 einstellen dH2O ad 100 mL
Tris HCl 1,88 M	22,71 g Tris HCL 70 mL dH2O mit 25 % Salzsäure auf pH = 8,8 einstellen dH2O ad 100 mL
Antikörper, Farbstoffe, molekularbiologische Kits	Hersteller/ Artikelnummer
Antikörper Actin (I-19)	Santa Cruz Biotechnology sc-1616-R
Antikörper WNT5A/B (C27E8)	Cell Signaling Technology 2530 S
Anti-Rabbit HRP-linked Antikörper	Bio Labs 7074 S
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	ThermoFisher Scientific 34075
Trypan Blue Stain (0,4 %)	ThermoFisher Scientific 15250061
WesternSure® Pen	LI-COR 926-91000

III Ergebnisse

III.1 Charakterisierung der Studienkohorte

In der BFU-Kohorte wurde jedem der 133 Patienten eine Kontrollperson aus der FoCUS-Kohorte in Bezug auf Geschlecht, BMI und Alter passend zugeordnet. Diese Kontrollpersonen wiesen keine der untersuchten chronisch entzündlichen Erkrankungen auf. Die Validierung der Gesamtkohorte ergab in Bezug auf das Geschlecht 42 % männliche Patienten und 58 % weibliche Patienten, sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe. Bei Studienteilnehmern der Patientengruppe lag der Median des Geburtsjahrgangs bei 1963, bei den Kontrollen bei 1964. Der BMI lag in der Patientengruppe im Median bei 25 kg/m², bei der Kontrollgruppe bei 23 kg/m².

Bezogen auf die gematchten Einflussgrößen Geschlecht und Alter erreichten die Tests beim Vergleich der Patienten- und der Kontrollgruppe keine Signifikanz ($p > 0,05$). Der BMI war in der Patientenkohorte signifikant leicht erhöht ($p < 0,01$) (Tab. 5).

Tabelle 5: Validierung der Kontrollen und Patienten

	Kontrollen	Patienten	Anzahl	p-Wert
Geburtsjahr	1964 (1953-1980)	1963 (1953-1980)	n = 133	p = 1
BMI (kg/m ²)	23 (22-24)	25 (23-29)	n = 129	p < 0,01
Männer (%)	42	42	n = 133	p = 1

Validierung der Kontrollen und Patienten bezogen auf Geburtsjahr, BodyMassIndex (Gewicht [kg]/Größe [m²]) und Geschlecht. Bei 4 Patienten wurde keine klinische Angabe über den BMI erhoben. Mediane und Interquartilsabstand für Daten gerundet angegeben; p-Werte gerundet.

III.2 Wnt5a Serumlevel bei chronischer Entzündung

Bei 113 Patienten und den zugehörigen Kontrollen wurden per *Sandwich*-ELISA die wnt5a Serumkonzentrationen zum Ausgangszeitpunkt bestimmt und anschließend miteinander verglichen. Die übrigen 20 Patientenproben wiesen nicht ausreichend Blutserummaterial auf und konnten deshalb nicht bestimmt werden. Der Median der wnt5a-Werte lag sowohl in der Gruppe der Patienten (n = 113), als auch in der Gruppe der Kontrollen (n = 113) bei 0 (0-0) ng/mL. Nur bei n = 2 Teilnehmern in der Kontrollgruppe und n = 6 Patienten lagen die Werte im messbaren Bereich. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der wnt5a-Serumlevel zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,15$) (Abb. 9).

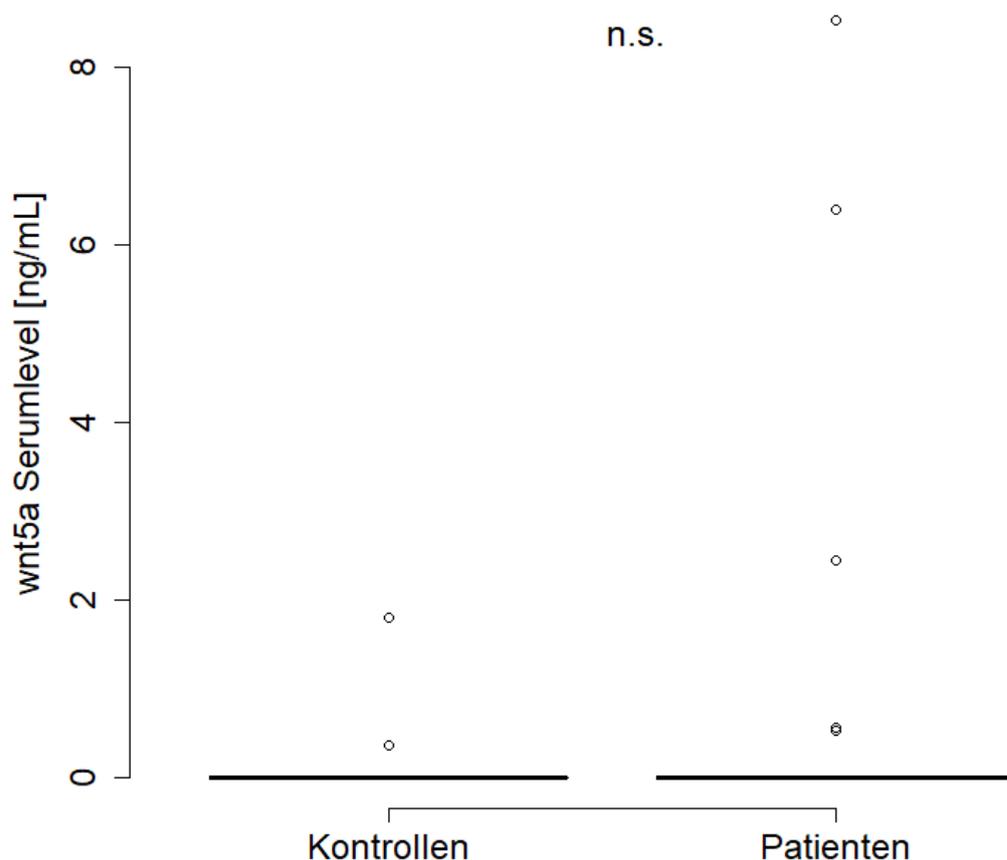


Abbildung 9: Box-Whisker-Plot der Wnt5a-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung und entsprechenden Kontrollen ($p = 0.15$); Die große Mehrheit der Messungen ergab wnt5a Serumlevel unterhalb der Nachweisgrenze. n.s. = nicht signifikant.

III.3 sFRP5 Serumlevel bei chronischer Entzündung

Die sFRP5-Serumlevel wurden bei $n = 52$ Patienten und den zugehörigen Kontrollen gemessen. Dabei lag der Median bei 13,09 (4,32-19,27) ng/mL in der Patientengruppe und bei 12,23 (8,73-17,82) ng/mL. Ein signifikanter Unterschied wurde nicht beobachtet ($p = 0,67$) (Abb. 10).

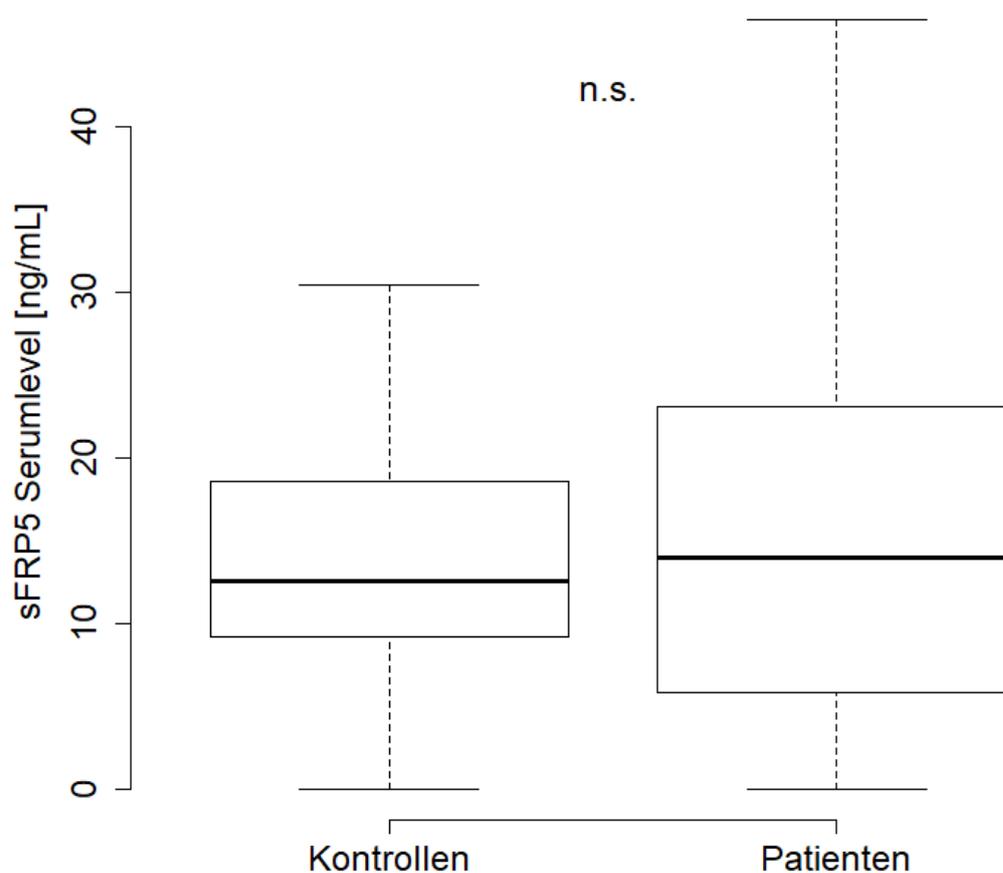


Abbildung 10: Box-Whisker-Plot der sFRP5-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung und entsprechenden Kontrollen ($p = 0,66$); Werte außerhalb der Whisker sind nicht abgebildet. n.s. = nicht signifikant.

III.4 Untersuchung der Patienten mit Anti-TNF α Therapie

III.4.1 Krankheitsdauer vor Anti-TNF α Therapie

Bevor die Patienten eine Anti-TNF α Therapie bekamen, waren sie in der Pso Gruppe bereits im Median 3 (1-5) Jahre erkrankt. In der RA Gruppe 4 (1-10) Jahre, in der CED Gruppe 1 (1-3) Jahre und in der SpA Gruppe 0,5 (0-5,5) Jahre (Tab. 6).

Tabelle 6: Krankheitsdauer vor Anti-TNF α Therapie

Erkrankung	Erkrankungsdauer (in Jahren)	n
Psoriasis	3 (1-5)	13
Rheumatoide Arthritis	4 (1-10)	29
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1 (1-3)	25
Spondylitis ankylosans	0,5 (0-5,5)	5

Median und Interquartilsabstände angegeben

III.4.2 Krankheitsaktivität unter Anti-TNF α Therapie

Bei den Aktivitätsindices wurde für RA (DAS 28) eine signifikante Veränderung der Krankheitsaktivität im Zeitverlauf festgestellt ($p = 0,011$, $n = 21$). Der Median sank von T0 mit 3,95 (2,85-4,74) auf T6 mit 2,94 (2,44-4,52) signifikant ab ($p = 0,006$, $n = 21$). Die Abnahme von T0 auf T26 mit einem Median von 3,23 (1,9-4,5) war ebenfalls signifikant ($p = 0,005$, $n = 21$) (Abb. 11).

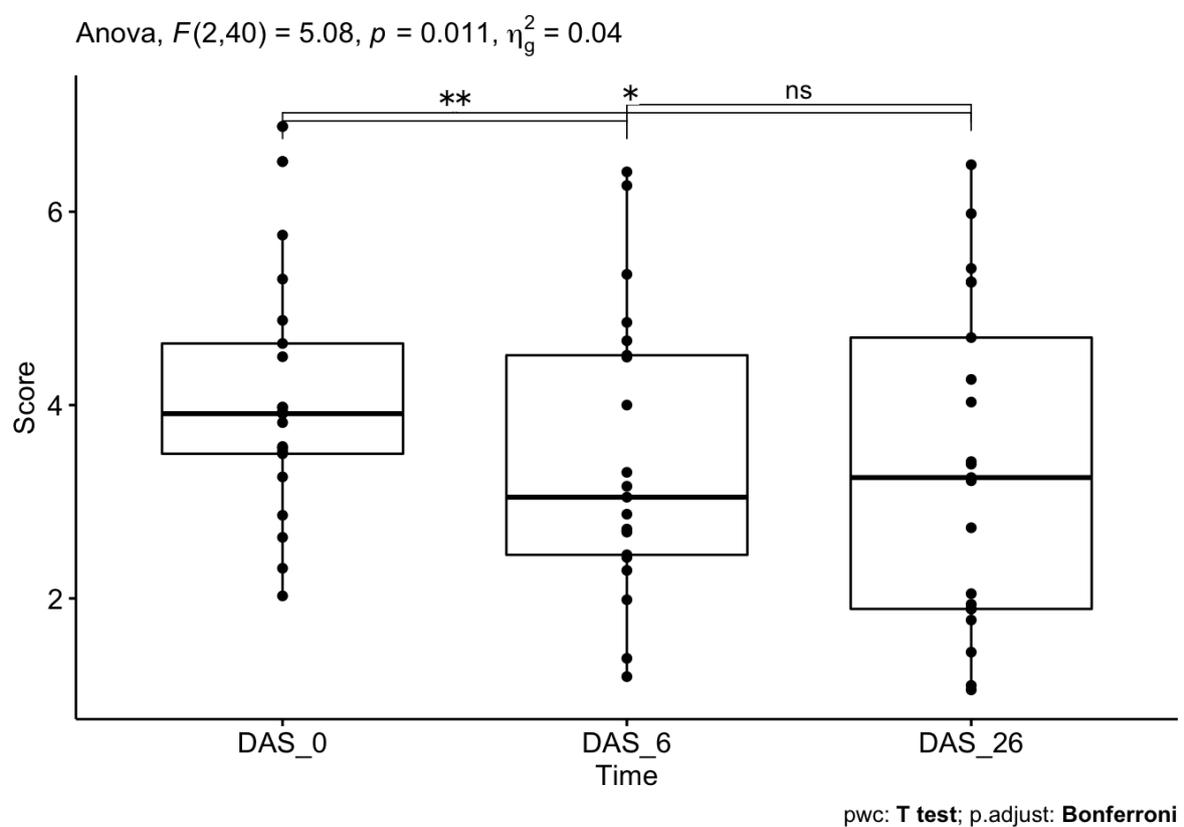


Abbildung 11: Box-Whisker-Plot der DAS 28 Werte von Patienten mit RA unter Anti-TNF α Therapie im Zeitverlauf. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant.

Für die Krankheitsaktivität bei SpA (BASDAI) konnte ebenfalls eine signifikante Abnahme der Krankheitsaktivität über den Zeitverlauf festgestellt werden ($p = 0,001$, $n = 13$). Von T0 zu T6 (Median 4,28 (3,32 - 5,65) vs. 2,43 (1,43 - 4,48), $p = 0,012$, $n = 13$) und von T0 zu T26 (Median 3,06 (1,15 - 4,35), $p = 0,016$, $n = 13$) nahm die Krankheitsaktivität signifikant ab (Abb. 12).

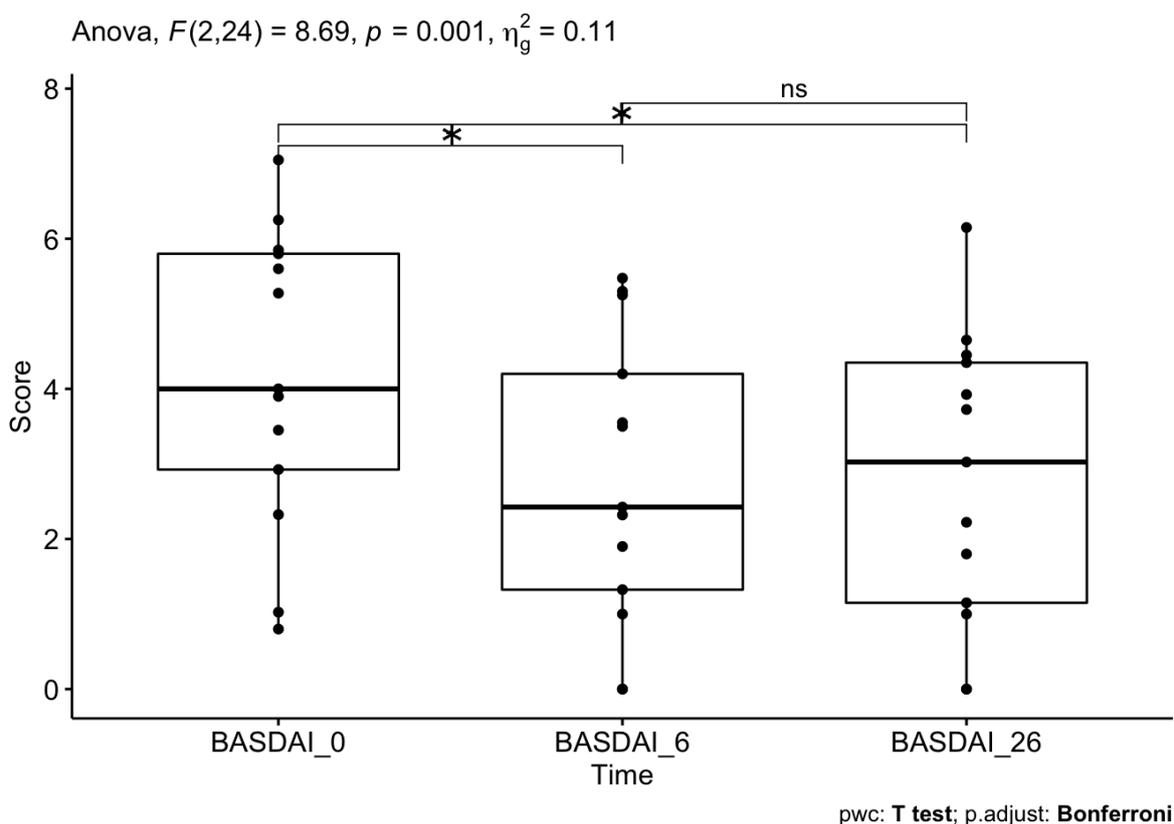


Abbildung 12: Box-Whisker-Plot der BASDAI Werte von Patienten mit SpA unter Anti-TNF α Therapie. * = $p < 0,05$. n.s. = nicht signifikant.

