

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Differenzierungsabhängige Expression des Proteinase-aktivierten Rezeptor 2

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Lars Hendrik Gerken

aus Stade

Hamburg 2009

Mit Beschluss des Fachbereichsrats vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg posthume Verleihung am 28. Oktober 2009

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. S. Böhm

Korreferent: PD Dr. L. Hellmeyer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	3
2. <u>Material</u>	7
2.1. Material Zellkultivierung	7
2.2. Material Phospat-Puffer-Lösung (PBS, Phosphate-buffer-solution)	8
2.3. Material Zelldifferenzierungsmodelle HT29, Caco2, hBrie380i, IEC6	8
2.4. Material Krypte-Villus Isolation Maus und Mensch	9
2.5. Material RNA Isolation	10
2.6. Material cDNA-Synthese	11
2.7. Material Taq Man Assay	12
2.8. Material DPPIV- und Gesamtprotein-Assay	16
3. <u>Methoden</u>	18
3.1. Verwendete Zelllinien	18
3.1.1. HT29	18
3.1.2. Caco2	18
3.1.3. hBrie380i	18
3.1.4. IEC6	19
3.2. Methode Zellkultivierung	19
3.3. Methode Herstellung Phospat-Puffer-Lösung (PBS)	20
3.4. Methode Zelldifferenzierungsmodelle	20
3.4.1. Zelldifferenzierungsmodell HT29	20
3.4.2. Zelldifferenzierungsmodell Caco2	21
3.4.3. Zelldifferenzierungsmodell hBrie380i	22
3.4.4. Zelldifferenzierungsmodell IEC6	23
3.5. Methode Krypte-Villus Isolation Maus und Mensch	23
3.6. Methode RNA Isolierung	25
3.7. Methode cDNA-Synthese	26
3.8. Methode Taq Man Assay	27
3.9. Methode DPPIV- und Gesamtprotein-Assay	30
4. <u>Ergebnisse</u>	34
4.1. Ergebnisse HT29	34
4.1.1. Differenzierungsabhängige Genexpression	34

4.1.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität	36
4.2. Ergebnisse Caco2	37
4.2.1. Differenzierungsabhängige Genexpression	37
4.2.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität	39
4.3. Ergebnisse hBrie380i	40
4.3.1. Differenzierungsabhängige Genexpression	40
4.3.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität	41
4.4. Ergebnisse IEC6	42
4.4.1. Differenzierungsabhängige Genexpression	42
4.4.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität	43
4.5. Ergebnisse Ileum Maus	44
4.6. Ergebnisse Colon und Ileum Mensch	45
5. Diskussion	47
5.1. Magen	47
5.2. Dünndarm	48
5.3. Dickdarm	50
5.4. Intestinale Tumoren	52
5.5. PAR2 in anderen Geweben	54
5.5.1. Lunge	55
5.5.2. Haut	57
5.6. Therapieausblicke	58
6. Zusammenfassung	62
7. Literaturverzeichnis	66
8. Verzeichnis der akademischen Lehrer	79
9. Danksagung	80

1. Einleitung

Der unter anderem von intestinalen Epithelzellen exprimierte G-Protein-gekoppelte Proteinase-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) scheint eine wichtige Rolle in der Homöostase des Intestinaltrakts zu spielen.

Obwohl PAR's (PAR- 1,2,3,4) nur eine kleine Untergruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Familie darstellen, sind sie funktionell wichtig, da sie nachgewiesenermaßen bei der Regulation von Inflammation, bei der Zellantwort auf Verletzung, bei Zellwachstum und -entwicklung beteiligt sind und deshalb für Therapieansätze ein interessantes Ziel darstellen (9, 59, 80).

PAR-2 wird u. a. im Pankreas, in der Niere, der Leber, in den Atemwegen und im Ovar exprimiert und wurde in Epithel- und Endothelzellen, in glatten Muskelzellen, in T-Zell- und Tumor-Zelllinien gefunden. Sowohl die physiologische Funktion von PAR-2 in diesen Geweben als auch die Proteasen, die den Rezeptor hier aktivieren, sind nur teilweise bekannt, im intestinalen Lumen ist Trypsin ein potenter Aktivator. Außerdem scheint Mastzelltryptase ebenfalls aktivierend auf PAR-2 einzuwirken.

Durch Trypsin-Aktivierung von PAR-2 wird zum Beispiel die Generation des second messengers Inositol 1,4,5-Triphosphat sowie die Freisetzung von Ca^{2+} ausgelöst. Weiterhin resultiert die PAR-2 Aktivierung in der Synthese und Freisetzung von Arachidonsäure und Prostaglandinen sowie der Aktivierung von Phospholipase C- β . Prostaglandine z.B. funktionieren im Intestinum in parakriner und autokriner Weise, sie regulieren dort den epithelialen Transport, Darmmotilität, Wachstum und Blutfluss und sind Mediatoren bei Inflammation und Zytoprotektion (9, 42).

Aktivierung von PAR-2 hat auch einen unmittelbaren Einfluss auf Darmmyozyten, spontane Kontraktionen werden gehemmt, dies wurde bereits an Kolonmyozyten der Ratte gezeigt (17).

Des Weiteren stimuliert PAR-2 die Proliferation von Endothelzellen, außerdem induziert PAR-2 eine Endothel-abhängige Relaxation von Koronararterien und glatten Muskelzellen der Aorta (Ratte), was zu Hypotension führt.

Von Interesse ist auch, dass PAR-2 von diversen Tumorzelllinien (Lunge, Kolon, Pankreas) extrem hoch exprimiert wird (9).

Unter der Annahme, dass differenzierte Epithelzellen im Intestinaltrakt die hauptsächliche Regulation von Stoffwechselforgängen leisten, bei der Antwort auf Infektion bzw. Schädigung zum Großteil beteiligt sind und damit

Informationsvermittler und reaktive Einheit auf äußere und innere Reize darstellen, war in diesem Zusammenhang unser Interesse, die Expression von PAR-2 dieser Zellen als wichtigen Rezeptor bei den oben genannten Vorgängen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zelle näher zu beleuchten.

Im gesamten Gastrointestinaltrakt (Magen-Dünndarm-Dickdarm) übernehmen, wie schon oben erwähnt, differenzierte Epithelzellen je nach Lokalisation eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen und Aufgaben, die für die Homöostase essentiell sind. Im Allgemeinen entstehen diese Zellen durch einen Differenzierungsprozess aus einer Stammzellpopulation, die im unteren Teil der Krypte gelegen ist. Dieser Prozess vollzieht sich bis zur Villusspitze und bringt je nach Gewebe unterschiedliche differenzierte Zellarten hervor (35, 60): im Magen (wobei hier nicht von Villus oder Krypte sondern von Foveola gesprochen wird) im wesentlichen schleimproduzierende Nebenzellen, säureproduzierende Belegzellen, pepsinogenproduzierende Hauptzellen sowie enteroendokrine Zellen, die u. a. Serotonin, Somatostatin, vasointestinales Polypeptid, Gastrin und ein bombesinähnliches Peptid sezernieren (75).