In der Gruppe CED war eine Abnahme des CAI und des CDAI über den Zeitverlauf zu verzeichnen, die aber nicht das Signifikanzniveau erreichte (Tab. 7). Für Pso konnte aufgrund der geringen Fallzahl mit Angaben zu den einzelnen Krankheitscoregruppen aus statistischen Gründen für DAS 28, PASI und BASDAI keine Berechnung erfolgen.

Tabelle 7: Krankheitsaktivitätsindices unter Anti-TNF α Therapie nach Krankheitsgruppen

PSO	T0	n	T6	n	T26	n	p-Wert	n
BASDAI	1,91 (1,23-3,31)	3	2,73 (2,56-2,89)	2	2,96 (2,18-3,74)	2	NA	1
PASI	8 (4,6-9,3)	5	4,8 (3,2-6,4)	3	4,8 (3,2-6,4)	3	NA	1
DAS 28	3,95 (3,33-4,57)	2	2,36 (1,73-3,17)	4	1,84 (1,37-2,17)	3	NA	2
RA	T0	n	T6	n	T26	n	p-Wert	n
DAS 28	3,95 (2,85-4,74)	27	2,94 (2,44-4,52)	24	3,23 (1,9-4,5)	26	0,011	21
CED	T0	n	T6	n	T26	n	p-Wert	n
CAI	5 (2,50-6,75)	10	3 (2-5)	9	3 (1-4)	9	0,38	7
CDAI	96 (48,5-210,5)	19	87 (56,5-143,5)	19	70 (39-123,25)	20	0,099	19
SpA	T0	n	T6	n	T26	n	p-Wert	n
BASDAI	4,28 (3,32-5,65)	16	2,43 (1,43-4,48)	15	3,06 (1,15-4,35)	17	0,001	13

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung erhoben wurden. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte der ANOVA für den Zeitverlauf (T0, T6, T26) gerundet.

III.4.3 wnt5a Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie

Von den n = 107 Patienten, welche eine Anti-TNF α Therapie bekamen, konnten bei n = 93 Patienten und den gematchten Kontrollen die wnt5a-Serumlevel bestimmt werden. Bei den meisten Probanden lagen die wnt5a Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, sodass der Median in beiden Gruppen bei 0 (0 - 0) ng/mL lag. Es zeigten sich weder zum Ausgangszeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollen (p = 0,4, n = 93), noch im Zeitverlauf unter Anti-TNF α Therapie (p = 0,84, n = 29) signifikante Unterschiede (Tab. 8).

Tabelle 8: wnt5a Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie

	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	93	69	57	93	93	29
wnt5a [ng/mL]	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	p = 0,40	p = 0,84

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet

III.4.4 sFRP5 Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie

Die Bestimmung der sFRP5-Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie zum Ausgangszeitpunkt wurde bei 43 Patienten mit jeweiligen gematchten Kontrollen durchgeführt. Der Median lag bei den Kontrollen bei 11,57 (8,83 - 17,57) ng/mL und bei den Patienten bei 11,59 (4,31 - 17,84) ng/mL. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht ($p = 0,57$). Die sFRP5 Serumlevel der Patienten variierten im Zeitverlauf signifikant ($p = 0,02$, $n = 21$). Von Zeitpunkt T0 zu T6 sanken die sFRP5-Serumlevel signifikant ab ($p = 0,006$, $n = 56$). Der Median zählte bei T0 11,59 (4,31 - 17,84) ng/mL und bei T6 8,03 (3,37 - 15,91) ng/mL. Von T6 zu T26 stiegen die sFRP5-Werte tendenziell wieder an, allerdings ohne Signifikanz ($p = 0,6$, $n = 31$). Der Median ergab 12,03 (3,71 - 20,53) ng/mL zum Zeitpunkt T26. Von T0 zu T26 zeigte sich keine Tendenz oder signifikante Veränderung ($p = 0,11$, $n = 37$) (Abb. 13 und Tab. 9).

Tabelle 9: sFRP5 Serumlevel bei Patienten mit Anti-TNF α Therapie

	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	43	64	53	43	43	21
sFRP5 [ng/mL]	11,59 (4,31-17,84)	8,03 (3,37-15,91)	12,03 (3,71-20,53)	11,57 (8,83-17,57)	p = 0,57	p = 0,02

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet.

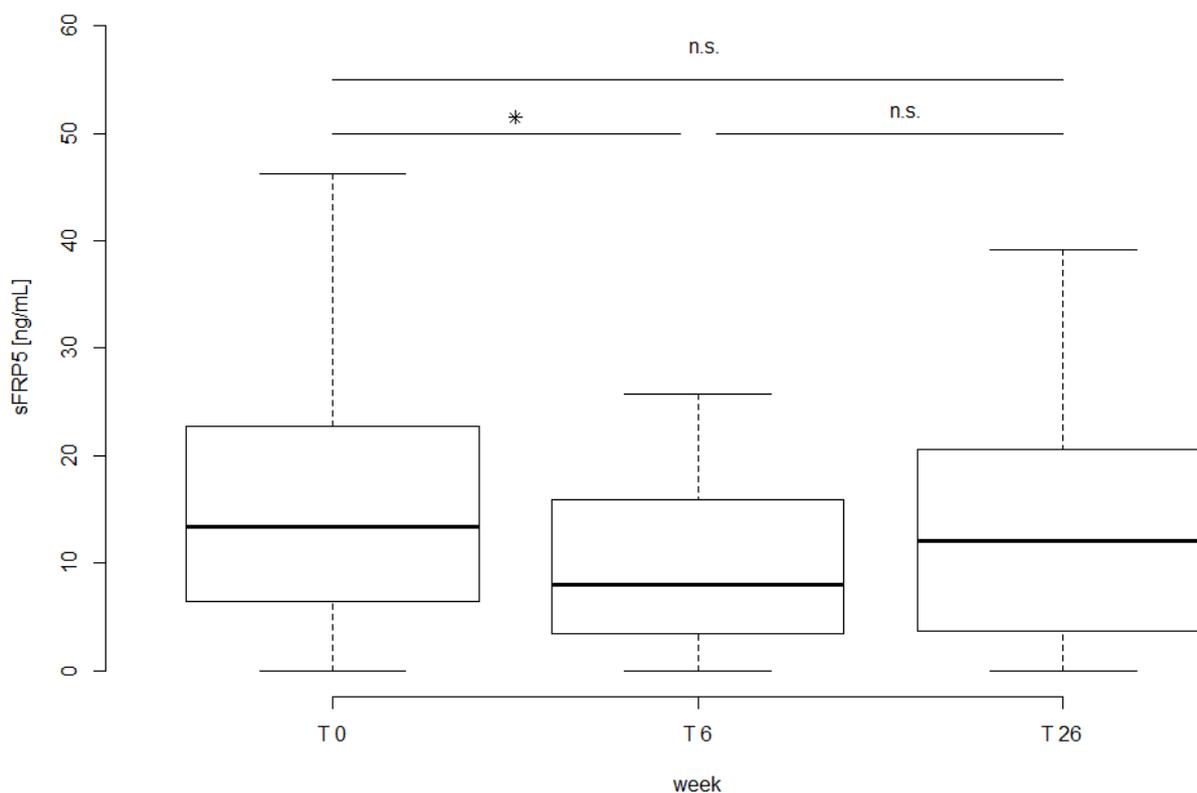


Abbildung 13: Box-Whisker-Plot der sFRP5-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung Pso, RA, CED oder SpA unter Anti-TNF α -Therapie im Zeitverlauf. Werte außerhalb der Whisker sind nicht abgebildet. * p < 0,05; n.s. = nicht signifikant.

III.4.5 CRP Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie

Die CRP-Werte waren in der Patientengruppe, welche eine Anti-TNF α Therapie bekam, zum Zeitpunkt T0 im Vergleich zu den gematchten Kontrollen nicht signifikant erhöht ($p = 0,19$; $n = 55$). Der Median zum Zeitpunkt T0 betrug 3,7 (1,05 - 12,25) mg/L, bei den Kontrollen 2 mg/L (1,30 - 3,50). Unter der Anti-TNF α Therapie sank der CRP-Wert signifikant von T0 auf T6 ab ($p < 0,0001$; $n = 67$). Der Median ergab bei T6 1,3 (0,9 - 4,2) mg/L, bei T26 2,3 (0,9 - 5,7) mg/L. Von T6 zu T26 gab es keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell stieg der CRP-Wert wieder leicht an. Im Vergleich von T0 zu T26 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der CRP-Werte (Abb. 14 und Tab. 10).

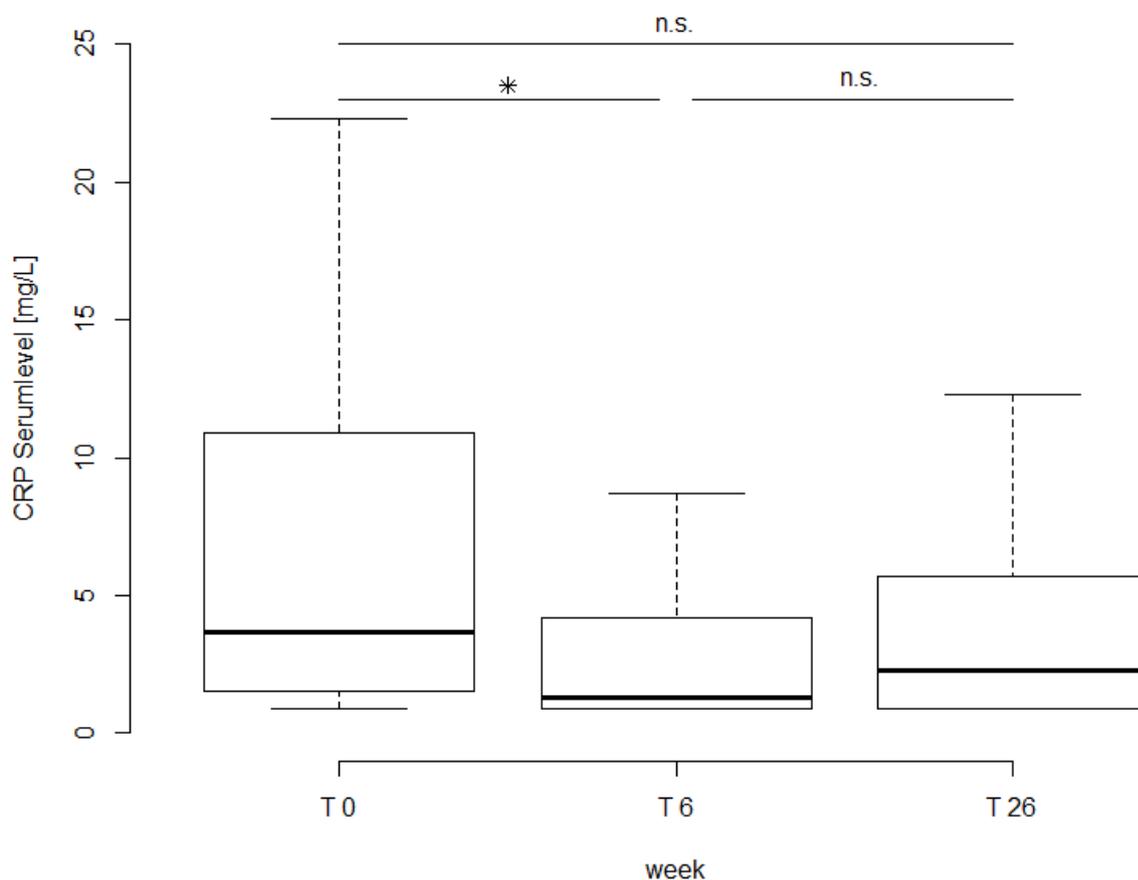


Abbildung 14: Box-Whisker-Plot der CRP-Serumlevel von Patienten mit chronisch entzündlicher Erkrankung Pso, RA, IBD oder SpA und Anti-TNF α -Therapie im Zeitverlauf. Werte außerhalb der Whisker sind nicht abgebildet. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 10: CRP Serumlevel bei Patienten mit Anti-TNF α Therapie

	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	55	69	55	55	55	28
CRP [mg/L]	3,7 (1,05-12,25)	1,3 (0,9-4,2)	2,3 (0,90-5,7)	2 (1,25- 3,45)	p = 0,19	p = 0,07

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet.

III.4.6 Patienten mit anderer Biologikatherapie

Die 26 Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, welche keine Anti-TNF α Therapie erhielten, bekamen andere Biologikatherapien (s. Kap. II.1.1.). Aufgrund der geringen Fallzahl ($n \leq 7$) der einzelnen Krankheits- oder Biologikauntergruppen, konnten keine belastbare statistische Analyse durchgeführt werden.

III.4.7 wnt5a und sFRP5 Serumlevel unter Anti-TNF α Therapie in einzelnen Krankheitsgruppen

III.4.7.1 Kein Effekt der Anti-TNF α Therapie auf die wnt5a Serumlevel bei Pso, RA, CED und SpA

In den jeweiligen Subgruppen Pso, RA und SpA, welche eine Anti-TNF α Therapie bekamen, zeigte sich weder im Vergleich zu den Kontrollen zum Ausgangszeitpunkt noch im Zeitverlauf ein signifikanter Effekt der Therapie auf die wnt5a Serumlevel, wobei wnt5a in den meisten Fällen nicht detektierbar war (Tab. 11).

Tabelle 11: wnt5a Serumlevel bei Patienten mit Pso, RA, CED und SpA mit Anti-TNF α Therapie

Pso	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	14	12	8	14	14	3
wnt5a [ng/mL]	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	p = 1	p = NA
RA	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	28	22	20	28	28	10
wnt5a [ng/mL]	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	p = 0,33	p = NA
CED	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	32	24	17	32	32	11
wnt5a [ng/mL]	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	p = 0,16	p = 0,84
SpA	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	17	10	7	17	17	5
wnt5a [ng/mL]	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	p = 0,35	p = NA

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet.

III.4.7.2 Kein Effekt der Anti-TNF α Therapie auf die sFRP5 Serumlevel bei Pso, RA und SpA

Bezogen auf die Krankheitssubgruppen Pso, RA und SpA, welche eine Anti-TNF α Therapie bekamen, ergaben sich in Bezug auf die sFRP5 Serumlevel weder im Vergleich zu den Kontrollen, noch im Zeitverlauf signifikante Unterschiede (Tab. 12).

Tabelle 12: sFRP5 Serumlevel bei Patienten mit Pso, RA, und SpA mit Anti-TNF α Therapie

Pso	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	6	12	8	6	6	3
sFRP5 [ng/mL]	5,09 (1,08-13,45)	4,01 (1,26-18,49)	11,5 (8,39-15,77)	8,78 (6,82-2,38)	p = 0,43	p = 0,37
RA	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	12	20	18	12	28	8
sFRP5 [ng/mL]	12,32 (4,65-16,80)	7,65 (4,36-23,35)	13,67 (8,90-20,03)	15,83 (10,91-19,65)	p = 0,41	p = 0,13
SpA	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	8	9	7	8	8	3
sFRP5 [ng/mL]	9,51 (4,37-19,27)	10,53 (3,55-15,61)	4,64 (2,06-15,71)	13,09 (7,85-25,97)	p = 0,65	p = 37

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet.

III.4.7.3 sFRP5 sinkt in der CED-Gruppe kurzzeitig ab

In der Gruppe der Patienten mit CED und Anti-TNF α Therapie wurde zum Zeitpunkt T0 kein signifikanter Unterschied des sFRP5 Serumlevels im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt ($p = 0,44$; $n = 16$). Allerdings zeigte sich eine signifikante Veränderung des sFRP5 Levels über den Zeitverlauf der Anti-TNF α Therapie ($p = 0,02$; $n = 7$). Von T0 zu T6 sank der sFRP5 Serumwert in dieser Gruppe signifikant ab ($p = 0,02$; $n = 19$). Der Median betrug bei T0 13,92 (4,75 - 19,33) ng/mL und bei T6 7,80 (2,81 - 10,80) ng/mL). Hingegen zeigte sich weder eine signifikante Veränderung vom Zeitpunkt T0 zu T26 ($p = 0,06$, $n = 12$), noch von T6 zu T26 ($p = 0,5$, $n = 9$). Der Median für T26 zählte 11,28 (3,52 - 21,25) ng/mL (Abb. 15 und Tab. 13).

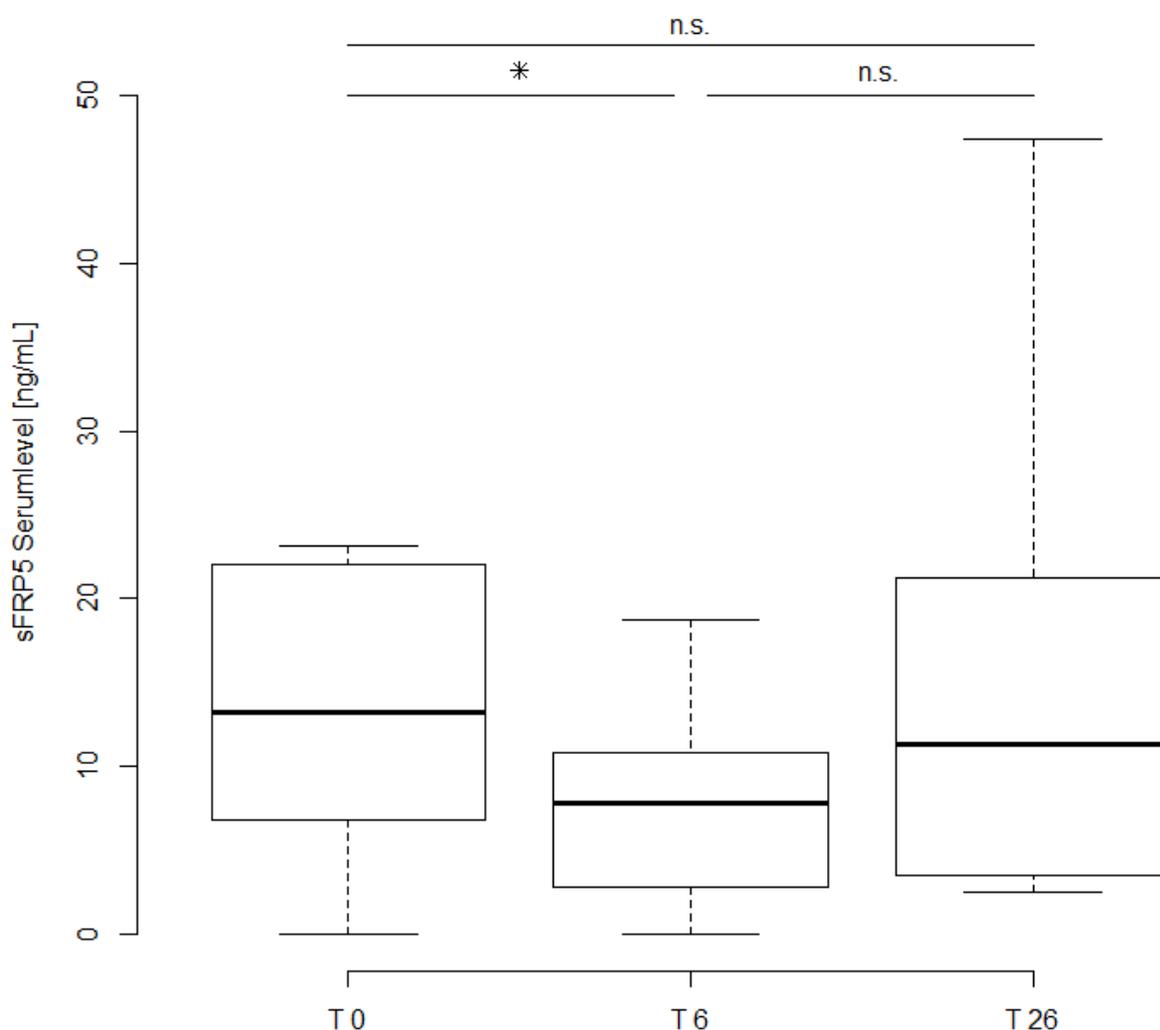


Abbildung 15: Box-Whisker-Plot der sFRP5-Serumlevel von Patienten mit CED unter Anti-TNF α -Therapie im Zeitverlauf. Werte außerhalb der Whisker sind nicht abgebildet. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 13: sFRP5 Serumlevel bei Patienten mit CED unter Anti-TNF α Therapie

CED	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	16	21	15	16	16	7
sFRP5 [ng/mL]	13,92 (4,75-19,33)	19,26 (2,81-10,80)	11,28 (3,52-21,25)	11,02 (7,44-12,58)	p = 0,44	p = 0,02

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet

III.4.7.4 CRP-Serumlevel sinkt bei CED Patienten von T0 auf T6

In der Subgruppe der Patienten mit CED sanken die CRP-Serumlevel signifikant von T0 auf T6 ab ($p = 0,015$, $n = 23$). Zum Zeitpunkt T0 betrug der Median 2,60 (1,05 - 7,55) ng/mL, zum Zeitpunkt T6 1,25 (0,9 - 4,7) ng/ mL. Die Veränderung der CRP-Werte von T0 zu T26 ($p = 0,62$; $n = 14$), sowie von T6 zu T26 ($p = 0,57$, $n = 12$), zeigten keine signifikante Veränderung. Ebenso ergab die verbundene statistische Analyse über alle drei Zeitpunkte keine signifikante Veränderung ($p = 0,13$; $n = 11$) (Abb. 16 und Tab. 14).

Tabelle 14: CRP Serumlevel bei Patienten mit CED unter Anti-TNF α Therapie

CED	T_0	T_6	T_26	Kontrollen	T_0 vs. Kontrollen	Zeitverlauf (T_0, T_6, T_26)
n	12	24	17	12	12	11
CRP [ng/mL]	2,60 (1,05-7,55)	1,25 (0,90-4,70)	2,30 (1,00-4,40)	2,25 (1,30-20,55)	p = 0,42	p = 0,13

Die Anzahl (n) gibt an, bei wie vielen Patienten die einzelnen Daten zum jeweiligen Zeitpunkt zur Berechnung verfügbar waren. Mediane und Interquartilsabstände für Daten angegeben und gerundet; p-Werte gerundet.

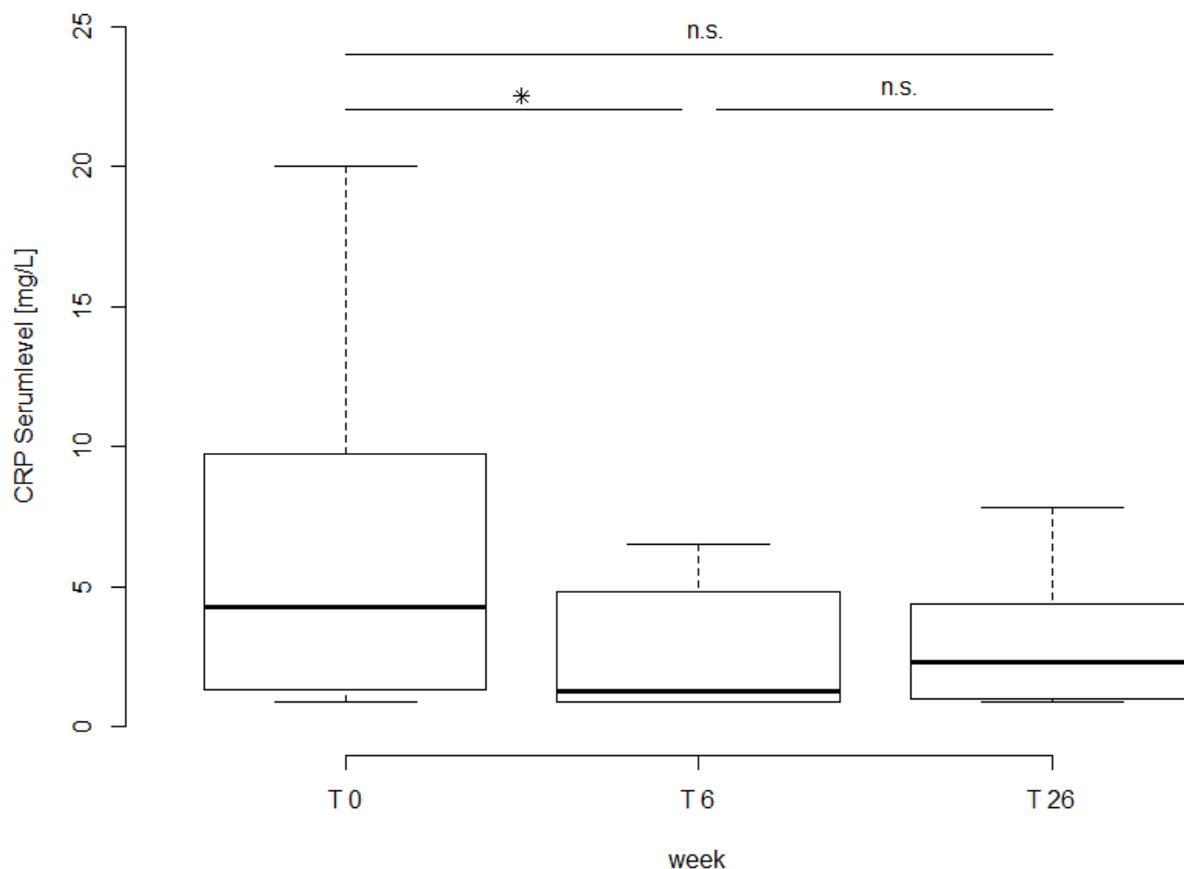


Abbildung 16: Box-Whisker-Plot der CRP-Serumlevel von Patienten mit CED unter Anti-TNF α Therapie im Zeitverlauf. Werte außerhalb der Whisker sind nicht abgebildet. * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

III.5 In vitro Wnt5a Expression nach proinflammatorischer Stimulation

In einem in vitro Zellkulturexperiment mit aus THP-1 Zellen generierten Makrophagen wurde untersucht, ob eine proinflammatorische Stimulation durch LPS, IL-6 oder TNF α Einfluss auf die Proteinexpression von wnt5a hat. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran geblottet (Western Blotting, Abb. 17 + 18). Mit Hilfe eines Peroxidasenachweises wurden die Proteinkonzentrationen von Wnt5a und dem Housekeeping gene Aktin bestimmt.

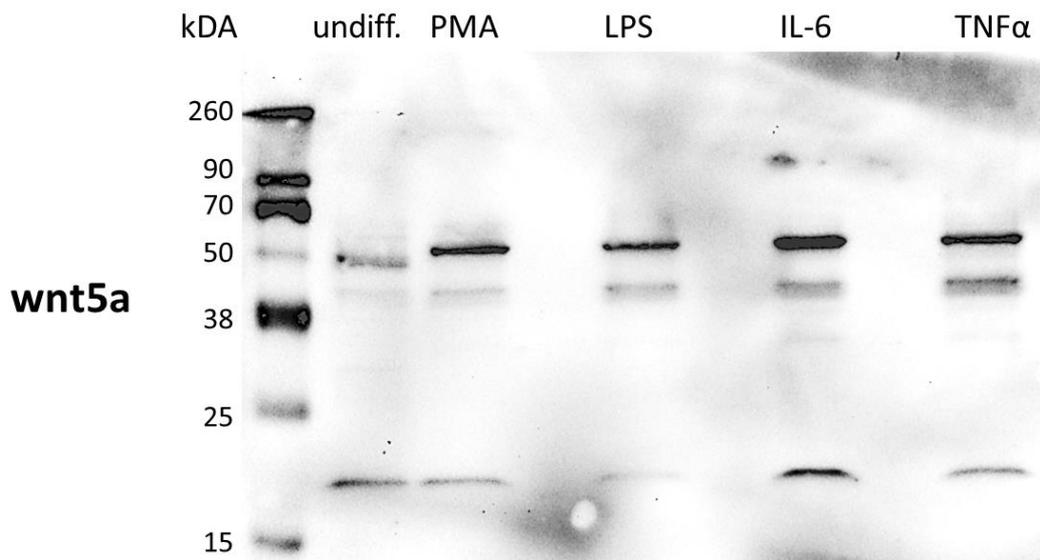


Abbildung 17: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; Versuch 8: wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

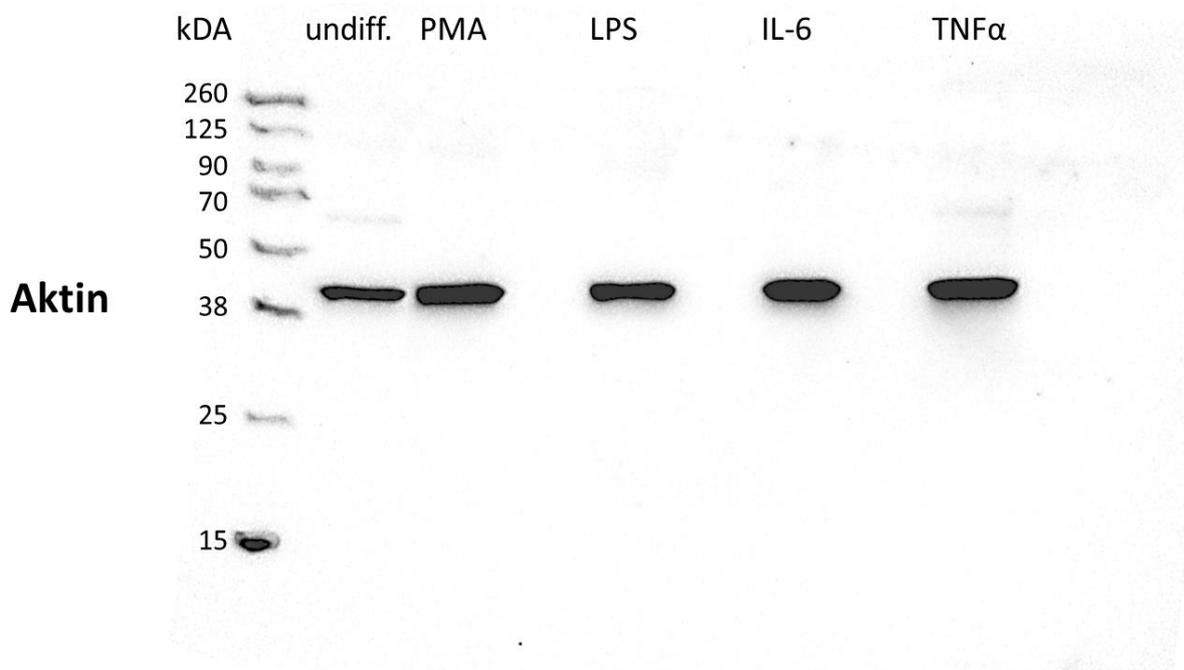


Abbildung 18: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Versuch 8: Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Zur Berechnung der unterschiedlichen wnt5a Expression wurde die Expression der mit PMA differenzierten Makrophagen als 100 % definiert und die anderen Messungen dazu in Relation gesetzt. Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der prozentualen wnt5a Expression von den undifferenzierten THP-1 Zellen (MW: $5 \pm 14,6$) zu den nicht zusätzlich stimulierten Makrophagen (MW: 100 ± 0 , $p < 0,001$). Ein Ausreißer wurde bei den Messungen der wnt5a Expression der undifferenzierten Zellen erkannt und aus der statistischen Berechnung ausgeschlossen. In Bezug auf die mit LPS stimulierten Makrophagen zeigte sich ein leichter Anstieg der Expression, der allerdings nicht signifikant war. Die prozentuale wnt5a Expression nach Stimulation mit IL-6 (MW: 189 ± 120 , $p = 0,05$) und TNF α (MW: 295 ± 280 , $p = 0,07$) war deutlich erhöht, erreichte aber ebenfalls nicht das Signifikanzniveau (Abb. 19).

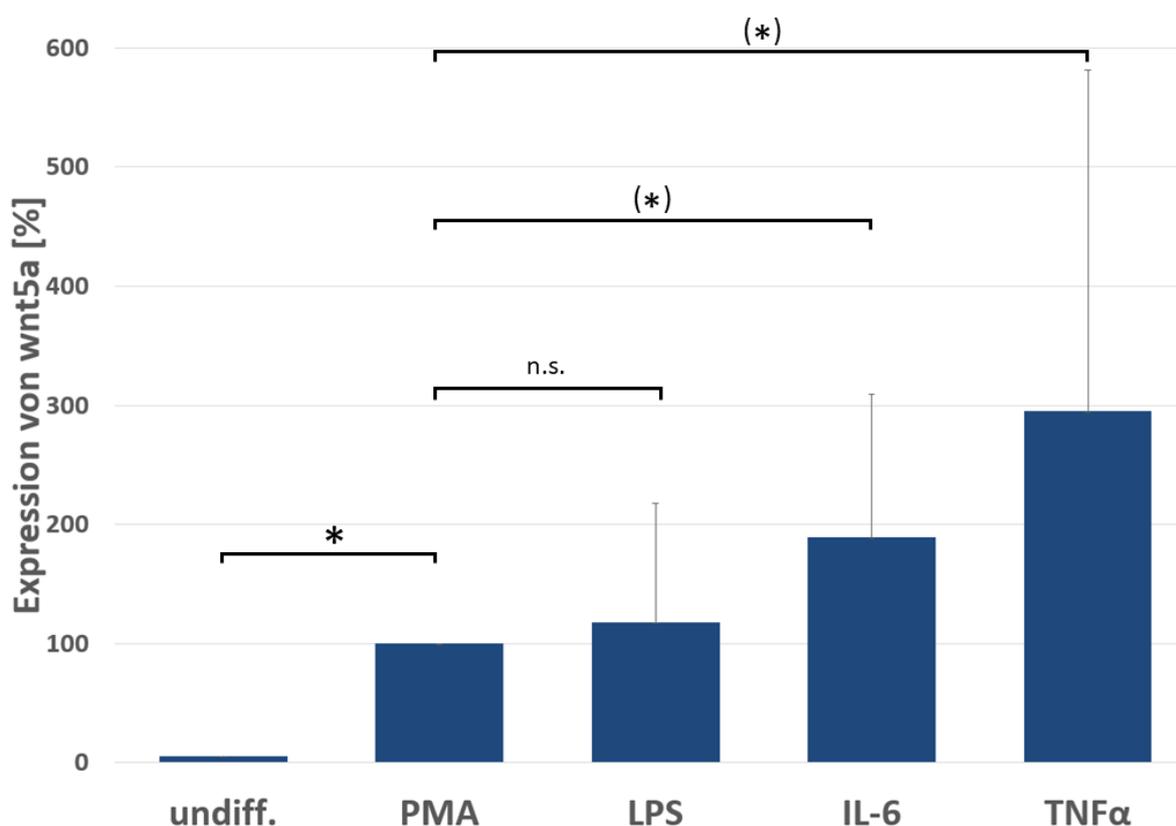


Abbildung 19: Säulendiagramm der wnt5a Proteinexpression in Prozent. undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte THP-1 Zellen. Mittelwerte mit oberer Standardabweichung angegeben. Werte außerhalb der Whisker sind nicht abgebildet. * = $p < 0,05$; (*) = $p \leq 0,07$; n.s. = nicht signifikant.

IV Diskussion

IV.1 Medikamentöse Therapie der chronischen Entzündung mit Biologika

Die systemische medikamentöse Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen basiert generell auf einem evidenzbasierten Stufenmodell. Dieses Konzept wird am Beispiel der Therapie für die Rheumatoide Arthritis deutlich (Abb. 20). Im akuten Schub werden Glucokortikoide (ggf. als intraartikuläre Injektion) verabreicht und bei Bedarf zur zusätzlichen Symptomlinderung NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) empfohlen. Da die Kombination von Glucokortikoiden und NSAR ein hohes Magenulcus-Risiko birgt, sollte zusätzlich ein PPI (Protonenpumpeninhibitor) verschrieben werden. Als langfristige Therapie kommen DMARD (Disease modifying anti-rheumatic drugs) zum Einsatz. Für die RA wird vor allem Methotrexat (MTX) eingesetzt. Diese DMARDs wirken über eine Immunsuppression entzündungshemmend. Bei Symptompersistenz erfolgt nach kritischer Indikationsprüfung eine Therapieeskalation auf eine Biologikatherapie mit beispielsweise TNFi.