Die Epithelzellen im Dünndarm setzen sich vereinfacht dargestellt aus vier verschiedenen Populationen zusammen: Enterozyten (gelegen entlang der Krypte-Villus-Achse, wesentliche resorbierende Zelle), Becherzellen (obere zwei Drittel der Krypten, schleimproduzierend), Paneth-Körnerzellen (unteres Drittel der Krypten, proteinsezernierend (z.B. Defensine)) und endokrinen Zellen (unteres Kryptendrittel, aber auch weiter oben in den Villi, sezernieren u. a. Serotonin, Enteroglukagon, Somatostatin, Sekretin, Gastrin, Motilin und vasoaktives intestinales Peptid). Die Vermehrung von Stammzellen füllt laufend den Vorrat der anderen Zellen auf, da die Zellen einem raschen Umsatz unterliegen und an der Villusspitze nur eine Lebensdauer von etwa 5 Tagen haben (76).

Das auf Schleimproduktion und Rückresorption von Wasser und Salzen eingerichtete Dickdarmepithel besteht nach Differenzierung aus der an der Kryptenbasis gelegenen Stammzellpopulation aus Saumzellen (Salz –und Wasserresorption) und mucusproduzierenden Becherzellen, sowie endokrinen Zellen, deren Granula unter anderem Chromogranin, Substanz P, Somatostatin und Glukagon enthalten (77).

Diese Aufzählung gibt nur einen kleinen Ausblick auf die vielfältigen Möglichkeiten und unterschiedliche Richtungen bei der Differenzierung aus der Stammzellpopulation, sowie auf die verschiedenen Funktionen bzw. Aufgaben der differenzierten Zellen und zeigt die Komplexität der oben erwähnten Homöostase.

Wir postulieren daher, dass PAR-2 aufgrund seiner beschriebenen Funktionen besonders im differenzierten Kompartiment der Krypte-Villus-Achse und in differenzierten Zellen im Zellkultorexperiment exprimiert wird und wollten dies nachweisen.

Dazu wurden verschiedene Zelllinien (HT29, Caco2, IEC-6, hBRIE 380), die alle intestinalen Ursprungs sind, in unterschiedlichen Ansätzen in Zellkultur-Modellen zur Differenzierung angeregt und danach mittels quantitativer PCR die Genexpression von PAR-2 in den undifferenzierten und nach dem Experiment differenzierten Zellen nachvollzogen.

Außerdem erfolgte auch anhand von durch Biopsie bzw. Präparation gewonnener Gewebeproben aus dem humanen Intestinaltrakt (Colon und Ileum) und dem Dünndarm (Ileum) der Maus eine Darstellung der zelldifferenzierungsabhängigen Genexpression von PAR-2 entlang der Krypte-Villus-Achse.

Als typischer Differenzierungsmarker für die Enterozytendifferenzierung wurde Sucrase-Isomaltase (hsSI) verwendet, ein Gen, welches bekanntermaßen spezifisch im differenzierten Kompartiment der intestinalen Krypte-Villus Achse exprimiert wird (78), außerdem das Homeobox-Gen Cdx2, dessen Überexpression in z.B. Caco2-Zellen eine hsSI-Stimulation und eine Hochregulierung von Molekülen, die in Zell-Zell- und Zell-Substratumprozessen sowie in Transduktionsprozessen involviert sind, bewirkt: E-Cadherin, Integrin- β 4 Subunits, Laminin γ 2 Ketten, hemidesmosomales Protein, APC, und α -Aktinin (23, 31, 47, 78). Diese Moleküle werden zumeist in vivo von differenzierten Villusenterozyten, weniger in den Kryptenzellen exprimiert. Cdx2 ist somit ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression und Aktivierung zum Anschalten eines Differenzierungsprogrammes führt (47, 78).

Neben der Bestimmung der Genexpression wurde weiterhin mit dem Wissen, dass höher differenzierte Zellen eine vermehrte Enzymaktivität aufweisen, mittels eines Enzym-Assays die Aktivität der Bürstensaumpeptidase Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) in den Zellkultorexperimenten bestimmt.

DPPIV ist ein Enzym, welches besonders im Dünndarm, in der Lunge und in der Niere exprimiert wird und an diversen Prozessen Teil nimmt, dazu zählen unter anderem Hydrolyse von renalen Peptiden, Hormonaktivitätsmodulation, Verdauung sowie Interaktion mit der Thymozytenaktivierungskaskade.

Im Intestinaltrakt kann man verfolgen, dass DPPIV sieben mal höher in den Villusenterozyten als in den Krypten exprimiert wird und auch im Zellmodell zeigt sich

die DPPIV-Aktivität nach einer z. B. bei HT29 durch Natriumbutyrat induzierten Differenzierung erhöht. Somit stellt dieses Enzym einen Differenzierungsmarker dar und wurde deshalb von uns zur Stützung unserer Ergebnisse herangezogen (6).

2. Material

2.1. Material Zellkultivierung

Produkt	Firma	Katalog-/ Art.-/ Bestell-/ Lot.- Nr.
HT-29	DSMZ, Dr. H. G. Drexler, Braunschweig, Deutschland	
Caco-2	Prof. A. Bacher, Technische Universität München, Deutschland	
IEC-6	ATCC (CRL 1592) Rockville, Maryland, USA	
hBRIE 380	Prof. G. Aponte, University of California, Berkeley	
LaminAir HB 2448 Arbeitsbank	Heraeus	
Cellstar Pipetten 2ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 310104
Cellstar Pipetten 5ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 101102
Cellstar Pipetten 10ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 260103
Pipetboy acu Pipettierpumpe	IBS Integra Biosciences	Art. Nr. 155017
Disposable Cell Scraper	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 541070
Cellstar PP-Testtubes 50ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 227261
Neubauer-Zählkammer	Heinz Herenz Medizinalbedarf GMBH	Art. Nr. 1080340
Eppendorf Pipette 1-10µl	s. u.	s. u.
Cellstar Tissue Culture Flasks, 75 cm ² , 250 ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 658170
Filtertips, 10E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 765288
Phosphate-buffer-solution = Phosphat-Puffer-Lösung (PBS)	s. Material PBS	s. Material PBS
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH	Art. Nr. L 11-004

Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus	
Mikroskop Olympus CK2	Olympus	
McCoy's 5A Medium	GIBCO Invitrogen Corporation	Kat. Nr. 26600-023, Lot. 3072937
SERA Plus FBS	PAN Biotech GmbH	Kat. Nr. 3702 P 221107, Lot. P221107
Earle`s MEM	PAA Laboratories	Kat. Nr. E 15-825, Lot. E05822-630
NEAA MEM (100x) Non-Essential Amino Acids	GIBCO Invitrogen Corporation	Kat. Nr. 11140-035, Lot. 3066694
Dulbecco's MEM	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. 5796, Lot. 111 K 2396
Glucose 40	Braun	CH. B. 124 1C17
H-Insulin 100	Hoechst AG	PZN 7800382, Zul. Nr. 18197.00.00
Iscove's modified Dulbecco's medium	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. I7633
Penicillin/Streptomycin	paa laboratories GmbH	Kat. Nr. P 11-010
L-Glutamin	Biochrome AG	Kat. Nr. K 0282
CO ₂ Inkubator 160/160k	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH	

2.2. Material Phosphate-buffer-solution (PBS)

Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	Merck	Kat. Nr. 6580
Destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. 07-6061
Verschraubbare Flasche, 1l	Schott AG	
Tischautoklav System D150	Systemec GmbH	

2.3. Material Zelldifferenzierungsmodelle HT29, Caco2, hBrie380, IEC-6

Natrium Butyrat (Sodium Butyrate)	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. B5887
Isopropyl-β-D-	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. I6758

Thiogalacto-Pyranoside (IPTG), 1g		
Kollagen beschichtete Kulturflaschen: Collagen I Coated EasyFlasks 75cm ²	Nunc	Kat. Nr. 132707

2.4. Material Krypte-Villus Isolation Maus und Mensch

Mäuse		
Biopsieproben Krypte und Villus Ileum (Mensch)		
Biopsieproben Krypte basal, medial und apikal Colon (Mensch)		
Kohlenmonoxid	Air Liquide Deutschland GmbH	
Kunststoffkäfig	Indulab AG	
Chirurgische Pinzette	HCI GmbH	
Schere (z.B. Toennis Präp Schere)	HCI GmbH	
Feather Disposable Scalpel No. 20 (Skalpell)	Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan	Lot. 06102670
Phosphate-buffer-solution (PBS)	s. Material PBS	s. Material PBS
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. D5545
Becherglas 50ml hohe Form	Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH	Art. Nr. 380-251
Meßzylinder hohe Form 100ml/ 500ml	Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH	Art. Nr. 380-220
Meßzylinder hohe Form 500ml	Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH	Art. Nr. 380-230
HBSS (Hanks Balanced Salt solution)	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. H6648
EDTA	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. 2854

Schüttelplatte Rocker	MIDI-	G. Kisker GbR	Kat. Nr. L026
Cellstar 50ml	PP-Testtubes	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 227261
Vortexer		s.o.	s.o.
Tryptanblau (Tryptan Blue solution)		Sigma-Aldrich	Kat. Nr. 93595
Mikroskop Olympus CK2		Olympus	
Zentrifuge Labofuge 400e		Heraeus	
RLT Lysis Buffer (45 ml)		Quiagen	Mat. 1015750
βMeEtOH 50ml		Merck	ZA 1573506-541

2.5. Material RNA Isolation

Produkt	Firma	Katalog-/ Art.-/ Bestell-/ Lot.- Nr.
Cellstar Pipetten 2ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 310104
Cellstar Pipetten 5ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 101102
Cellstar Pipetten 10ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 260103
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences	Art. Nr. 155017
Filtertips, 10E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 765288
Filtertips, 100E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 772288
Filtertips, 1000E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 750288
Eppendorf Pipette Eppendorf Reference®, variabel 0,5–10 µl	Eppendorf	Bestell- Nr. 4910 000.018
Eppendorf Pipette Eppendorf Reference®, variabel 10–100 µl	Eppendorf	Bestell- Nr. 4910 000.042
Eppendorf Pipette Eppendorf Reference®, variabel 100–1000 µl	Eppendorf	Bestell- Nr. 4910 000.069
Cellstar Tissue Culture Flasks, 75 cm ² , 250 ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 658170

Cellstar TC-plate 6 Well	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 657160
Phosphate-buffer-solution	s. Material PBS	s. Material PBS
Disposable Cell Scraper	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 541070
Cellstar PP-Testtubes 50ml	greiner bio-one GmbH	Kat. Nr. 227261
Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus	
RNeasy Mini Kit (50)	Quiagen	Kat. Nr. 74104
70% Ethanol absolut	AppliChem GmbH	Bestell- Nr. A3699,1000
RNase Free DNase Set	Quiagen	Kat. Nr. 79254
QIAshredder (50)	Quiagen	Kat. Nr. 79654
Reaktionsgefäße (500 Stck.) 1,5ml	Sarstedt	No./REF 72.690
2-Mercaptoethanol 50ml	Merck	Bestell- Nr.1.15433.0050
LaminAir HB 2448 Arbeitsbank	Heraeus	

2.6. Material cDNA-Synthese

Produkt	Firma	Katalog-/ Bestell-/Lot.-/ Art. Nr.
Genova Life Science Photometer	Landgraf	Bestell- Nr. 636736001
Mikro-Quarzküvette	Hellma	Bestell- Nr. 105.202-QS
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas	Kat. Nr. #K 1622
Reaktionsgefäße (500 Stck.), 500µl	Sarstedt	Nr./REF 72.690
Landgraf Thermocycler Varius V	Landgraf	
Water, Molecular Biology Grade, 1l	Eppendorf	Order.No. 0032006.1599
Eppendorf Pipette Eppendorf Reference®, variabel 0,5–10 µl	Eppendorf	Bestell-Nr. 4910 000.018

Eppendorf Pipette Eppendorf Reference®, variabel 10–100 µl	Eppendorf	Bestell-Nr. 4910 000.042
Eppendorf Pipette Eppendorf Reference®, variabel 100–1000 µl	Eppendorf	Bestell-Nr. 4910 000.069
Filtertips, 10E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 765288
Filtertips, 100E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 772288
Filtertips, 1000E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 750288
Vortexer MINI-Vortex	G. Kisker GbR	Kat. Nr. L023
Tischzentrifuge kompakt BB3V	Thermo Electron Corporation	
Zentrifuge A14	Thermo Electron Corporation	

2.7. Material Taq Man Assay

Produkt	Firma	Katalog-/ Art.-/ Bestell-/ Lot.- Nr.
96 Well Optical Reaction Plate	ABI Prism, PE Biosystems	Part. Nr. 4306737
Micro Amp, optical caps	Perkin Elmer, Applied Biosystems Divisions	Part. Nr. N801-0935
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	ABI Prism	
Zentrifuge A14	Thermo Electron Corporation	
Eppendorf Pipetten 0,5- 1000µl	Eppendorf	s. o.
Filtertips, 10E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 765288
Filtertips, 100E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 772288
Filtertips, 1000E	greiner bio-one GmbH	Art. Nr. 750288
individuell hergestellte Primer und Probes	Sigma-Aldrich	

<p>hsPAR2 Forward</p> <p>Primer(Human):</p> <p>Name: hPAR2 222F</p> <p>Sequenz:</p> <p>CATCCAAGGAAC</p> <p>CAATAGATCCTCT</p>	Sigma-Aldrich	
<p>hsPAR2 Reverse</p> <p>Primer(Human):</p> <p>Name: hPAR2 320R</p> <p>Sequenz:</p> <p>ACTGTTTCAACT</p> <p>GTAACCTCTTTTCCA</p>	Sigma-Aldrich	
<p>hsPAR2 Probe(Human):</p> <p>Name: hPAR2 264T</p> <p>Sequenz:</p> <p>TGGTAAGGTTGA</p> <p>TGGCACATCCCACG</p>	Sigma-Aldrich	
<p>rnPAR2 Forward</p> <p>Primer(Ratte):</p> <p>Name: rnPAR2-6F</p> <p>Sequenz:</p> <p>AAGTCTCAGCCTGGC</p> <p>GTGG</p>	Sigma-Aldrich	
<p>rnPAR2 Reverse</p> <p>Primer(Ratte):</p> <p>Name: rnPAR2-121R</p> <p>Sequenz:</p> <p>TGCCAATCAGAC</p> <p>TTCTCCCTTTAC</p>	Sigma-Aldrich	
<p>rnPAR2 Probe(Ratte):</p> <p>Name: rnPAR2-56T</p> <p>Sequenz:</p> <p>CGGCCTCCTGCAACC</p> <p>GGACC</p>	Sigma-Aldrich	

<p>hsCdx2 Forward Primer (Human): Name: hsCDX2-20F Sequenz: AGTGGATGCGGAAGC CG</p>	Sigma-Aldrich	
<p>hsCdx2 Reverse Primer(Human): Name: hsCDX2-134R Sequenz: AACTCCTTCTCCAGC TCCAGC</p>	Sigma-Aldrich	
<p>hsCdx2 Probe(Human): Name: hsCDX2-43T Sequenz: CAGTCCCTCGGCAGC CAAGTGAA</p>	Sigma-Aldrich	
<p>mmCdx2 Forward Primer(Maus): Name: mmCDX2-4F Sequenz: CGAAACCTGTGCGAG TGGAT</p>	Sigma-Aldrich	
<p>mmCdx2 Reverse Primer(Maus): Name: mm/rnCDX2- 113R Sequenz: AGCCGCTGATGGTCT GTGTAC</p>	Sigma-Aldrich	
<p>mmCdx2 Probe(Maus): Name: mmCDX2-29T Sequenz: AGCCCGCGCAGCAGT</p>	Sigma-Aldrich	

CCCTAG		
rnCdx2 Forward Primer(Ratte): Name: rnCDX2-4F Sequenz: CGAAACCTTTGTGAA TGGATGA	Sigma-Aldrich	
rnCdx2 Reverse Primer(Ratte): Name: mm/rnCDX2-113R Sequenz: AGCCGCTGATGGTCT GTGTAC	Sigma-Aldrich	
rnCdx2 Probe(Ratte): Name: rnCDX2-28T Sequenz: AAGCCAGCTCAGCCG TCCCTAGGAAG	Sigma-Aldrich	
hsSI Forward Primer(Human) Name: hsSI-23F Sequenz: CATTCCAGAACAATT CCCAACA	Sigma-Aldrich	
hsSI Reverse Primer(Human) Name: hsSI-113R Sequenz: GAAGCACCAAGGAA TAAGAGAGTCAT	Sigma-Aldrich	
hsSI Probe (Human) Name: hsSI-56T Sequence:	Sigma-Aldrich	

TGCACAGAGAGGCTG CTGCTGGAG		
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	Part. Nr. 4304437
Reaktionsgefäße (500 Stck.) 1,5ml	Sarstedt	No./REF 72.690
Water, Molecular Biology Grade, 1l	Eppendorf	Bestell- Nr. 0032006.1599
Ribosomal 18s (20x)	PE Applied Biosystems	Part Nr. 4310875
ZIP Diskette,100MB	Iomega	

2.8. Material DPPIV- und Gesamtprotein-Assay

Dispergier- und Homogenisiersystem Micra D-1 Antrieb	G. Kisker GbR	Kat. Nr. L080
Aufsatz DS-5/SK Zahnkranz 5mm	G. Kisker GbR	Kat. Nr. L080-20
Aufsatz DS-8/P Zahnkranz 8mm	G. Kisker GbR	Kat. Nr. L080-100
Protein Standard II BSA (Bovine serum albumin)	Bio-Rad	Kat. Nr. 500 0007
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	Kat. Nr. 500 0006
Tris[hydroxymethyl]- amino-methan	Bio-Rad	Kat. Nr. 161-0716
Mannitol	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. M9546
Destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. 07-6061
Salzsäure (Hydrochloric Acid), 1 mol/l (1N)	Merck	UN-Nr. 1789
pH-Meter Basic Meter PB-11 P11	Sartorius AG	
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. P7626

2-Propanolol	Riedel-de Haen	UN-Nr. 1219
Nunclon Surface 96 Well Plate	Nunc	Kat. Nr. 167008
TCA (Trichloroacetic acid) Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. T9159
Gly-Pro 4-methoxy- β -naphthylamide	Sigma-Aldrich	Kat. Nr. G9137
Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System	Bio-Rad	Kat. Nr. 170-6930
Glasröhrchen z.B. Zentrifugengläser 98x17mm	Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH	Art. Nr. 380-140

3. Methoden

3.1. Verwendete Zelllinien

3.1.1. HT-29

Bei HT-29 handelt es sich um eine Zelllinie, die 1964 aus einem als gut differenziertem Grad I Karzinom beschriebenen Kolon-Adenokarzinom einer 44-jährigen Frau isoliert wurde (27). Die Zelllinie ist über Dr. H. G. Drexler, DSMZ, Braunschweig, Deutschland zu beziehen.

HT-29 sind adherente Epithelzellen und wachsen als Monolayer in großen Kolonien. Als Kulturmedium wird 90%iges McCoy's 5A Medium mit 10% SERA Plus FBS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Mit Hilfe von Trypsin und EDTA werden die Zellen alle 3-6 Tage in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:5 gesplittet. Bei jeder Passage sollten zwischen $0,1 \cdot 10^5$ und $0,2 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät werden. HT-29 finden bei 37°C mit einem CO₂-Anteil von 5% im Inkubator optimale Wachstumsbedingungen vor. Die Verdopplungsrate der Zellen beträgt 40-60 Stunden.