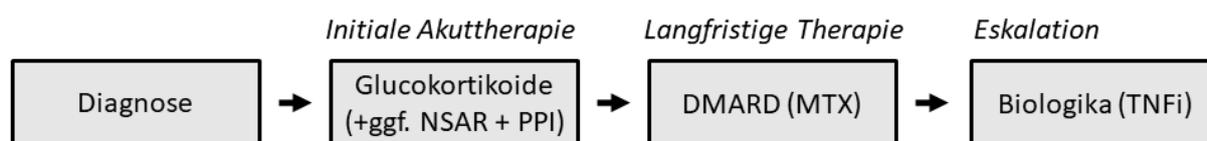


Abbildung 20: Vereinfachtes medikamentöses Therapieschema chronisch entzündlicher Erkrankungen am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis. Im akuten Schub werden Glucokortikoide verabreicht und bei Bedarf zur zusätzlichen Symptomlinderung mit NSAR kombiniert. Als langfristige Therapie kommen DMARD (Disease modifying anti-rheumatic drugs) wie beispielsweise Methotrexat (MTX) zum Einsatz. Bei Symptompersistenz kann eine Therapieeskalation mit TNFi (TNF α -Inhibitoren) erwogen werden. PPI = Protonenpumpeninhibitor.

Die Wirkung dieser Biologika konnte vielfach erwiesen werden (Hanauer et al. 2002; Niehues und Özgür 2019). Auch in dieser Studie wurde beobachtet, dass die Therapie mit Anti-TNF α Biologika Wirkung zeigte (Abb. 11/ 12/ 14 und Tab. 7). Allerdings geht die Therapie mit Biologika mit einem nicht unerheblichen Nebenwirkungsprofil einher. Allgemeine Nebenwirkungen sind grippeähnliche Beschwerden, Veränderungen des Blutbildes (z.B. Leukozytose oder Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie), allergische Reaktionen und eine Erhöhung der Leberenzyme (GPT, GOT und AP). Eine spezielle Nebenwirkung stellen schwere Infektionen inklusive der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose dar (Davis et al. 2020). Zusätzlich stellen Biologika keine kausale, sondern lediglich eine krankheitsmindernde Therapieoption dar. Je nach Krankheit weisen teilweise nur 60 % der Patienten ein

ausreichendes Therapieansprechen auf (Keystone et al. 2004). Deshalb sollte die Suche nach neuen, nebenwirkungsärmeren und kausalen Therapieoptionen als Ergänzung der bisherigen Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen angestrebt werden. Grundlage dieses Bestrebens ist ein besseres Verständnis der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Erkrankungen insbesondere in Bezug auf die Identifikation von Schlüssel-Signalproteinen und deren Nachweis im zirkulierenden Blut.

IV.2 Wnt5a und sFRP5 in Psoriasis

Bisher wurden nur in einer Studie die zirkulierenden wnt5a/sFRP5 Blutserumlevel bei Psoriasispatienten gemessen. Gerdes et al. zeigten, dass die wnt5a Serumlevel in Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht waren (Gerdes et al. 2014). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Diese Diskrepanz könnte der abweichenden Kohortenzusammensetzung in den Studien geschuldet sein. Andererseits könnten die divergierenden Ergebnisse dadurch erklärt werden, dass die Patienten in dieser Studie im Gegensatz zu Gerdes et al. alle eine DMARD Therapie bekamen. Die DMARD Basistherapie könnte bereits zu einem Absinken der wnt5a-Serumspiegel geführt haben. Diese Hypothese sollte in weiteren Studien mitberücksichtigt werden.

Gerdes et al. zeigten weiter, dass die sFRP5 Serumlevel bei übergewichtigen Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu übergewichtigen Kontrollen signifikant erhöht waren und schlussfolgerten, dass sFRP5 als protektiver Faktor als Reaktion auf die erhöhten wnt5a Level ausgeschüttet werden könnte. In der vorliegenden Studie waren die Patienten nicht übergewichtig, was die unveränderten sFRP5 Level zum Teil erklären könnte.

In Hautbiopsien konnte bei Psoriasispatienten eine Erhöhung von wnt5a und eine Erniedrigung der sFRP5 Expression nachgewiesen werden, was auf eine auto- und parakrine Wirkung des wnt5a und sFRP5 Systems im regionalen Gewebe hinweist (Gudjonsson et al. 2010). Im Zusammenhang mit den in der vorliegenden Studie kaum nachweisbaren wnt5a Serumspiegeln weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass wnt5a vor allem regional parakrin und autokrin und kaum endokrin wirkt. Zwar konnte unter Therapie mit TNFi keine Veränderung der wnt5a und sFRP5 Serumlevel festgestellt werden, trotzdem könnten die TNFi die lokalen wnt5a und sFRP5 Level beeinflusst haben. Dafür spricht, dass in einem ex vivo Zellkulturexperiment mit Keratinozyten die mRNA Expression von wnt5a unter anderem durch

TNF α signifikant erhöht wurde (Gudjonsson et al. 2010). Gegen diese Hypothese spricht, das Forschungsergebnis einer anderen Studie, welche trotz erfolgreicher Therapie mit TNFi eine verstärkte wnt5a-Genexpression in Biopsien von vollständig abgeheilten Psoriasis-hautläsionen feststellen konnte. Die Autoren vermuten, dass wnt5a eines der Zytokine sein könnte, welches eine unterschwellige Entzündung im lokalen Gewebe im Sinne einer Parainflammation aufrechterhält (Medzhitov 2008; Suárez-Fariñas et al. 2011). Um die systemische und lokale Bedeutung von wnt5a in Relation setzen zu können, sollte in zukünftigen Studien gleichzeitig eine Messung der Serum wnt5a Level und der lokalen wnt5a Expression in Gewebebiopsien erfolgen.

In dieser Studie konnten keine erhöhten wnt5a Serumlevel bei Psoriasispatienten festgestellt werden. Dieses Ergebnis stellt die Hypothese, dass wnt5a an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt ist, in Frage. Zhu et al. zeigten, dass transgene Mäuse mit einer wnt5a Überexpression keine Psoriasis entwickelten (Zhu et al. 2014). Diese Beobachtung spricht ebenfalls gegen eine prominente Rolle von wnt5a in der Pathogenese der Psoriasis. Allerdings könnte die alleinige wnt5a Überexpression im Mausmodell ohne eine gleichzeitig verstärkte Rezeptorexpression ohne relevanten Effekt bleiben und die Bedeutung von wnt5a im natürlichen Kontext verschleiern. Daher sollte in Folgestudien nicht nur die wnt5a Expression, sondern auch die der wnt5a-Rezeptoren in Zusammenschau studiert werden.

Die wnt5a Genexpression durch proinflammatorische Zytokine in Keratinozyten war nur halb so stark, wie die in Gewebeproben, welche verschiedene Zelltypen enthielten. Deshalb bleibt zu klären, welche weiteren Zelltypen für die wnt5a Expression in Psoriasisläsionen verantwortlich sind (Gudjonsson et al. 2010). Die in dieser Arbeit gezeigte wnt5a Expression durch zu Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen lässt darauf schließen, dass neben Keratinozyten auch Hautmakrophagen wnt5a exprimieren können.

Sollte sich der Verdacht, dass wnt5a ein pathogenetisch relevanter Faktor in Psoriasis ist, verhärtet, könnte Dickkopf-1 (DKK-1) neben sFRP5 ein vielversprechender Inhibitor des wnt-Signalweges sein. Es konnte gezeigt werden, dass die DKK-1 Expression in läsionsfreier Haut von Psoriasispatienten erhöht war im Vergleich zu Psoriasis-hautläsionen der selben Patienten und im Vergleich zu Hautproben gesunder Probanden (Seifert et al. 2015). DKK-1 könnte die lokale Entzündungsreaktion in Psoriasis vermindern und somit die Ausbildung der

Hautläsionen verhindern. Weitere Studien zur Rolle von DKK-1 und der Interaktion von wnt5a und DKK-1 sollten folgen.

IV.3 Wnt5a und sFRP5 in Rheumatoider Arthritis

In ex vivo durchgeführten Forschungen konnte festgestellt werden, dass die wnt5a Expression in *Fibroblast-like Synoviozytes* (FLS) und synovialen Gewebeproben von RA Patienten erhöht und die sFRP5 Expression erniedrigt ist (Kim et al. 2010; Kwon et al. 2014). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie auf systemischer Ebene in vivo in Form von veränderten wnt5a/sFRP5 Blutserumspiegeln nicht reproduziert werden. Rauner et al. publizierten, dass eine Stimulation mit TNF α die wnt5a mRNA Expression in synovialen Zellen von RA Patienten erhöht und transgene TNF α -überproduzierende Mäuse im synovialen Gewebe ebenfalls eine verstärkte wnt5a Expression aufwiesen (Rauner et al. 2012). Dieser lokale Effekt konnte auf systemischer Ebene in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, da die wnt5a Serumlevel trotz aktiver RA im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht waren und meist sogar unter der Nachweisgrenze blieben. Auch unter Therapie mit TNFi zeigte sich in Bezug auf die Blutserumlevel keine Veränderung der wnt5a Serumspiegel. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die auto- und parakrine wnt5a Expression im Vergleich zur endokrinen im Vordergrund steht. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass wnt5a über IL-6 induziert zu einer Aktivierung des kanonischen Signalweges und schließlich einer autokrinen Proliferation von humanen synovialen Fibroblasten in RA führt (Katoh und Katoh 2007). Gewebsmakrophagen könnten wie in dieser Arbeit gezeigt ebenfalls über IL-6 zu einer wnt5a Ausschüttung beitragen und parakrin die Proliferation von synovialen Fibroblasten nochmals verstärken (Abb. 19). Für synoviale Fibroblasten, welche mit einem wnt5a Expressionsvektor transfektiert wurden, konnte gezeigt werden, dass wnt5a unter anderem die IL-6 mRNA Expression induziert (Sen et al. 2000). In Zusammenschau mit der oben genannten Induktion von wnt5a durch IL-6, weißt diese Beobachtung auf einen positiven Feedbackloop zwischen wnt5a und IL-6 hin.

In nicht wenigen Patienten bleibt die RA trotz Therapie aktiv. Dieses Phänomen wird auf die Aktivierung von FLS in der Pathogenese der RA zurückgeführt (Sen 2005). Bei langjährigen RA Patienten scheint sich die Inflammation auf lokaler Ebene über unreife FLS auto- und parakrin verselbstständigt zu haben. Die Aufrechterhaltung der Entzündung läuft somit unabhängig

von externen inflammatorischen Zellen und Zytokinen ab (Sen 2005). Um der Entstehung dieser unreifen FLS vorzubeugen ist ein früher Therapiestart entscheidend (Sen et al. 2000). In vitro konnte gezeigt werden, dass ein Fz-5 Antikörper die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-15 in FLS senkte (Sen und Carson 2002). Wnt5a könnte folglich als Fz-5 Agonist zum lokalen aktivierten Status der FLS beitragen (Sen et al. 2001). Daher sollte sFRP5 als wnt5a Antagonist als mögliche (lokale) Therapieoption bei refraktärer Synovitis weiter untersucht werden.

Eine Therapie mit TNFi vermindert die synoviale Entzündung in RA. Allerdings führt diese Therapie nicht zu einer adäquaten Knochenreparatur (Okuma-Yoshioka et al. 2008). Für die Knochendestruktion durch gesteigerte Knochenresorption sind Osteoklasten maßgeblich verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass wnt5a in Osteoklastenvorläuferzellen über den ROR2 Rezeptor die Osteoklastogenese fördert (Maeda et al. 2012). Deshalb könnte wnt5a einer der Mediatoren sein, welcher für die Knochendestruktion in RA verantwortlich ist und den Knochenaufbau trotz Anti-TNF α Therapie verhindern könnte. Im Gegensatz dazu präsentierten Sonomoto et al. eine Studie, bei der die wnt5a/ROR2 vermittelte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten eine Knochenaufbaufördernde Wirkung des Ligand/Rezeptor Duos nahelegt. Somit scheint Wnt5a sowohl im Knochenaufbau, als auch in der Knochendestruktion involviert zu sein (Sonomoto et al. 2012). Die genaue Funktion von wnt5a im Knochenstoffwechsel bleibt jedoch insbesondere bei RA weiterhin ungeklärt. Der wnt-Antagonist DKK-1 ist in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren in den Fokus gerückt. Es konnte nachgewiesen werden, dass DKK-1 eine wichtige Rolle im Gleichgewicht von Osteoklasten zu Osteoblasten spielt (Shi et al. 2016). Zusätzlich wurde gezeigt, dass DKK-1 unter proinflammatorischen Stimuli ex vivo von FLS ausgeschüttet wurde (Kim et al. 2010). Wang et al. konnten zeigen, dass DKK-1 mit Knochenerosion und Entzündungsaktivität in RA korrelierte. Unter einer Therapie mit TNFi sanken kohärent dazu die DKK-1 Serumspiegel signifikant ab (Wang et al. 2011). Ob sich DKK-1 als Biomarker für Krankheitsaktivität und Knochenerosion bei RA etablieren oder sich in Zukunft für das Monitoring des Therapieansprechens einer Anti-TNF α Therapie eignen könnte, muss in weiteren Studien geprüft werden.

IV.4 Wnt5a und sFRP5 in Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Im Mausmodell gelang es über ein wnt5a Gen-Knockout, eine DSS-induzierte Colitis zu vermindern (Sato et al. 2015). Im Unterschied dazu konnte in Biopsien von Patienten mit CU keine veränderte wnt5a Genexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden (You et al. 2008). Passend dazu zeigten die in dieser Arbeit erstmalig bestimmten systemischen Blutserumlevel von wnt5a keinen Unterschied zwischen CED Patienten und der Kontrollgruppe, wobei auch hier die meisten Werte unterhalb des Detektionsniveaus gefunden wurden. Eine Translation der im Mausmodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen scheint für wnt5a daher nicht direkt möglich zu sein. Die Beobachtung, dass viele im Mausmodell gewonnene Erkenntnisse sich nicht auf den Menschen übertragen lassen, ist keine Seltenheit und lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass Mausmodelle die menschliche Pathophysiologie nur bedingt widerspiegeln. Testmäuse sind z.B. häufig jung, haben keine anderen Erkrankungen und sind anderen Umweltfaktoren ausgesetzt (Hackam 2007).

Das zeitweilige signifikante Absinken der sFRP5-Serumkonzentration unter Anti-TNF α Therapie bei CED lässt auf eine komplexe Interaktion zwischen TNF α und sFRP5 schließen (Abb. 15). TNF α könnte einen stimulierenden Einfluss auf sFRP5 haben, welcher durch die Anti-TNF α Therapie kurzfristig antagonisiert wird. Langfristig wurde nach 26 Wochen eine Angleichung der sFRP5 Serumlevel auf das Ursprungsniveau detektiert (Abb. 15). Diese Angleichung trotz weiterbestehender Therapie könnte als Hinweis für die Existenz eines metabolischen Gedächtnisses betrachtet werden (Cahill 1980; Testa et al. 2017; Bheda 2020). Dieses metabolische Gedächtnis könnte eine Parainflammation befördern. Diese Parainflammation wird im Gegensatz zur klassischen Entzündungsreaktion nicht durch extrinsische Stimuli befördert, sondern durch intrinsische Reize (z.B. DNA-Schäden) (Bondar und Medzhitov 2013). Sie beschreibt ein Stadium zwischen Homöostase und einer klassischen Entzündungsreaktion (Medzhitov 2008). Ob die Ausbildung eines solchen metabolischen Gedächtnisses und einer Parainflammation durch eine frühzeitige Therapie verhindert werden können, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Außerdem sollte die Interaktion zwischen sFRP5 und TNF α weiter beleuchtet werden.

Dendritische Zellen und Makrophagen sind von zentraler Bedeutung für die mukosale Immuntoleranz und die Unterdrückung der intestinalen Entzündung (Rescigno und Di

Sabatino 2009). In CED verlieren diese Zellen ihre toleranten Eigenschaften, was zu einer unkontrollierten Entzündung führt. Manicassamy et al. zeigten, dass der durch wnt-Liganden aktivierte β -Catenin Signalweg für die Immuntoleranz durch intestinale dendritische Zellen und Makrophagen entscheidend ist (Manicassamy et al. 2010). In dieser Arbeit wurde in vitro eine tendenzielle Erhöhung der wnt5a Expression von Makrophagen unter pro-inflammatorischen Stimuli beobachtet. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass wnt5a unter inflammatorischen Bedingungen autokrin die Immuntoleranz vermindert, indem es den β -Catenin abhängigen Signalweg über eine Bindung an ROR2 blockiert (diese Signalvermittlung über wnt5a wurde in HEK293 Zellen beobachtet: vgl. Mikels A. J. und Nusse 2006). Zukünftige Untersuchungen sollten die wnt5a Signalgebung im Zusammenhang mit dem Rezeptorkontext in Hinblick auf die Immuntoleranz in Makrophagen untersuchen.

IV.5 Wnt5a und sFRP5 in Spondylitis Ankylosans

Bougault et al. beobachteten, dass die wnt5a Blutserumlevel von Patienten mit SpA kaum messbar waren. Dieses Ergebnis wurde in dieser Arbeit bestätigt (Tab. 11). Darüber hinaus konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch die sFRP5 Serumlevel im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht verändert waren (Tab. 12). Die Studie von Bougault et al. zeigte weiter, dass die regionale wnt5a-Konzentration in der Synovialflüssigkeit mehr als 10-fach erhöht war im Vergleich zum Blutserum und signifikant höher war, als die wnt5a Konzentration in der Synovialflüssigkeit von Arthrosepatienten (Bougault et al. 2015). In Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich daraus die Hypothese ableiten, dass wnt5a in den Gelenken von SpA Patienten eher lokal als systemisch ausgeschüttet wird. Wnt5a und sFRP5 qualifizieren sich deshalb nicht als serologische Biomarker zur Diagnostik oder zum Therapiemonitoring bei SpA.

Es stellt sich die Frage, welche Zellen für die lokale wnt5a Expression in SpA verantwortlich sind. In Mauschondrozyten, -sehnenzellen und -osteoblasten konnte eine erhöhte (bis 1000-fache) wnt5a mRNA Expression im Vergleich zu Makrophagen festgestellt werden (Bougault et al. 2015). Gemeinsam mit der in der vorliegenden Studie nur tendenziell erhöhten wnt5a Expression durch Makrophagen, lenken diese Beobachtungen den Fokus der lokalen wnt5a Expression auf Chondrozyten, Sehnenzellen und Osteoblasten. Die verstärkte Expression von ROR2 (bis fast 10000-fach) im Vergleich zu Makrophagen, deutet darauf hin, dass

Chondrozyten, Sehnenzellen und Osteoblasten selbst für wnt5a (autokrin) empfänglich sind (Bougault et al. 2015). Konsistent dazu wurde in einem in vitro Zellkulturexperiment mit humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) beschrieben, dass eine Inhibition von wnt5a mit wnt5a Antikörpern zu einer geringeren Mineralisierung durch Osteoblasten führte. Wnt5a könnte somit im Umkehrschluss durch verstärkte Mineralisierung an der Entstehung von Syndesmophyten in SpA beteiligt sein (Briolay et al. 2013).

Auch sFRP5 spielt eine Rolle im Knochenstoffwechsel. So konnte gezeigt werden, dass die Knochenmarkslevel von sFRP5 mit der Knochendichte und Knochenumbau markern korrelieren (Chen H et al. 2017). Dass systemisch in der vorliegenden Studie keine veränderten sFRP5 Blutserumlevel festgestellt wurden, ist ein Hinweis darauf, dass sFRP5 ebenfalls eher auto- und parakrin als endokrin agiert. Es könnte den Knochenumbau inhibieren und somit auch in SpA-Gelenken lokal verändert sein. Daher sollten in zukünftigen Studien die lokalen sFRP5 Spiegel in der Synovialflüssigkeit ebenfalls untersucht werden.

TNFi haben die Therapie der SpA verbessert. Dieser therapeutische Effekt konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden (Abb. 12). Auch auf struktureller Ebene zeigt die Therapie mit TNFi Wirkung. So konnte bei SpA Patienten, die eine Langzeittherapie mit TNFi bekamen, eine Erhöhung der Knochendichte im Vergleich zu Patienten ohne Anti-TNF α Therapie festgestellt werden (Durnez et al. 2013). TNF α stimuliert neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften die Osteoklastogenese (Osta et al. 2014). Diese Eigenschaft wird durch die Therapie mit TNFi verhindert. Allerdings scheint eine Therapie mit TNFi die Veränderungen im Knochenstoffwechsel nur eingeschränkt zu verhindern. Hu et al. wiesen nach, dass eine antientzündliche Therapie mit dem TNFi Adalimumab bei SpA hocheffektiv war, die Entzündung zu reduzieren. Gleichzeitig war die Auflösung der Entzündung jedoch mit strukturellen Knochenveränderungen im Sinne der Formierung von Fettablagerungen in der lumbalen Wirbelsäule verbunden. Ein Ungleichgewicht im Knochenmetabolismus bleibt somit vorhanden. Die molekulare Grundlage für dieses Ungleichgewicht könnte auf eine Störung der Wnt-Signalwege zurückzuführen sein. So konnte in der vorliegenden Studie zwar keine Veränderung der systemischen wnt5a und sFRP5 Serumlevel nachgewiesen werden, jedoch beobachteten Hu et al. ein Absinken der Serumlevel des Wnt-Inhibitors DKK-1 unter Anti-TNF α Therapie (Hu et al. 2012). Passend dazu konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die DKK-1-Serumkonzentration mit dem

Vorliegen akuter Entzündungszeichen in MRT-Untersuchungen in den Knochen von SpA Patienten positiv korrelieren und die DKK-1 Serumkonzentrationen unter einer Therapie mit TNFi ebenfalls signifikant sanken (Zhao et al. 2019). Dies deutet darauf hin, dass die Wnt-Signalwege eine molekulare Verbindung der bisher ungeklärten Verknüpfung zwischen Inflammation und Knochenmetabolismus in SpA darstellt (Magrey und Khan 2017). In einer anderen Studie wurde im Gegensatz dazu beobachtet, dass die DKK-1 Serumlevel in Patienten mit SpA niedriger waren, als bei gesunden Kontrollen und durch eine Anti-TNF α Therapie nicht beeinflusst wurden (Kwon et al. 2012). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass die DKK-1 Level von der Krankheitsdauer abhängen und bei längerer Krankheitsdauer absinken (Rubio Vargas et al. 2017). Die genauen pathophysiologischen Wechselwirkungen zwischen einer Anti-TNF α Therapie und wnt5a, sFRP5 und DKK-1 auf den Knochenstoffwechsel bleiben unklar und sollten in weiteren Studien erforscht werden. Die oben genannten Ergebnisse deuten allerdings zusammenfassend darauf hin, dass wnt5a als (lokaler) Akteur an der Schnittstelle zwischen Entzündung und Metabolismus wirkt.

IV.6 Wnt5a moduliert Entzündungsreaktionen durch Makrophagen

Es ist beschrieben worden, dass proinflammatorische Mediatoren wie LPS oder Zytokine wie TNF α und IL-6 die Expression von wnt5a in Makrophagen steigern können. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit tendenziell bestätigt werden (Abb. 19). Die wnt5a Expression scheint dabei unter anderem über Toll-like-Rezeptoren und den NF κ B Signalweg zu erfolgen (Blumenthal et al. 2006; Pereira et al. 2008; Relling et al. 2018). Ob das sezernierte wnt5a wiederum proinflammatorische oder antiinflammatorische Effekte in Makrophagen auslöst, konnte noch nicht ausreichend geklärt werden. In vitro Experimente mit aus Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) gewonnenen Makrophagen zeigten ambivalente Ergebnisse. So zeigte eine Studie, dass rekombinantes Wnt5a als direkter Ligand der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 (TLR-2 und 4) über intrazelluläre Signalkaskaden zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 führt. Dies induzierte eine antiinflammatorische Immunantwort durch Steigerung der IL-10 Transkription und einer Hemmung von TNF α (Mehmeti et al. 2019). Im Gegensatz dazu zeigten Pereira et al., dass mit rekombinanten Maus-wnt5a stimulierte Makrophagen zu einer gesteigerten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und IL-1 und MIP-1 β über den nicht kanonischen

wnt/Ca²⁺ Signalweg führte und dass dieser Effekt durch IL-10 wieder aufgehoben werden konnte. Zusätzlich ergab das Blockieren von wnt5a mit *small interfering* Wnt5a-RNA eine verminderte Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8 der mit LPS und Interferon- γ stimulierten Makrophagen (Pereira et al. 2008). In einer anderen Studie überexprimierten mit einem wnt5a Expressionsvektor transfizierte Makrophagen die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 and TNF α . Diese Expression wurde durch Zugabe von sFRP5 enthaltendem Medium vermindert (Zhao et al. 2014).

Unter welchen Umständen wnt5a eine proinflammatorische Kaskade amplifiziert oder durch antiinflammatorische Signale eindämmt, konnte noch nicht ausreichend geklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass je nach Makrophagen Subtyp und damit unterschiedlicher Rezeptorexprimierung eine pro- oder antiinflammatorische Immunantwort durch Makrophagen induziert wird.

Der Gegenstand zukünftiger Forschungsexperimente sollte daher die Frage sein, wie gewebespezifische Makrophagensubtypen durch ihre lokale Umgebung beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen insgesamt darauf hin, dass wnt-Signalmoleküle vor allem lokal wirken. Verschiedene Muster der Wnt-Signaltransduktion könnten für die Vielfalt der Makrophagensubtypen mit ihrem unterschiedlichen Verhalten im Gewebe und schließlich die lokale immunologische Homöostase verantwortlich sein.

IV.7 Kritik an der Methodik

Im Hinblick auf die Methodik dieser Studie ergeben sich vereinzelt limitierende Faktoren zur Aussagekraft der Untersuchungen.

Bei der Validierung der Kohorte wurde festgestellt, dass der BMI in der Patientengruppe mit 25 kg/m² im Median leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe bei im Median 23 kg/m² war (Tab. 5). Da wnt5a eine Rolle im Fettstoffwechsel spielt, kann eine Beeinflussung der Blutserumlevel durch die BMI Unterschiede nicht komplett ausgeschlossen werden (Laudes 2011; Schulte et al. 2012; Relling et al. 2018). Der Unterschied war allerdings nur gering und beide Gruppen befanden sich weit unterhalb der Adipositasgrenze (BMI < 30). Außerdem ergab das Matching bzgl. Alter und Geschlecht eine gleiche Verteilung innerhalb der Gruppen, weshalb die Kohorte als gut validiert bewertet werden kann.

In Hinblick auf die Evaluation der Krankheitsaktivitätsscores ist zu erwähnen, dass nicht für alle Patienten die Daten komplett erhoben wurden. So konnte für Psoriasispatienten aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Evaluation erfolgen (s. Kapitel III.4.2). Dadurch konnte der Erfolg der Anti-TNF α Therapie in Bezug auf Psoriasis nur eingeschränkt beurteilt werden.

Die Blutserumproben wurden vor der Messung für diese Studie bereits für ein anderes Projekt verwendet und dafür eingefroren und aufgetaut. Bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen von Blutserumproben, kann eine Denaturierung der zu untersuchenden Proteine nicht ausgeschlossen werden (Cao et al. 2003). Allerdings wurde mit äußerster Sorgfalt darauf geachtet, dass die Proben nur so lange wie notwendig und schonend auf Eis aufgetaut wurden. Unmittelbar nach der Verwendung wurden die Proben wieder eingefroren, sodass das Risiko einer Denaturierung auf ein Minimum reduziert wurde.

Die kommerziell erworbenen wnt5a und sFRP5 ELISA wurden im Voraus nicht auf ihre angegebene Messgenauigkeit hin intern evaluiert, sondern es wurde den Herstellerangaben bzgl. der Messgenauigkeit vertraut.

Bauer et al. und Huang et al. unterschieden zwischen zwei verschiedenen wnt5a-Proteinisoformen in ihren Studien und konnten unterschiedliche Effekte feststellen (Bauer et al. 2013, Huang et al. 2017). In dieser Arbeit wurde ein allgemeiner wnt5a ELISA verwendet (Kummitha et al. 2010). Dieser könnte differenziertere Beobachtungen verschleiert haben. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit war ein wnt5a-ELISA, welcher die verschiedenen Isoformen unterscheidet nicht vorhanden.

Im Zusammenhang mit dem Zellkulturexperiment wurde nicht überprüft, ob die Differenzierung zu Makrophagen erfolgreich war oder ob sich ein anderer Monozytensubtyp herausgebildet hat (z.B. Dendritische Zellen). Beispielsweise hätten unterschiedliche Oberflächenproteine über aufwändige Messverfahren, wie z.B. die Flow cytometry und Fluoreszenz-Bildgebung dargestellt werden können (vgl. Mittar et al. 2011). Zusätzlich ist eine Differenzierung von THP-1 Zellen zu dendritischen Zellen durch rekombinantes TNF α vorbeschrieben (Berges et al. 2005). Die Stimulation durch LPS, TNF α und IL-6 der zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen könnte ebenfalls zu einem unterschiedlichen Monozytensubtyp geführt haben. Die Differenzierung zu Makrophagen über PMA ist allerdings eine vielbeschriebene sichere Methode (Schwende et al. 1996). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Differenzierung zu Makrophagen regelgerecht erfolgt ist.

N = 4 Experimente wurden mit einer Zellkonzentration von $10,5 \times 10^6$ Zellen durchgeführt und ebenfalls n = 4 Experimente mit einer Zellkonzentration von $12,5 \times 10^6$ Zellen. Unterschiedliche Zellkonzentrationsunterschiede können die Proteinexpression beeinflussen. Da der Konzentrationsunterschied gering war, wurde er als nicht relevant für die wnt5a Expression der Zellen bewertet und bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

In humanen Atemwegsmyozyten konnte nachgewiesen werden, dass wnt5a zu einer signifikanten Beeinflussung der Aktin-Polymerisation führt (Koopmans et al. 2016). Da Aktin in dieser Studie als Ladekontrolle für die Immundetektion von wnt5a verwendet wurde, kann eine Beeinflussung der Immundetektion durch wnt5a nicht komplett ausgeschlossen werden. Zwar wurde eine solche Beeinflussung noch nicht für Makrophagen nachgewiesen, trotzdem sollte zum Ausschluss von Messungenauigkeiten in nachfolgenden Studien eine andere Ladekontrolle wie beispielsweise die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet werden.

V Zusammenfassung

Das Zytokinsystem bestehend aus dem proinflammatorisch wirkenden Glykopeptid *wingless-type MMTV integration site family member 5a* (wnt5a) und seinem antiinflammatorisch wirkenden löslichen wnt5a-Rezeptor *secreted frizzled-related protein 5* (sFRP5) ist bei Erkrankungen, die mit Entzündung assoziiert sind, dysreguliert. Das konnte bereits bei Adipositas, Sepsis und Parodontitis beobachtet werden. Es wird angenommen, dass diesem Zytokinsystem eine Bedeutung in der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen zukommt. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) nimmt in der Pathophysiologie chronischer Entzündung eine Schlüsselfunktion ein und könnte in Wechselwirkung zu dem wnt5a/sFRP5-System stehen. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, welche wnt5a und sFRP5 Blutserumspiegel bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen vorliegen und wie diese sich unter einer Anti-TNF α Therapie verhalten.

In einer experimentellen translationalen Case-Control-Humanstudie wurden die Blutseren von 133 Patienten mit chronischer Entzündung im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht. Davon erhielten 107 Patienten eine Anti-TNF α Therapie und wurden einer der vier Krankheitsgruppen zugeordnet: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), Psoriasis (Pso), Rheumatoide Arthritis (RA) und Spondylitis ankylosans (SpA). Die Blutserumspiegel von wnt5a und sFRP5 wurden mittels *Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) zu drei Zeitpunkten der Therapie bestimmt: Zum Ausgangszeitpunkt, nach 6 und nach 26 Wochen (T0/T6/T26).

Die wnt5a, sowie die sFRP5-Serumlevel waren zum Ausgangszeitpunkt bei chronischer Entzündung im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht (wnt5a: $p = 0.15$, $n = 115$; sFRP5: $p = 0.66$, $n = 52$). Unter einer Anti-TNF α Therapie sanken die sFRP5-Serumlevel von T0 auf T6 signifikant ab ($p = 0.002$, $n = 56$). Innerhalb der Patientengruppe CED war dieser Effekt besonders prominent ($p = 0.007$, $n = 19$). Hingegen zeigte sich bei Pso, RA und SpA weder im Vergleich zu den Kontrollen noch unter Anti-TNF α Therapie eine signifikante Veränderung der wnt5a oder sFRP5-Serumlevel.

Die bisher postulierte proinflammatorische Rolle von wnt5a in chronisch entzündlichen Erkrankungen konnte in dieser Studie durch ELISA-Messung der wnt5a-Serumlevel nicht bestätigt werden. Das zeitweilige Absinken der sFRP5-Serumkonzentration unter Anti-TNF α

Therapie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (insbesondere bei CED), lässt auf eine komplexe Interaktion zwischen TNF α und sFRP5 schließen. TNF α könnte (kurzfristig) einen stimulierenden Einfluss auf sFRP5 haben. Weitere Untersuchungen zur Interaktion zwischen sFRP5 und TNF α sollten besonders im Hinblick auf CED folgen. Außerdem bleibt zu untersuchen, ob sFRP5 sich als diagnostischer oder prognostischer Biomarker eignet und ob rekombinantes sFRP5 als Therapeutikum bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden kann.

VI Literaturverzeichnis

- Agostino M, Pohl SÖ-G, Dharmarajan A (2017): Structure-based prediction of Wnt binding affinities for Frizzled-type cysteine-rich domains. *J Biol Chem* 292, 11218–11229
- Bauer M, Bénard J, Gaasterland T, Willert K, Cappellen D (2013): WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers. *PLoS One* 8, e80526
- Bergenfelz C, Medrek C, Ekström E, Jirstrom K, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K (2012): Wnt5a Induces a Tolerogenic Phenotype of Macrophages in Sepsis and Breast Cancer Patients. *J Immunol* 188, 5448–5458
- Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Höh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V (2005): A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 896–907
- Bhatt PM, Malgor R (2014): Wnt5a: A player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Atherosclerosis* 237, 155–162
- Bheda P (2020): Metabolic transcriptional memory. *Mol Metab* 38
- Bilkovski R, Schulte DM, Oberhauser F, Mauer J, Hampel B, Gutschow C, Krone W, Laudes M (2011): Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. *Int J Obes* 35, 1450–1454
- Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N (2006): The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108, 965–973
- Bondar T, Medzhitov R (2013): The Origins of Tumor-Promoting Inflammation. *Cancer Cell* 24, 143–144
- Bougault C, Briolay A, Boutet M-A, Pilet P, Delplace S, Le Goff B, Guicheux J, Blanchard F, Magne D (2015): Wnt5a is expressed in spondyloarthritis and exerts opposite effects on enthesis and bone in murine organ and cell cultures. *Transl Res J Lab Clin Med* 166, 627–638
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M (1998): Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109–118
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J (2008): Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121, 737–746
- Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J, Perez JL, Spencer-Green GT (2006): The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 54, 26–37

- Briolay A, Lencel P, Bessueille L, Caverzasio J, Buchet R, Magne D (2013): Autocrine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF- α in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430, 1072–1077
- Bröker B, Schütt C, Fleischer B: *Grundwissen Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2019
- Cahill GF (1980): Metabolic Memory. *N Engl J Med* 302, 396–397
- Calisto JD, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R (2005): Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 132, 2587–2597
- Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR (2003): Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng* 82, 684–690
- Chang JT, Esumi N, Moore K, Li Y, Zhang S, Chew C, Goodman B, Rattner A, Moody S, Stetten G, et al. (1999): Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 8, 575–583
- Chen H, He Y, Wu D, Dai G, Zhao C, Huang W, Jiang D (2017): Bone marrow sFRP5 level is negatively associated with bone formation markers. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 28, 1305–1311
- Chen L, Zhao X, Liang G, Sun J, Lin Z, Hu R, Chen P, Zhang Z, Zhou L, Li Y (2017): Recombinant SFRP5 protein significantly alleviated intrahepatic inflammation of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutr Metab* 14, 56
- Cici D, Corrado A, Rotondo C, Cantatore FP (2019): Wnt Signaling and Biological Therapy in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. *Int J Mol Sci* 20, 5552
- Clark CC, Cohen I, Eichstetter I, Cannizzaro LA, McPherson JD, Wasmuth JJ, Iozzo RV (1993): Molecular cloning of the human proto-oncogene Wnt-5A and mapping of the gene (WNT5A) to chromosome 3p14-p21. *Genomics* 18, 249–260
- Davis JS, Ferreira D, Paige E, Gedye C, Boyle M (2020): Infectious Complications of Biological and Small Molecule Targeted Immunomodulatory Therapies. *Clin Microbiol Rev* 33, e00035-19, /cmr/33/3/CMR.00035-19.atom
- Dhir M, Montgomery EA, Glöckner SC, Schuebel KE, Hooker CM, Herman JG, Baylin SB, Gearhart SL, Ahuja N (2008): Epigenetic regulation of WNT signaling pathway genes in inflammatory bowel disease (IBD) associated neoplasia. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 12, 1745–1753
- Durnez A, Paternotte S, Fechtenbaum J, Landewé RBM, Dougados M, Roux C, Briot K (2013): Increase in bone density in patients with spondyloarthritis during anti-tumor necrosis factor therapy: 6-year followup study. *J Rheumatol* 40, 1712–1718