3.1.2. Caco-2

Bei Caco-2 handelt es sich ebenfalls um eine Kolon-Adenokarzinom Zelllinie, 1974 isoliert aus dem Adenokarzinom eines 72 Jahre alten Mannes (4, 28, 66). Verwahrt wird die Zelllinie von Herrn Prof. A. Bacher, Technische Universität München, Deutschland. Diese Epithelzellen wachsen nach dem Splitten zunächst in kleinen Kolonien. Die Zellen werden in 80% Earle's MEM mit 20% SERA Plus FBS und als Zusätze 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Non Essential Aminoacids (NEAA MEM (100x)) und 1% L-Glutamin kultiviert. Die Zellen wachsen langsam und werden bei Konfluenz 1 zu 6 bzw. 1 zu 10 alle 5-7 Tage mit Hilfe von Trypsin und EDTA gesplittet. Falls die Zellen stark an der Oberfläche der Kulturflasche haften, kann zum Splitten ein Zellschaber erforderlich sein. Es sollten ca. 1×10^6 Zellen/80 cm² in 10 ml Medium ausgesät und bei 37°C mit 5%igem CO₂-Anteil inkubiert werden. Die Verdopplungsrate beträgt bei Caco-2 ca. 80 Stunden.

3.1.3. hBRIE 380i

Es handelt sich bei hBRIE 380i um hybridisierte intestinale Epithelzellen der Ratte, die uniform kubisch wachsen und mit Microvilli besetzt sind. Sie enthalten Villin und werden durch Zellkontakt im Wachstum gehemmt. Sie benötigen einen Untergrund, an dem sie sich verankern können.

Die Zelllinie wird von Prof. G. Aponte, University of California, Berkeley verwahrt.

Die Epithelzellen wachsen als adhärenter Monolayer im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ unter Verwendung von 90% Iscove's modified Dulbecco's Medium mit 10% SERA Plus FBS sowie 1% Penicillin/Streptomycin.

Mit Hilfe von Trypsin und EDTA werden die Zellen alle 3-6 Tage in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:5 gesplittet, dabei sollten ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen /80cm² pro Passage ausgesät werden (3, 7, 42).

3.1.4. IEC-6

IEC-6 sind Epithelzellen, gewonnen aus dem Dünndarm von gesunden Ratten, die Kollagen und Fibronectin synthetisieren. Sie wachsen nicht stetig, sondern gehen nach ca. 10-15 Verdopplungen ausgehend vom Zellstock zu Grunde (61). Die Zelllinie wird verwahrt von ATCC (CRL 1592) Rockville, Maryland, USA.

Die transparenten polymorphen Epithelzellen wachsen als adhärenter Monolayer im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Kultiviert werden IEC-6 in einen Gemisch aus 90% Dulbecco's MEM mit 4.5 g/L Glucose und 10% SERA Plus FBS und 0.1 U/ml Insulin sowie 1% Penicillin/Streptomycin. Die konfluenten Kulturen werden zweimal pro Woche 1:2 bis 1:6 mit Hilfe von Trypsin/ EDTA gesplittet, dabei sollten ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen /80cm² pro Passage ausgesät werden. IEC-6 haben eine Verdopplungsrate von ca. 50 Stunden.

3.2. Methode Zellkultivierung

Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte müssen unter einer Arbeitsbank durchgeführt werden. Zur Subkultivierung werden Pipetten (2ml, 5ml, 10ml), eine Pipettierpumpe, eventuell Zellschaber, ein 50 ml Tube, eine Neubauer-Zählkammer, Filtertips (10E), eine Eppendorf Pipette mit einem Volumen von 10µl, sowie Kulturflaschen benötigt.

Alle Zelllinien werden jeweils bei Konfluenz gesplittet. Dafür sollten alle verwendeten Nährmedien und Lösungen zuvor einige Minuten bei Raumtemperatur gelagert werden. Das zu verwendende Medium richtet sich nach der Zelllinie (siehe unter verwendete Zelllinien).

Der Zellrasen wird mit Phosphat-Puffer-Lösung (PBS, siehe 3.3., Herstellungsmethode) gewaschen. Dazu werden 5ml PBS auf die Zellen gegeben und anschließend nach kurzem Schwenken der Flasche mit z.B. einer 10ml-Pipette entfernt. Nachfolgend

werden 2ml Trypsin/EDTA hinzugefügt und für ca. 3 Minuten dort bis zum Ablösen der Zellen vom Untergrund belassen. Nach Zugabe von 8ml Medium wird die Zellsuspension anschließend in ein 50 ml Tube transferiert und dann für 3 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400e), danach das überstehende Medium abgesaugt. Das Zellpallet wird in 10ml Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Um die genaue Zellzahl zu ermitteln, werden 10µl der entstandenen Suspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung durchgezählt und auf die Gesamtzellzahl hochgerechnet. Für die nächste Passage werden nun, je nach Zelllinie und verwendetem Zellkulturmaterial, eine bestimmte Zellzahl in einem Endvolumen von 10ml in eine Kulturflasche ausgesät und danach in den Inkubator gegeben. Es empfiehlt sich, ca. alle 2 Tage das entsprechende Medium zu erneuern.

3.3. Methode Phosphat Puffer Lösung (PBS, Phosphate Buffer Solution) - Herstellung

Um eine 0,5 M Phosphat-Puffer Stammlösung (PBS) herzustellen, gibt man in eine passende Flasche 1 Liter Aqua dest. und ergänzt 124,73g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Wichtig ist nun, dass alles durch Schwenken gut gemischt wird.

Da bei Verwendung in der Zellkultur eine 0,1 molare Lösung gebraucht wird, gibt man auf 100ml der 0,5 M Phosphat-Puffer Stammlösung 500ml Aqua dest. und erhält dadurch die gewünschte Molarität.

Im Anschluss muss die Lösung autoklaviert werden.

3.4. Methoden Zelldifferenzierungsmodelle

3.4.1. Methode Zelldifferenzierungsmodell HT-29

In dem Versuch werden HT-29 Epithelzellen zum Differenzieren gebracht. Dies geschieht durch Zugabe von Natrium Butyrat in das Nährmedium (10, 34).

Selbstverständlich müssen die Zellen unter einer Arbeitsbank subkultiviert werden.

Zu Versuchsbeginn werden zunächst in vier Kulturflaschenflaschen jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät.

Die genaue Zellzahl erhält man, indem man 10µl der Zellsuspension mit Hilfe einer 10µl fassenden Pipette in eine Neubauerzählkammer gibt, dann auszählt und danach auf die Gesamtzellzahl hochrechnet.

In der einen Flasche wird zur Kultivierung als Standardmedium Mc Coy's 5A Medium mit 10% SERA Plus FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Non Essential Aminoacids (NEAA) und 1% L-Glutamin verwendet.

Um ein Differenzieren von HT-29 zu bewirken, wird in einem anderen Nährmedienansatz zusätzlich soviel Natriumbutyrat hinzugefügt, dass man einen 1mM-Ansatz erhält.

Zunächst wachsen die frisch ausgebrachten Zellen für 3 Tage in Standardmedium, dann aber muss das Natriumbutyrat-Medium auf eine der Kulturflaschen gegeben werden.

Als Kontrolle läuft eine Passage parallel mit Standardmedium unter sonst gleichen Versuchsbedingungen.

Die Zellen werden nun für 10 Tage bei täglichem Mediumwechsel in einem Inkubator bei 37°C mit 5% igem CO₂-Anteil inkubiert.

Am 10. Tag nach Aussaat müssen die Zellen für die RNA-Isolation, den Gesamtprotein- und den DPPIV-Assay gewonnen werden. Dies geschieht wie folgt:

5ml Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) werden, nachdem das Medium abgesaugt wurde, nacheinander in beide Kulturflaschen gegeben, um den Zellrasen zu waschen und von verbliebenen Mediumresten zu befreien. Diese 5 ml werden wiederum entfernt.

Danach werden erneut 10 ml PBS hinzugefügt und mit Hilfe von Zellschabern die Hälfte des Zellrasens vom Flaschenboden in die Flüssigkeit gelöst. Die entstandene Suspension wird in ein 50ml Tube überführt, bei 1200 U/min für 3 Minuten zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt.

Aus dem entstandenen Zellpellet kann nun mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits RNA isoliert werden. Je nach Größe der Zellausbeute kann vorher noch eine Portionierung in kleinere Mengen erfolgen, um ein besseres Resultat bei der RNA-Isolation zu erhalten. Hierzu sollte man vor dem Zentrifugieren die Lösung auf Cups (1,5ml) aufteilen.

Die nächsten Schritte dienen der Gewinnung von Zellmaterial für den DPP4- und Gesamtprotein-Essay (s. u.).

3.4.2. Methode Zelldifferenzierungsmodell Caco-2

In dem Versuch werden Caco-2 Epithelzellen zum Differenzieren gebracht. Dies geschieht, indem die Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen, ohne subkultiviert zu werden, in einer Kulturflasche wachsen und enge Zellkontakte bilden (83).

Zu Versuchsbeginn werden zunächst in 7 Kulturflaschen jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät. Wichtig ist auch hier, dass alle Arbeitsschritte unter einer Arbeitsbank erfolgen.

Die genaue Zellzahl erhält man, indem man 10µl der Zellsuspension in einer Neubauerzählkammer auszählt und dann auf die Gesamtzellzahl hochrechnet.

In den Flaschen wird zur Kultivierung als Standardmedium Earl`s MEM (1x) mit 20% SERA Plus FBS und als Zusätze 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Non Essential Aminoacids und 1% L-Glutamin verwendet.

Die Zellen werden nun für 22 Tage bei täglichem Mediumwechsel in einem Brutschrank bei 37°C mit 5%igem CO₂-Anteil inkubiert.

Am 2., 4., 6., 7., 9., 14. und 21. Tag nach Aussaat werden die Zellen, wie schon im HT29-Experiment beschrieben, für die RNA-Isolation, den Gesamtprotein- und den DPPIV-Assay gewonnen. Die folgenden Arbeitsschritte verhalten sich analog.

3.4.3. Methode Zelldifferenzierung hBRIE 380i

In diesem Versuchsansatz werden hBRIE 380i Epithelzellen zum Differenzieren gebracht. Dies geschieht indem diese Zellen auf dem Boden einer mit Kollagen Typ I beschichteten Kulturflasche wachsen.

Als Kontrolle wird eine Passage parallel mit Standardmedium unter sonst gleichen Versuchsbedingungen ausgebracht.

Natürlich muss auch hier unter einer Arbeitsbank gearbeitet werden.

2*10⁶ Zellen werden bei Start des Experiments mit Hilfe der Neubauerzählkammer jeweils in eine normale Kulturflaschenflasche und eine mit Kollagen Typ I beschichtete Flasche ausgesät.

Zur Kultivierung wird in den zwei Flaschen als Standardmedium Iscove's modified Dulbecco's Medium mit 10% SERA Plus FBS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Bei 2-tägigem Mediumwechsel werden über einen Zeitraum von 14 Tagen die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C mit 5%igem CO₂-Anteil inkubiert.

Am 14. Tag nach Aussaat gewinnt man, wie zuvor in den anderen Differenzierungsexperimenten beschrieben, die Zellen für die RNA-Isolation sowie für den DPPIV- und Gesamtproteinassay in analoger Weise.

3.4.4. Zelldifferenzierungsmodell IEC-6

In dem Experiment werden IEC-6 Epithelzellen zum Differenzieren gebracht. Dies geschieht durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranoside (IPTG) in das Nährmedium.

Als Kontrolle wird eine Passage parallel mit Standardmedium unter sonst gleichen Versuchsbedingungen ausgebracht.

Selbstverständlich muss die Subkultivierung der Zellen unter einer Arbeitsbank erfolgen.

Zu Versuchsbeginn werden zunächst in 2 Kulturflaschen mit Hilfe der Neubauerzählkammer jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät.

Zur Kultivierung wird in zwei Flaschen als Standardmedium DMEM mit 10% SERA Plus FBS, 4.5 g/L Glucose, 0.1 U/ml Insulin und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Zunächst werden die frisch ausgebrachten Zellen für 3 Tage in Standardmedium gehalten, dann aber gibt man auf eine der Flaschen Nährmedium mit 4mM IPTG, um den Differenzierungsvorgang zu initiieren.

Das Medium wird nun 2tägig gewechselt, IPTG nun täglich in gleicher Dosierung auf die Zellen gegeben.

Die übrige Flasche läuft als Kontrolle parallel mit Standardmedium und wird gleichermaßen, aber ohne IPTG, versorgt.

Die Zellen werden nun für 10 Tage in einem Inkubator bei 37°C mit 5%igem CO₂-Anteil inkubiert.

Nach insgesamt 13 Tagen werden die Zellen für die RNA-Isolation, den Gesamtprotein- und den DPPIV-Assay gewonnen. Hier verfährt man analog zu den anderen Differenzierungsexperimenten.

Es empfiehlt sich im Hinblick auf die statistische Aussagekraft, jedes der einzelnen Experimente dreimal zu wiederholen.

3.5. Methode Krypte-Villus Isolation Maus und Mensch

Im folgenden Abschnitt werden die Arbeitsschritte zur Gewinnung von intestinalen Epithelzellen aus humanen und tierischen (hier: Maus) Dünn- oder Dickdarmproben beschrieben. Für unsere Experimente war es wichtig, die gewonnenen Zellen den

Fraktionen Villus (apikal und basal) und Krypte im Dünndarm bzw. apikale und basale Krypte im Dickdarm zuordnen zu können.