- Eaton S (1997): Planar polarization of *Drosophila* and vertebrate epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 9, 860–866
- Eckert WA, Kartenbeck J: Auftrennung von Proteinen durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen. In: Eckert WA, Kartenbeck J (Hrsg.): *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion* (Springer Labormanual). Springer, Berlin, Heidelberg 1997, 67–142
- Eichele DD, Kharbanda KK (2017): Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol* 23, 6016–6029
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874
- Fiorino G, Girolomoni G, Lapadula G, Orlando A, Danese S, Olivieri I, SIR, SIDeMaST, and IG-IBD (2014): The use of biosimilars in immune-mediated disease: A joint Italian Society of Rheumatology (SIR), Italian Society of Dermatology (SIDeMaST), and Italian Group of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) position paper. *Autoimmun Rev* 13, 751–755
- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001): APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 55–67
- Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S: *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2020
- Fujii M, Sakaguchi A, Kamata R, Nagao M, Kikuchi Y, Evans SM, Yoshizumi M, Shimono A, Saga Y, Kokubo H (2017): Sfrp5 identifies murine cardiac progenitors for all myocardial structures except for the right ventricle. *Nat Commun* 8, 14664
- Fujiwara N, Kobayashi K (2005): Macrophages in Inflammation. *Curr Drug Target -Inflamm Allergy* 4, 281–286
- Gerdes S, Laudes M, Neumann K, Baurecht H, Mrowietz U (2014): Wnt5a: a potential factor linking psoriasis to metabolic complications. *Exp Dermatol* 23, 438–440
- Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM (2020): The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 145, 16–27
- Gudjonsson J, Johnston A, Stoll S, Riblett M, Xing X, Kochkodan J, Ding J, Nair R, Aphale A, Voorhees J, Elder J (2010): Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 130, 1849–1859
- Hackam DG (2007): Translating animal research into clinical benefit. *BMJ* 334, 163–164
- He X, Saint-Jeannet JP, Wang Y, Nathans J, Dawid I, Varmus H (1997): A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 275, 1652–1654

- Hoepfner LH, Secretó FJ, Westendorf JJ (2009): Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets* 13, 485–496
- Horton et al.: *Biochemie*. Pearson Deutschland GmbH 2008
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J (1999): A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436
- Hu Z, Xu M, Li Q, Lin Z, Liao Z, Cao S, Wei Q, Zhang YL, Li T, Jin O, et al. (2012): Adalimumab significantly reduces inflammation and serum DKK-1 level but increases fatty deposition in lumbar spine in active ankylosing spondylitis. *Int J Rheum Dis* 15, 358–365
- Huang T-C, Lee P-T, Wu M-H, Huang C-C, Ko C-Y, Lee Y-C, Lin D-Y, Cheng Y-W, Lee K-H (2017): Distinct roles and differential expression levels of Wnt5a mRNA isoforms in colorectal cancer cells. *PLoS ONE* 12
- Itoh K, Jenny A, Mlodzik M, Sokol SY (2009): Centrosomal localization of Diversin and its relevance to Wnt signaling. *J Cell Sci* 122, 3791–3798
- Kameda H (2016): [TNF inhibitors]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med* 74, 957–962
- Katoh Masuko, Katoh Masaru (2007): STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). *Int J Mol Med* 19, 273–278
- Katoh Masuko, Katoh Masaru (2009): Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. *Int J Mol Med* 23, 763–769
- Katula KS, Joyner-Powell NB, Hsu C-C, Kuk A (2012): Differential Regulation of the Mouse and Human *Wnt5a* Alternative Promoters A and B. *DNA Cell Biol* 31, 1585–1597
- Kawano Y, Kypta R (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627–2634
- Keller K-M: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. In: Lentze MJ, Schulte FJ, Schaub J, Spranger J (Hrsg.): *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*. Springer, Berlin, Heidelberg 2007, 933–939
- Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, Tannenbaum H, Hua Y, Teoh LS, Fischkoff SA, Chartash EK (2004): Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* 50, 1400–1411
- Kikuchi A (1999): Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal* 11, 777–788
- Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S (2007): Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 19, 659–671

- Kim J, Chang W, Jung Y, Song K, Lee I (2012): Wnt5a activates THP-1 monocytic cells via a β -catenin-independent pathway involving JNK and NF- κ B activation. *Cytokine* 60, 242–248
- Kim JE, Bang SH, Choi JH, Kim CD, Won CH, Lee MW, Chang SE (2016): Interaction of Wnt5a with Notch1 is Critical for the Pathogenesis of Psoriasis. *Ann Dermatol* 28, 45–54
- Kim Jihun, Kim Jungtae, Kim DW, Ha Y, Ihm MH, Kim H, Song K, Lee I (2010): Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J Immunol Baltim Md 1950* 185, 1274–1282
- Kim T-O, Han YK, Yi JM (2020): Hypermethylated promoters of tumor suppressor genes were identified in Crohn’s disease patients. *Intest Res*
- Kohn AD, Moon RT (2005): Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38, 439–446
- Komiya Y, Habas R (2008): Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75
- Koopmans T, Kumawat K, Halayko AJ, Gosens R (2016): Regulation of actin dynamics by WNT-5A: implications for human airway smooth muscle contraction. *Sci Rep* 6, 30676
- Korman NJ (2020): Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence? *Br J Dermatol* 182, 840–848
- Kummitha CM, Mayle KM, Christman MA, Deosarkar SP, Schwartz AL, McCall KD, Kohn LD, Malgor R, Goetz DJ (2010): A sandwich ELISA for the detection of Wnt5a. *J Immunol Methods* 352, 38–44
- Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A (2007): Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J* 402, 515–523
- Kwon S-R, Lim M-J, Suh C-H, Park S-G, Hong Y-S, Yoon B-Y, Kim H-A, Choi H-J, Park W (2012): Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol Int* 32, 2523–2527
- Kwon Y-J, Lee S-W, Park Y-B, Lee S-K, Park M-C (2014): Secreted frizzled-related protein 5 suppresses inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through down-regulation of c-Jun N-terminal kinase. *Rheumatol Oxf Engl* 53, 1704–1711
- Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ (2008): Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* 103, 162–169
- Laudes M (2011): Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol* 46, R65–R72
- Lehmann U (2010): DNA-Methylierung. *Pathol* 31, 274–279

- Lin H-W, Fu C-F, Chang M-C, Lu T-P, Lin H-P, Chiang Y-C, Chen C-A, Cheng W-F (2018): CDH1, DLEC1 and SFRP5 methylation panel as a prognostic marker for advanced epithelial ovarian cancer. *Epigenomics* 10, 1397–1413
- Liu Q, Yang C, Wang S, Shi D, Wei C, Song J, Lin X, Dou R, Bai J, Xiang Z, et al. (2020): Wnt5a-induced M2 polarization of tumor-associated macrophages via IL-10 promotes colorectal cancer progression. *Cell Commun Signal CCS* 18, 51
- Ljungberg JK, Kling JC, Tran TT, Blumenthal A (2019): Functions of the WNT Signaling Network in Shaping Host Responses to Infection. *Front Immunol* 10, 2521
- Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781–810
- Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D (2004): Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119, 97–108
- Ma J, Wang R, Fang X, Sun Z (2012): β -catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 7, 750–762
- Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, et al. (2012): Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 18, 405–412
- Magrey MN, Khan MA (2017): The Paradox of Bone Formation and Bone Loss in Ankylosing Spondylitis: Evolving New Concepts of Bone Formation and Future Trends in Management. *Curr Rheumatol Rep* 19, 17
- Manicassamy S, Reizis B, Ravindran R, Nakaya H, Salazar-Gonzalez RM, Wang Y, Pulendran B (2010): Activation of β -Catenin in Dendritic Cells Regulates Immunity Versus Tolerance in the Intestine. *Science* 329, 849–853
- Martinez FO, Gordon S (2014): The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006): Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol* 177, 7303–7311
- Masckauchán TNH, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li C-M, Khoo A, Tycko B, Brown AMC, Kitajewski J (2006): Wnt5a Signaling Induces Proliferation and Survival of Endothelial Cells In Vitro and Expression of MMP-1 and Tie-2. *Mol Biol Cell* 17, 5163–5172
- Medzhitov R (2008): Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435
- Mehmeti M, Bergenfelz C, Källberg E, Millrud CR, Björk P, Ivars F, Johansson-Lindbom B, Kjellström S, André I, Leandersson K (2019): Wnt5a is a TLR2/4-ligand that induces tolerance in human myeloid cells. *Commun Biol* 2, 176

- Menck K, Klemm F, Gross JC, Pukrop T, Wenzel D, Binder C (2013): Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget* 4, 2057–2066
- Miao C, Yang Y, He X, Li X, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv X-W, Jin Y, Li J (2013): Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal* 25, 2069–2078
- Mikels A. J., Nusse R (2006): Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115
- Mikels A. J., Nusse R (2006): Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25, 7461–7468
- Mittar D, Paramban R, McIntyre C (2011): Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. 20
- Müller N, Schulte DM, Türk K, Freitag-Wolf S, Hampe J, Zeuner R, Schröder JO, Gouni-Berthold I, Berthold HK, Krone W, et al. (2015): IL-6 blockade by monoclonal antibodies inhibits apolipoprotein (a) expression and lipoprotein (a) synthesis in humans. *J Lipid Res* 56, 1034–1042
- Nakamura K, Sano S, Fuster JJ, Kikuchi R, Shimizu I, Ohshima K, Katanasaka Y, Ouchi N, Walsh K (2016): Secreted Frizzled-related Protein 5 Diminishes Cardiac Inflammation and Protects the Heart from Ischemia/Reperfusion Injury. *J Biol Chem* 291, 2566–2575
- Neumann E, Frommer K, Diller M, Müller-Ladner U (2018): Rheumatoide Arthritis. *Z Für Rheumatol* 77, 769–775
- Niehrs C (2012): The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 767–779
- Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, Qiao S, Takada S, Kikuchi A, Minami Y (2010): Ror2/Frizzled Complex Mediates Wnt5a-Induced AP-1 Activation by Regulating Dishevelled Polymerization. *Mol Cell Biol* 30, 3610–3619
- Nusse R, Varmus HE (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99–109
- Okuma-Yoshioka C, Seto H, Kadono Y, Hikita A, Oshima Y, Kurosawa H, Nakamura K, Tanaka S (2008): Tumor necrosis factor- α inhibits chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts through p38 mitogen activating protein kinase pathways. *Mod Rheumatol* 18, 366–378
- Osta B, Benedetti G, Miossec P (2014): Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Front Immunol* 5, 48
- Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, Shimono A, Walsh K (2010): Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329, 454–457

- Pahwa R, Goyal A, Bansal P, Jialal I: Chronic Inflammation. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2020
- Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G (2008): Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 504–510
- Piper W: Innere Medizin (Springer-Lehrbuch). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2013
- Puchner R (Hrsg.): Rheumatologie aus der Praxis. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2017
- Rauner M, Stein N, Winzer M, Goettsch C, Zwerina J, Schett G, Distler JHW, Albers J, Schulze J, Schinke T, et al. (2012): WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 27, 575–585
- Reichsman F, Smith L, Cumberledge S (1996): Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* 135, 819–827
- Reischl J, Schwenke S, Beekman JM, Mrowietz U, Stürzebecher S, Heubach JF (2007): Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J Invest Dermatol* 127, 163–169
- Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C (1975): The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 64, 509–516
- Relling I, Akcay G, Fangmann D, Knappe C, Schulte DM, Hartmann K, Müller N, Türk K, Dempfle A, Franke A, et al. (2018): Role of wnt5a in Metabolic Inflammation in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 103, 4253–4264
- Rescigno M, Di Sabatino A (2009): Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 119, 2441–2450
- Robinson PN (2012): Deep phenotyping for precision medicine. *Hum Mutat* 33, 777–780
- Rubio Vargas R, Melguizo Madrid E, González Rodríguez C, Navarro Sarabia F, Dominguez Quesada C, Ariza Ariza R, Navarro Compán V (2017): Association between serum dickkopf-1 levels and disease duration in axial spondyloarthritis. *Reumatol Clin* 13, 197–200
- Sato A, Khadka DK, Liu W, Bharti R, Runnels LW, Dawid IB, Habas R (2006): Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Dev Camb Engl* 133, 4219–4231
- Sato A, Kayama H, Shojima K, Matsumoto S, Koyama H, Minami Y, Nojima S, Morii E, Honda H, Takeda K, Kikuchi A (2015): The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. *Sci Rep* 5, 1–16
- Schmitz S, Desel C: Der Experimentator Zellbiologie (Experimentator). Springer Spektrum, Berlin 2018

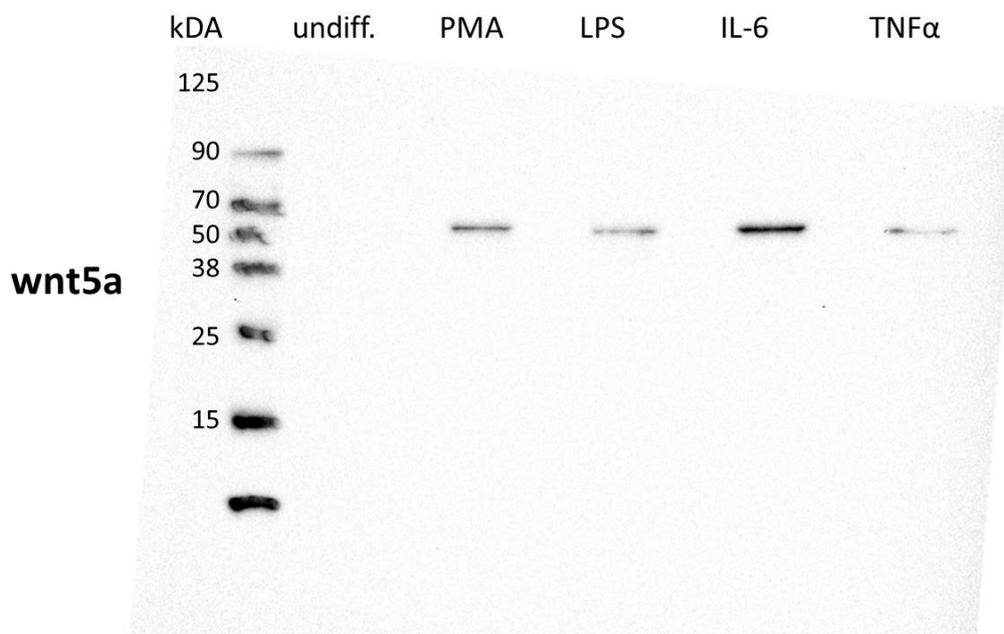
- Schulte DM, Müller N, Neumann K, Oberhäuser F, Faust M, Güdelhöfer H, Brandt B, Krone W, Laudes M (2012): Pro-Inflammatory wnt5a and Anti-Inflammatory sFRP5 Are Differentially Regulated by Nutritional Factors in Obese Human Subjects. *PLoS ONE* 7, e32437
- Schulte DM, Kragelund D, Müller N, Hagen I, Elke G, Titz A, Schädler D, Schumacher J, Weiler N, Bewig B, et al. (2015): The wntless-related integration site-5a/secreted frizzled-related protein-5 system is dysregulated in human sepsis. *Clin Exp Immunol* 180, 90–97
- Schulz J, Knappe C, Graetz C, Mewes L, Türk K, Black AK, Lieb W, Schäfer AS, Fawzy El-Sayed KM, Dörfer CE, et al. (2019): Secreted frizzled-related protein 5 serum levels in human periodontitis- A nested case-control study. *J Clin Periodontol* 46, 522–528
- Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer H-J, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2002): The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase I ϵ to the β -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev* 16, 2073–2084
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P (1996): Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Leukoc Biol* 59, 555–561
- Seifert O, Söderman J, Skarstedt M, Dienus O, Matussek A (2015): Increased expression of the Wnt signalling inhibitor Dkk-1 in non-lesional skin and peripheral blood mononuclear cells of patients with plaque psoriasis. *Acta Derm Venereol* 95, 407–410
- Sen M (2005): Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 44, 708–713
- Sen M, Carson DA (2002): Wnt signaling in rheumatoid synoviocyte activation. *Mod Rheumatol* 12, 5–9
- Sen M, Ghosh G (2008): Transcriptional Outcome of Wnt-Frizzled Signal Transduction in Inflammation: Evolving Concepts. *J Immunol* 181, 4441–4445
- Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA (2000): Expression and function of wntless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2791–2796
- Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA (2001): Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum* 44, 772–781
- Shao Y, Zheng Q, Wang W, Xin N, Song X, Zhao C, Shao Y, Zheng Q, Wang W, Xin N, et al. (2016): Biological functions of macrophage-derived Wnt5a, and its roles in human diseases. *Oncotarget* 7, 67674–67684
- Sharma RP, Chopra VL (1976): Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48, 461–465
- Shi J, Chi S, Xue J, Yang J, Li F, Liu X (2016): Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res* 2016, 1–18
- Sieper J, Poddubnyy D (2017): Axial spondyloarthritis. *The Lancet* 390, 73–84

- Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y (2012): Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum* 64, 3355–3363
- Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Lowes MA, Krueger JG (2011): Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes. *J Invest Dermatol* 131, 391–400
- Sullivan E, Kershaw J, Blackburn S, Mahajan P, Boklage SH (2020): Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drug Prescription Patterns Among Rheumatologists in Europe and Japan. *Rheumatol Ther*
- Suryawanshi A, Tadagavadi RK, Swafford D, Manicassamy S (2016): Modulation of Inflammatory Responses by Wnt/ β -Catenin Signaling in Dendritic Cells: A Novel Immunotherapy Target for Autoimmunity and Cancer. *Front Immunol* 7, 460
- Swafford D, Shanmugam A, Ranganathan P, Hussein MS, Koni PA, Prasad PD, Thangaraju M, Manicassamy S (2018): Canonical Wnt Signaling in CD11c+ APCs Regulates Microbiota-Induced Inflammation and Immune Cell Homeostasis in the Colon. *J Immunol* 200, 3259–3268
- Testa R, Bonfigli AR, Prattichizzo F, La Sala L, De Nigris V, Ceriello A (2017): The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients* 9
- Tong S, Ji Q, Du Y, Zhu X, Zhu C, Zhou Y (2019): Sfrp5/Wnt Pathway: A Protective Regulatory System in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res* 39, 472–482
- Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y (2003): Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162, 899–908
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171–176
- Valdimarsson H, Baker BS, Jónsdóttir I, Powles A, Fry L (1995): Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 16, 145–149
- van Amerongen R, Mikels A, Nusse R (2008): Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 1, re9
- Wang S-Y, Liu Y-Y, Ye H, Guo J-P, Li R, Liu X, Li Z-G (2011): Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 38, 821–827
- Weckmann AL, Alcocer-Varela J (1996): Cytokine inhibitors in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 26, 539–557

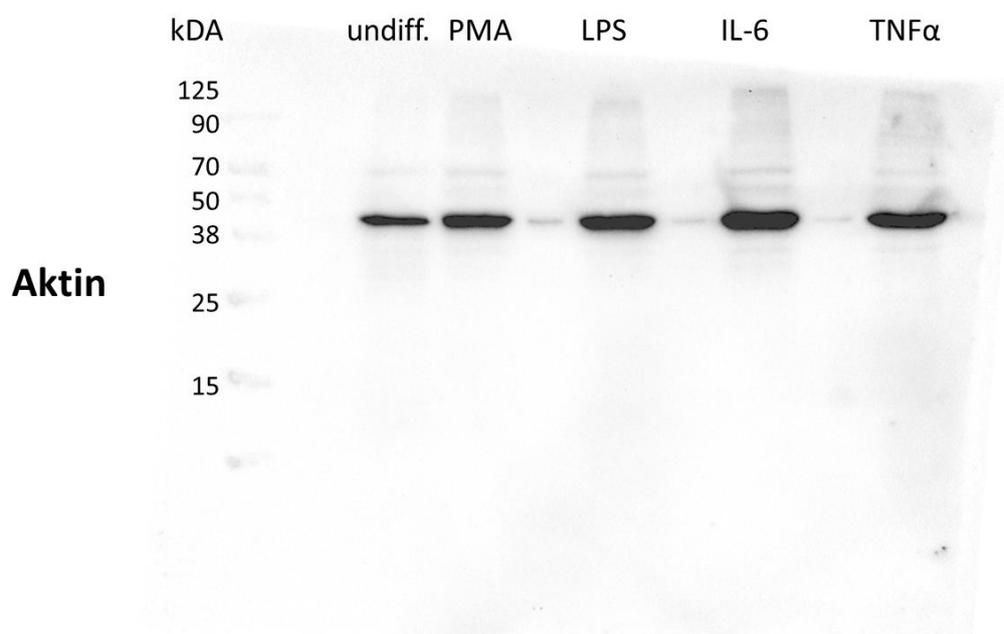
- Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA (1985): Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 85, 579–583
- You J, Nguyen AV, Albers CG, Lin F, Holcombe RF (2008): Wnt pathway-related gene expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 53, 1013–1019
- Yu C-H, Nguyen TTK, Irvine KM, Sweet MJ, Frazer IH, Blumenthal A (2014): Recombinant Wnt3a and Wnt5a elicit macrophage cytokine production and tolerization to microbial stimulation via Toll-like receptor 4. *Eur J Immunol* 44, 1480–1490
- Zhao C, Bu X, Wang W, Ma T, Ma H (2014): GEC-derived SFRP5 inhibits Wnt5a-induced macrophage chemotaxis and activation. *PLoS One* 9, e85058
- Zhao Z, Wang G, Wang Yanyan, Yang J, Wang Yiwen, Zhu J, Huang F (2019): Correlation between magnetic resonance imaging (MRI) findings and the new bone formation factor Dkk-1 in patients with spondyloarthritis. *Clin Rheumatol* 38, 465–475
- Zhu X, Wu Y, Huang S, Chen Y, Tao Y, Wang Y, He S, Shen S, Wu J, Guo X, et al. (2014): Overexpression of Wnt5a in mouse epidermis causes no psoriasis phenotype but an impairment of hair follicle anagen development. *Exp Dermatol* 23, 926–928

VII Anhang

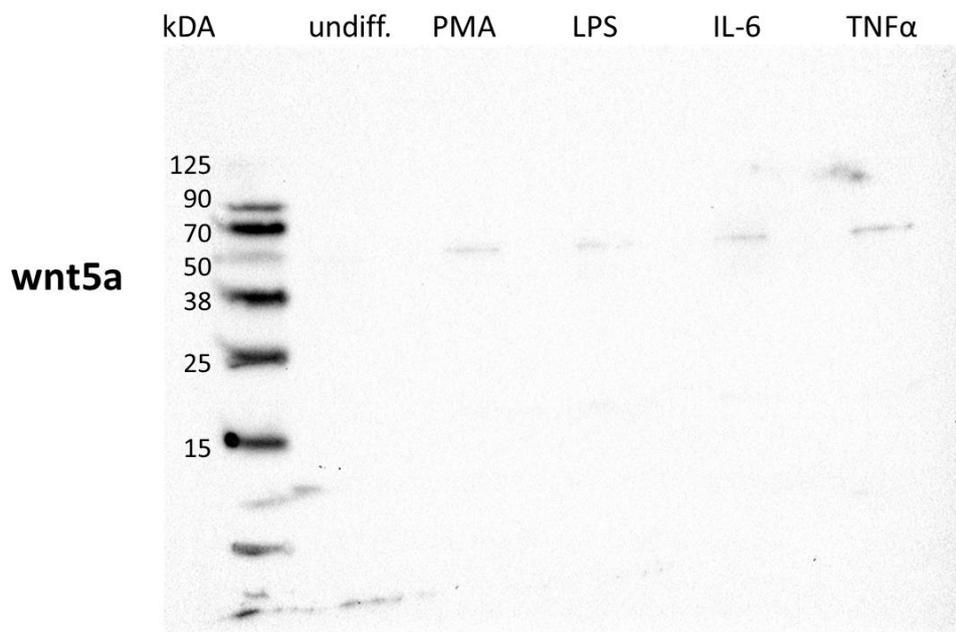
Anhang 1: Versuch 1



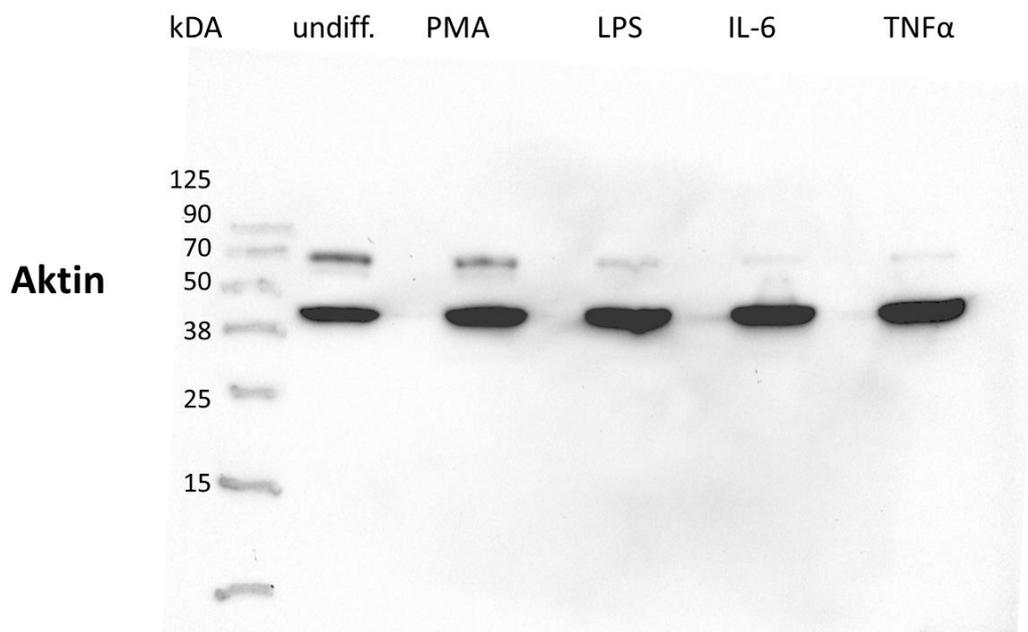
Versuch 1: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNFα = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNFα stimulierte Zellen.



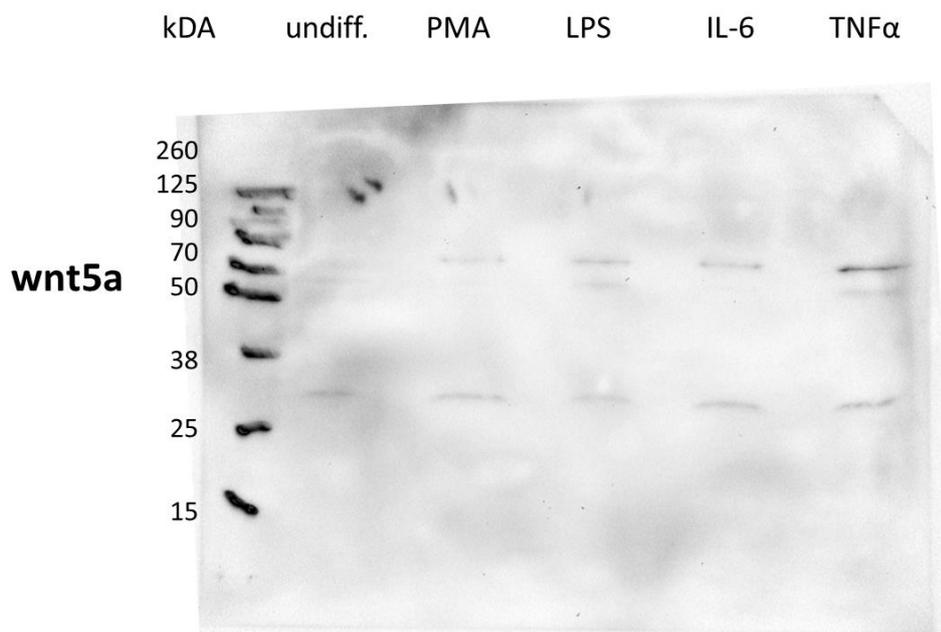
Versuch 1: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNFα = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNFα stimulierte Zellen.

Anhang 2: Versuch 2

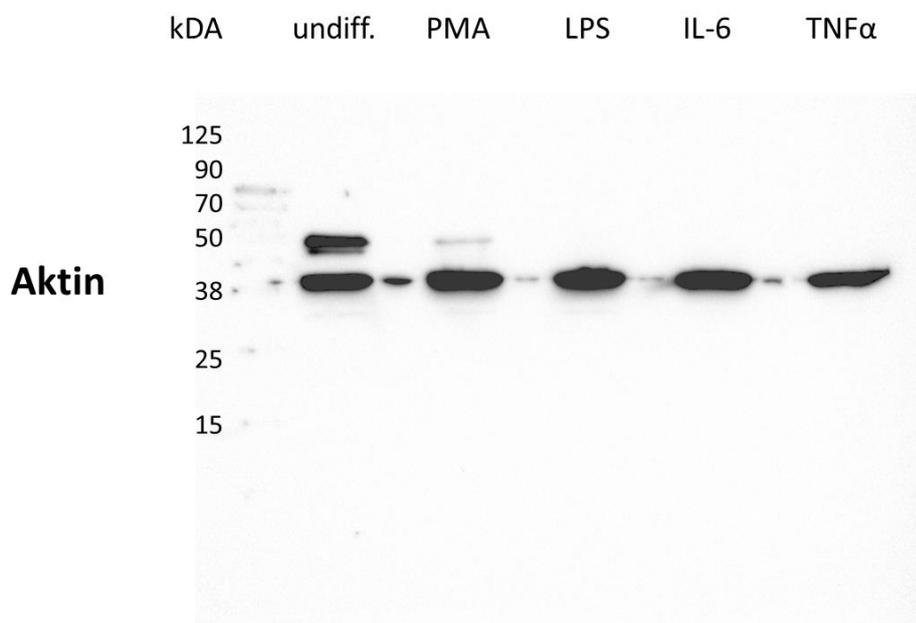
Versuch 2: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



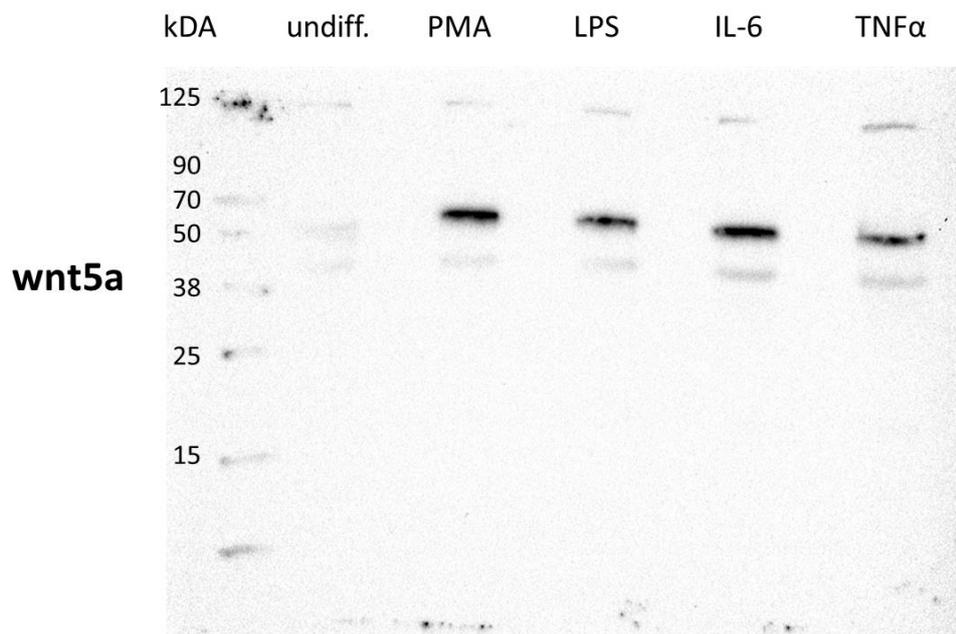
Versuch 2: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Anhang 3: Versuch 3

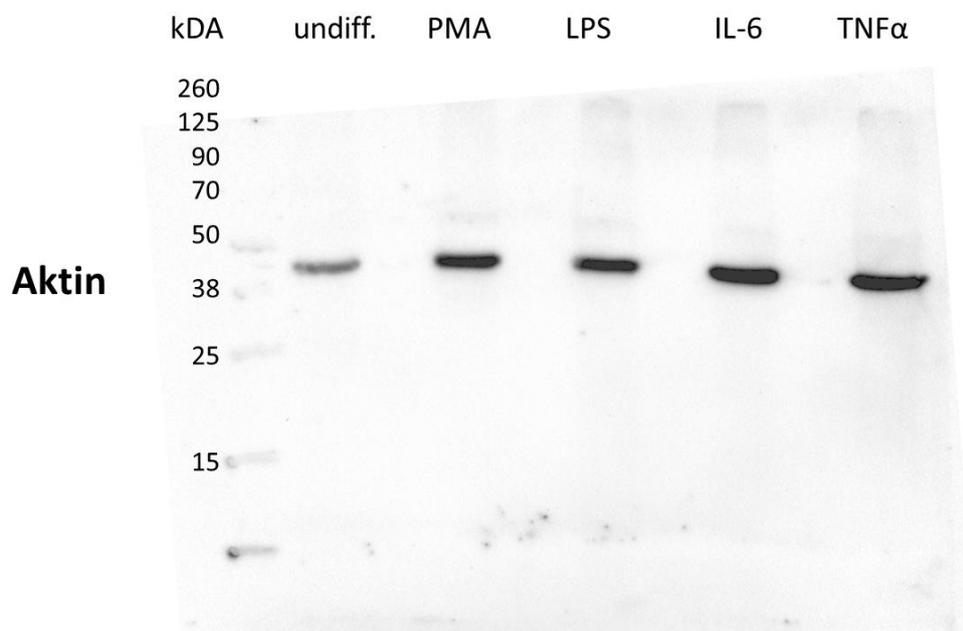
Versuch 3: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



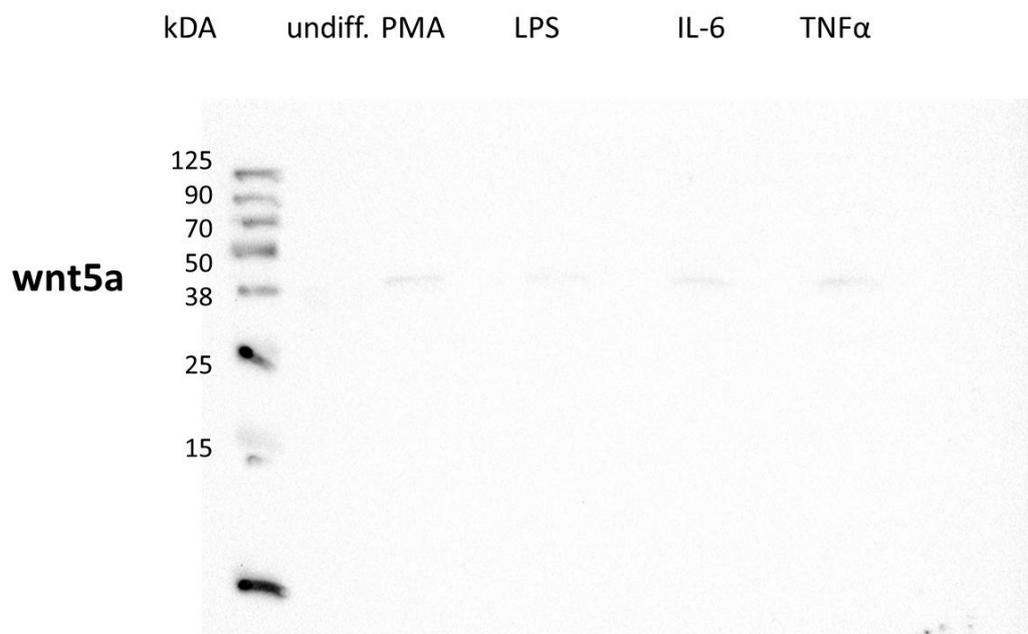
Versuch 3: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Anhang 4: Versuch 4