Zunächst wird die Präparation von Mäusedärmen beschrieben.

Dies geschieht wie folgt: Eine bestimmte Anzahl von Mäusen wird mit Hilfe von Kohlenmonoxid in einer abgeschlossenen Box getötet. Anschließend eröffnet man die Bauchdecke mittels Skalpell, schneidet dann 1-2cm nach kranial und erweitert den Schnitt nach rechts Richtung Leber und nach links zur Milz. Nach kaudal schneidet man Richtung After und erweitert zu den Hüftgelenken. Jetzt empfiehlt es sich, um den Enddarm besser herauspräparieren zu können, die Beckenschaufeln zu durchtrennen.

Man entfernt vorsichtig den gesamten Darm. Man sollte nun das Präparat in die Dünndarm- und Dickdarmanteile separieren und dann von den anhängenden Gewebeteilen wie Lymph- und Blutgefäße sowie Fett und der Muskelschicht befreien.

Nun eröffnet man den Darm der Länge nach und reinigt ihn grob von Kotresten.

Bei den Versuchen mit humanem Gewebe verwendeten wir durch Biopsie gewonnene Proben, so dass die zuvor beschriebenen Arbeitsschritte hier nicht zur Anwendung kamen. Die folgenden Vorgänge verhalten sich aber analog.

Die Präparate werden mit Phosphat-Buffer-Solution (PBS) zur weiteren Reinigung gespült. Wichtig ist bei den nächsten Arbeitsschritten, dass die Därme jeweils getrennt voneinander bearbeitet werden, damit man das gewonnene Zellmaterial jeweils einer Probe bzw. einer Maus oder einem Patienten zuordnen kann.

Um den auf dem Epithel haftenden Schleim zu entfernen, muss nun das Gewebestück für 15 Minuten bei 37°C in einem mit 10ml PBS/1mM DTT gefüllten Becherglas stark mit Hilfe einer Schüttelplatte geschüttelt werden. Der Überstand wird danach verworfen.

Um das DTT zu entfernen wird erneut mit PBS gespült. Jetzt gibt man den Darm erneut in ein Becherglas und fügt 10ml HBSS/ 2mM EDTA hinzu. Es wird wiederum für 10 Minuten bei 37°C mit 225rpm geschüttelt. Dieser Vorgang lockert die oberflächlichen Strukturen (Villus, Krypte).

Man legt nun 10 ml PBS in ein Falconröhrchen vor, gibt den vorpräparierten Darm hinzu und vortext für 5 Sekunden. Der Darm wird in ein neues Röhrchen überführt. In dem Überstand befinden sich nun die Villusepithelien (Dünndarm) oder apikale Kryptenepithelien (Dickdarm). Ob die Zellen intakt sind, überprüft man, indem man 250µl der Lösung mit 25µl Trypanblau versetzt und auf einen Objektträger gibt. Unter dem Mikroskop sollten nun möglichst wenige blau angefarbte tote Zellen zu sehen sein.

Nun sollte man den Vortexvorgang wiederholen, es sind dann noch einmal Villusepithelien (Dünndarm) bzw. medial gelegen Kryptenzellen (Dickdarm) in der Pufferlösung gelöst.

Um bei Dünndarmpräparaten die Kryptenepithelien bzw. beim Dickdarmpräparat die basalen Kryptenzellen zu lösen, vortext man erneut.

Anzumerken ist, dass die gewonnenen Zellen, um die Apoptose zu verhindern, sofort auf Eis gelagert werden sollten.

Um das Material lagerungsfähig zu machen, zentrifugiert man die Falconröhrchen für 3 Minuten bei 1200 U/min, saugt dann den Überstand ab und gibt zum Schluss eine dem Zellpellet (Anzahl der Zellen) entsprechende Menge von RLT Puffer mit β MeEtOH zur Lysierung hinzu. Das Lysat kann nun bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert werden.

3.6. Methode RNA-Isolierung

Es wird zunächst unter einer Arbeitsbank gearbeitet.

Zu Beginn entfernt man das Medium aus der Zellkulturflasche, wäscht dann den Zellrasen mit 10 ml der zuvor hergestellten 0,1 molaren Phosphat Puffer Lösung (PBS) und saugt jene wiederum ab. Nun werden in die Kulturflasche 5 ml PBS vorgelegt, um dann die Zellen mit einem Zellschaber in diese Lösung zu überführen. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass vom Flaschenende zum Flaschenhals und nicht wieder zurück gearbeitet wird. Die so gewonnenen Zellen werden mit der PBS in ein 50ml Testtube gegeben und für 3 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert.

Bei den folgenden Arbeitsschritten zur RNA-Isolierung wurde ein RNeasy (50) Mini Kit verwendet. Der Überstand wird abgesaugt und auf die Zellen 600 μl RLT Buffer mit 6 μl 2-Mercaptoethanol gegeben. Mit einer Pipette sollte solange gemischt werden, bis eine homogene, klare, zähflüssige Substanz entstanden ist. Diese wird nun auf die Shredder-Säule gegeben und bei 14000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Man verwirft den Einsatz vom Shredder und gibt danach 600 μl 70% Ethanol absolut auf die im Cup verbliebene Lösung. 700 μl von diesem Gemisch werden nun auf die RNase Mini Column gegeben und dann bei 8000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert. Die im Collection Tube befindliche Flüssigkeit muss verworfen werden. Jetzt gibt man den Rest des Ethanol-Gemisches auf die Säule und wiederholt den vorangegangenen Arbeitsschritt. Als nächstes werden 700 μl RW 1Buffer in die Säule pipettiert und dann wieder für 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Man muss nun 10 μl DNase und 70 μl RDD Buffer aus dem RNase Free DNase Set zusammengeben und dann in die

Säule pipettieren. Man beachtet nun eine Wirkzeit von 15 Minuten bei 20 - 30°C. Die Säule wird danach auf ein neues 2ml Collection Tube gegeben, dann mit 500 µl RPE Buffer versehen und nochmals für 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Nun wird für weitere 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Um alle Pufferreste zu entfernen wird nochmals für 1 Minute auf einem neuen Collection Tube bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Säuleneinsatz wird in ein Cup gegeben und mit 50 µl RNase Free Water versehen. Um die RNA aus dem Einsatz zu waschen, wird nochmals für 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Dieses Procedere sollte man wiederholen. Bei zu erwartender geringer RNA-Konzentration kann wahlweise auch mit 2x 25µl Wasser gewaschen werden. Zur Lagerung muss die gewonnene RNA bei -20°C aufbewahrt werden.