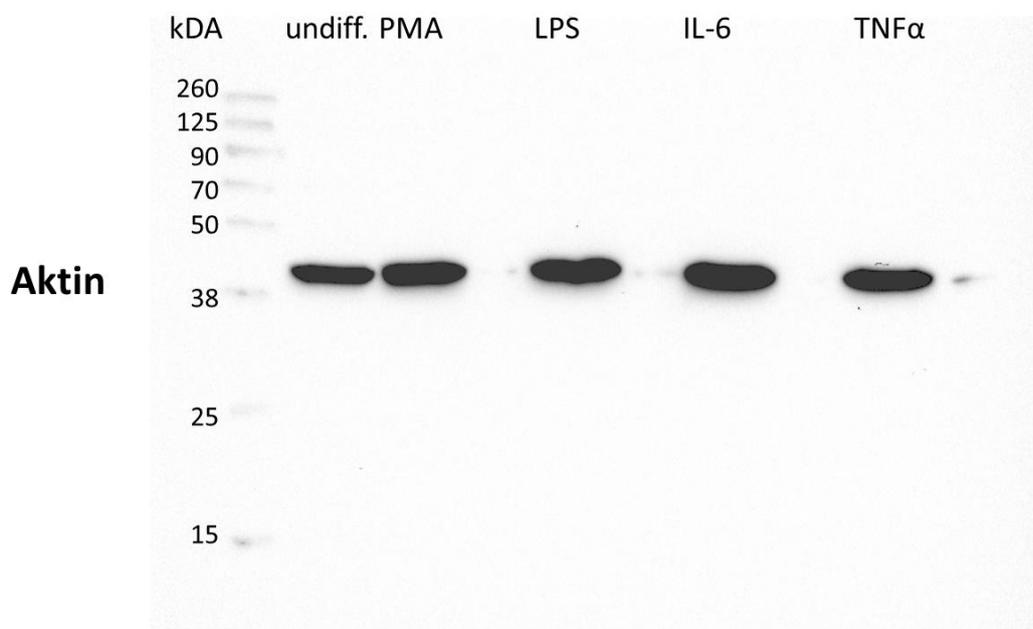
Versuch 4: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



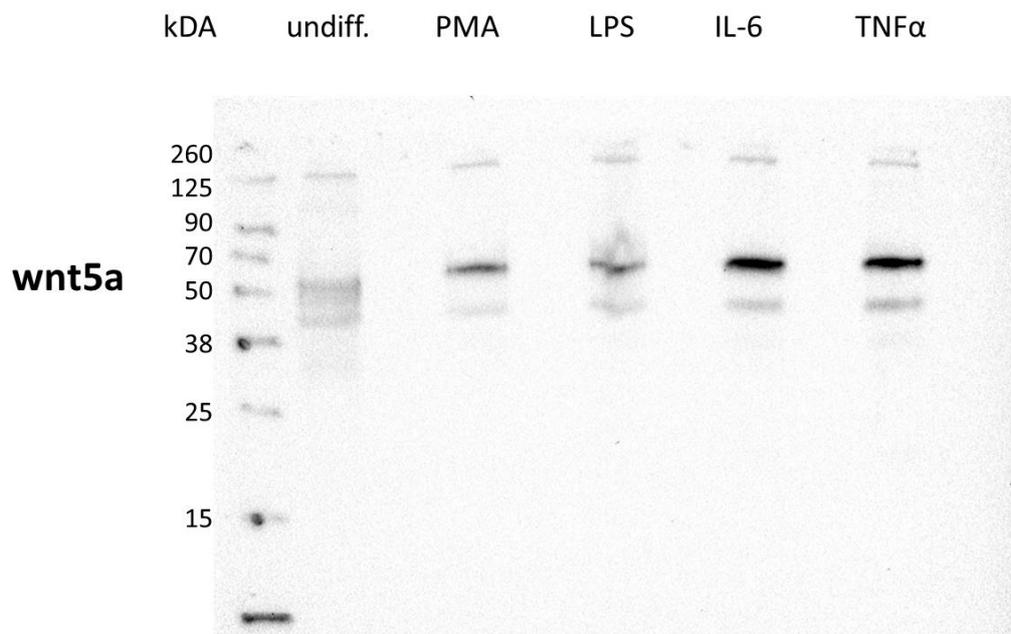
Versuch 4: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Anhang 5: Versuch 5

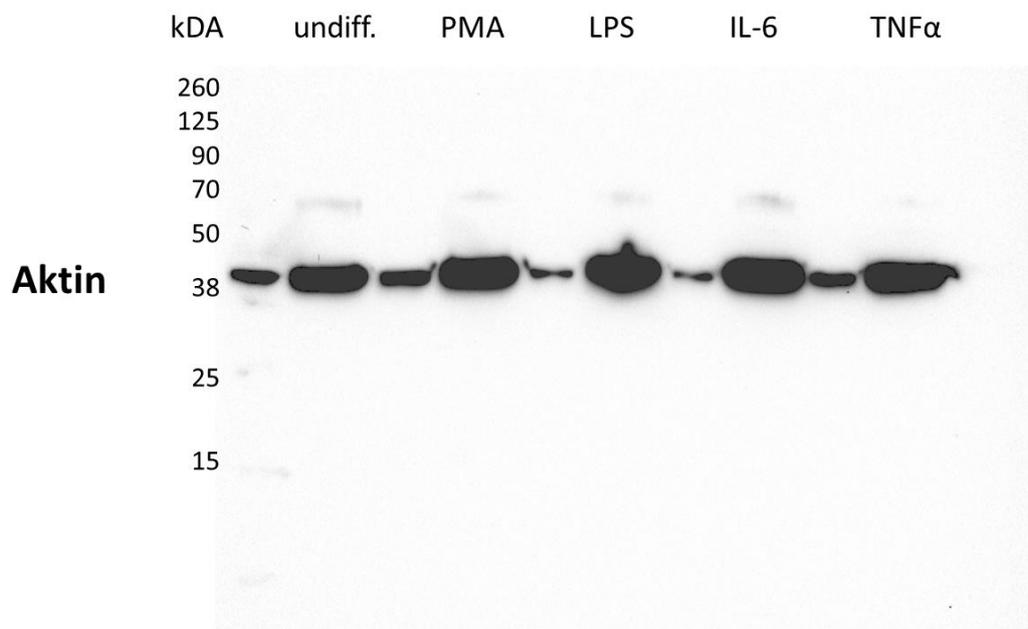
Versuch 5: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



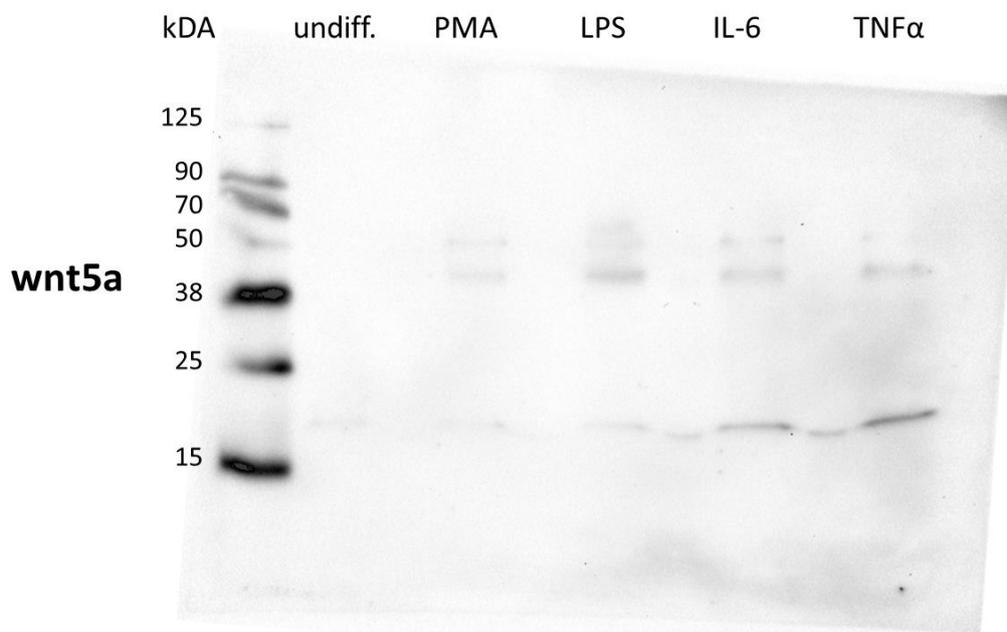
Versuch 5: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Anhang 6: Versuch 6

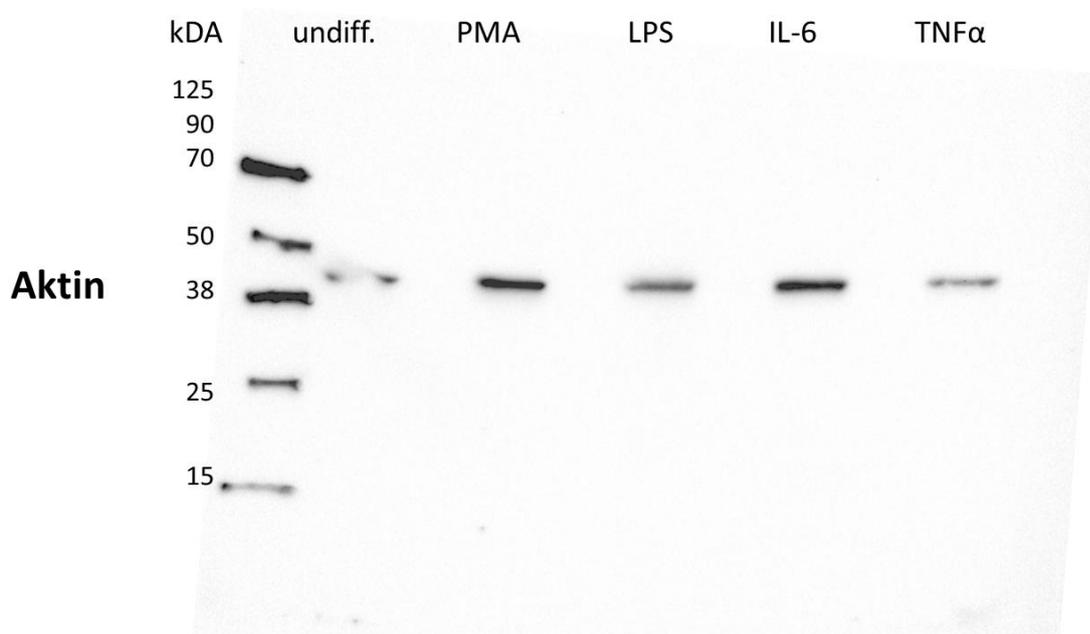
Versuch 6: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



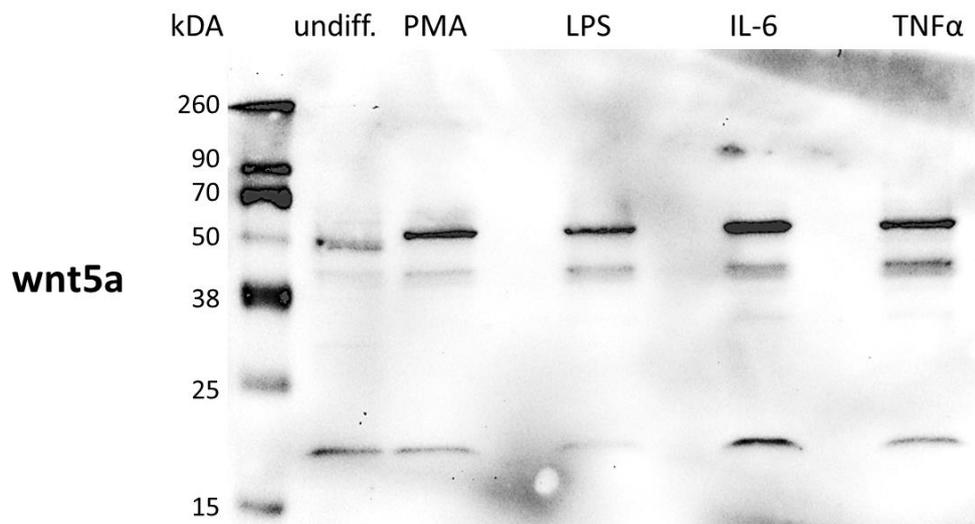
Versuch 6: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Anhang 7: Versuch 7

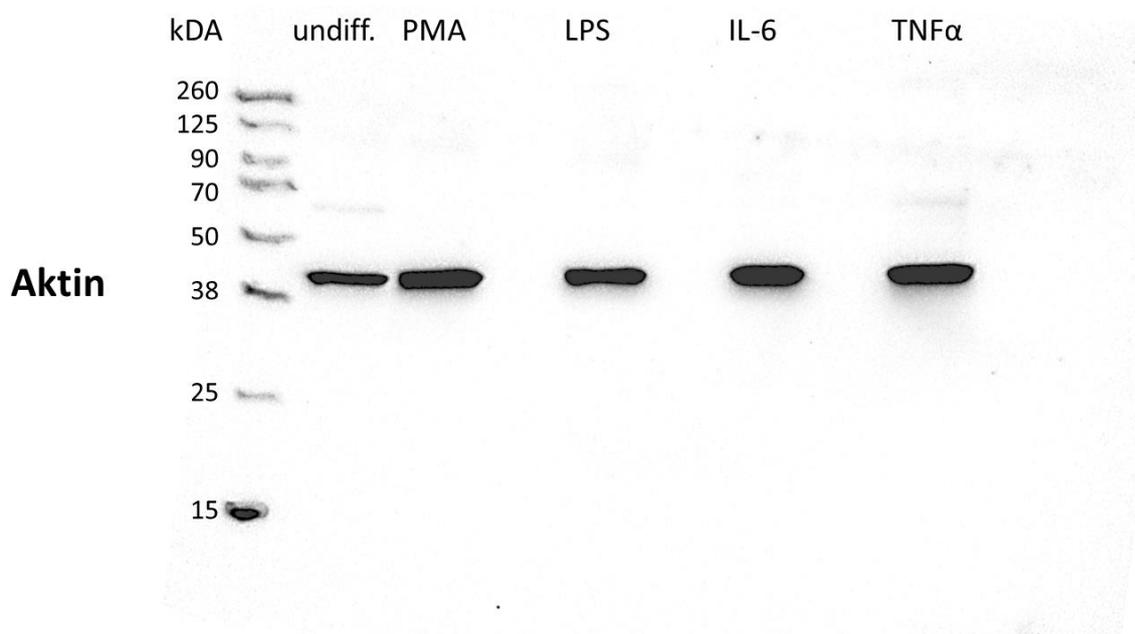
Versuch 7: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



Versuch 7: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

Anhang 8: Versuch 8

Versuch 8: Westernblot der wnt5a Proteinexpression; wnt5a Expression (45 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.



Versuch 8: Westernblot der Aktin Proteinexpression; Aktin Expression (42 kDA) gemessen mit Immundetektion bei: undiff. = undifferenzierte THP-1 Zellen; PMA = mit PMA zu Makrophagen differenzierte Zellen; LPS/ IL-6/ TNF α = mit PMA zu Makrophagen differenzierte und anschließend mit je 10 ng/ml LPS/ IL-6/ TNF α stimulierte Zellen.

VIII Publikationen

TAGUNGSBEITRÄGE POSTER:

Winkelmann R, Knappe C, Hartmann K, Relling I, Lieb W, Schulte D, Laudes M (2020)
Die Rolle von wnt5a und sFRP5 in der Pathogenese verschiedener chronisch entzündlicher Erkrankungen

Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie. Deutsche Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie. Deutscher Rheumatologiekongress 2020, 48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie (DGORh). sine loco [digital], 09.-12.09.2020. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2020. DocET.02; doi: 10.3205/20dgrh027

IX Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Matthias Laudes** für sein Vertrauen bei der Überlassung dieses Themas und die kompetente wissenschaftliche Betreuung. Seine optimistische Einstellung hat mich trotz mancher Hindernisse stets motiviert.

Herrn **Prof. Dr. med. Dominik Schulte** danke ich für die anregenden Impulse und seine fachkundige Beratung und Unterstützung.

Besonders danken möchte ich **Carina Knappe** für ihre geduldige und fachkompetente Einarbeitung in die Welt des Statistikprogramms R. Sie war mir eine große Hilfe und durch Ihre angenehme Art und vielseitige Unterstützung durfte ich viel lernen.

Katharina Hartmann danke ich für ihre beständige und freundliche Anleitung und Betreuung im Labor. Ein herzliches Dankeschön gilt ihr für jede Hilfe und Extrameile, die nicht selbstverständlich war.

Ich danke **Dr. Isabelle Relling** für die Einarbeitung in die ELISA-Messung.

Kristina Schlicht danke ich für die statistische Beratung und **Kathrin Tuerk** für die organisatorische Zusammenarbeit. Außerdem danke ich der gesamten **AG Laudes** für den wissenschaftlichen Austausch.

Der herzlichste Dank gilt **meinen Eltern**, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich in jedem Schritt mit praktischer Hilfe und ihren Gebeten unterstützt haben. Außerdem danke ich meiner **Großmutter** für ihre Ermutigung und meinem **Bruder** für sein offenes Ohr.

Meinem besten Freund **Dr. med. Carsten Haasis** möchte ich danken, dass er mit mir gemeinsam dieses Studium und damit die Grundlage dieser Dissertation gemeistert hat.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Frau **Katrin Winkelmann** für ihre liebevolle und fröhliche Unterstützung danken. Vielen Dank für jede gemeinsame Labor- und Schreibpause und jede Aufmunterung in dieser Zeit.

X Erklärung

Hiermit versichere ich, Ruben Raphael Winkelmann, geboren am 06.05.1992 in Cuxhaven, dass die vorliegende Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die Arbeit selbstständig angefertigt. Ich erkläre hiermit, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde oder befunden habe. Die Arbeit hat weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Augsburg, den

(Ruben Raphael Winkelmann)