3.7. Methode cDNA-Synthese

Zu Beginn wird die genaue RNA-Konzentration des Isolates mittels Photometrie bestimmt. 8µl der gewonnenen RNA und 72µl destilliertes Wasser werden in eine 10mm Mikro-Quarzküvette pipettiert und die Extinktion bei 260nm in einem Photometer gemessen. Die genaue RNA Konzentration berechnet sich aus dem Produkt der zuvor bestimmten Extinktion bei 260nm und dem Faktor 0,4. Aus der errechneten Konzentration ergibt sich das Volumen, welches 2 µg RNA enthält.

Für jede cDNA-Synthese werden 2µg RNA eingesetzt und ein Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet.

Alle folgenden Arbeitsschritte außerhalb des Thermocyclers wurden auf Eis durchgeführt.

Das zuvor bestimmte Volumen mit 2 µg RNA wird in ein 500µl Reaktionsgefäß gegeben und mit deionisiertem Wasser kombiniert. Das so vorläufig erhaltene Volumen aus RNA und Wasser beträgt 11µl. Im nächsten Schritt wird 1 µl Random Hexamer Primer hinzugefügt, das Gemisch nach kurzem Durchrütteln mit Hilfe des Vortexers im Thermocycler für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl Reaction Buffer, 1µl RNase-Inhibitor und 2µl dNTP-Mix im anschließenden Schritt verbleibt das Cup für 15 Minuten bei 25 °C im Thermocycler. Im letzten Arbeitsgang erfolgt nach Addition von 1µl M-MuL Reverse Transcriptase (200U/µl) eine 10minütige Inkubation bei 25°C. Die Synthese schließt sich nun für 60 Minuten bei 42°C an. Durch Aufheizen auf 70°C für 10 Minuten endet die Reaktion. Die bei der Transkription gewonnene cDNA wird dann über Zwischenschritte bis zu einer Verdünnung von 1 zu

3125 mit Wasser versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Man achte auf die exakte Beschriftung der einzelnen Reaktionsgefäße.

3.8. Methode TAQ Man Assay

Zu Beginn des Assays empfiehlt es sich, ein Pipettierschema entsprechend der Reaktionsplatte zu erstellen, um sich während des Pipettiervorganges besser orientieren zu können und etwaige Verwechslungen auszuschließen. Wir verwendeten dazu Microsoft Excel.

Als Beispiel:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Zunächst stellt man einen Mastermix aus 12,5µl TaqMan Universal Mastermix, 2,5µl Forward-Primer, 2,5µl Reverse-Primer, 1µl Probe des nachzuweisenden Gens (PAR2, hsSI, cdx2, 18s) und 1,5µl Wasser her. Dieser Mix reicht genau für ein Tube der Reaktionsplatte, in der der Assay durchgeführt wird. Deshalb kann man entsprechend den Mastermix auf beliebige Mengen erweitern, um Material und Zeit zu sparen. Da die Probes lichtempfindlich sind, empfiehlt es sich, diesen Mix bis zur Benutzung auf Eis in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufzubewahren.

Jetzt pipettiert man 5 µl der zuvor synthetisierten cDNA in jeweils 2 nebeneinander liegende Wells der Reaktionsplatte entsprechend des vor dem Versuchsaufbau des jeweiligen Differenzierungsexperiments erstellten Pipettierschemas und fügt danach 20µl des Mastermixes hinzu.

Um zu gewährleisten, dass sich die eingesetzten Gene in verschiedenen Konzentrationen gleich verhalten, muss, bevor die Genexpression aus den Experimenten gemessen wird, eine Verdünnungsreihe über mindestens 5 Zehnerpotenzen erstellt werden. Es wird

dann für weitere Messungen die Konzentration gewählt, welche gleiches Verhalten für die Genexpression erwarten lässt.

Ist jedes Well gefüllt, verschließt man diese mit den dazu passenden optischen Verschlusskappen. Nun sollte man die gesamte Reaktionsplatte für eine Minute bei 2000 U/min zentrifugieren, um eventuell am Gefäßrand verbliebene Mix- oder cDNA-Reste an den Wellboden zu bringen. Bevor nun die Reaktion im Sequenzer gestartet wird, kontrolliert man noch einmal sorgfältig, ob alle Wells gleichmäßig gefüllt sind, damit bei der späteren Auswertung keine durch Fehlpipettierung bedingten Verfälschungen auftreten.

Anschließend platziert man die Reaktionsplatte in den Sequenzer und nimmt die Einstellung für den Assay vor. Folgende Eingaben garantieren optimale Bedingungen für den Assay:

Initial wird das Gemisch für 2 Minuten auf 50°C aufgeheizt, um eine optimale AmpErase UNG Enzym Aktivität zu gewährleisten. Danach wird für 10 Minuten eine Temperatur von 95°C benötigt um die AmpliTaq Gold Polymerase zu aktivieren. Nun laufen 40 Zyklen hintereinander ab, in denen abwechselnd für 15 Sekunden eine Temperatur von 95°C und dann für 1 Minute eine Temperatur von 60 °C erreicht wird. Bevor man nun die Ergebnisse abliest, sollte man auf einer Zip-Disc alles abspeichern. Die gewonnenen Daten werden nun in einem eigens dafür generierten Programm mittels Microsoft Excel ausgewertet.

Die erhaltenen Daten werden CT Werte genannt. Diese geben den Zyklus wieder, in dem sich das entsprechende Gen durch Änderung der Fluoreszenz vom „Grundrauschen“ der quantitativen PCR abhebt. Der CT Wert eines Gens wurde nun von dem CT Wert des so genannten Houskeeping Gens (hier ribosomale 18s RNA) subtrahiert. Die erhaltenen Differenzen werden nun nochmals von einem Normwert (z.B. gesunder Patient, nicht stimulierte Zelle etc.) subtrahiert und das Ergebnis als Potenz zur Basis 2 gestellt. Die errechnete Zahl ergibt die Erhöhung bzw. Reduktion der Genexpression wieder.

Als Beispiel für die Auswertung der Daten seien hier die Ergebnisse des Maus-Experimentes veranschaulicht:

Maus Probe	CT cdx2	CT cdx2 Mittelwert(MW)	CT 18s RNA	CT 18s RNA Mittelwert (MW)
Krypte I	35,420	36,023	23,001	23,008
Krypte I	36,625		23,015	
Krypte II	35,632	35,632	22,160	22,095
Krypte II	35,632		22,030	
Krypte III	28,798	28,432	16,488	16,376
Krypte III	28,065		16,263	
Villus I	29,929	29,597	17,576	17,719
Villus I	29,265		17,862	
Villus II	31,569	31,581	19,983	20,154
Villus II	31,592		20,325	
Villus III	31,003	30,982	19,592	19,625
Villus III	30,960		19,657	

RNA Isolation	Differenz MWcdx2 und MW 18s RNA	MW Krypte I-III	Differenz (D) MW Krypte I-III und Villus	Exponent der Differenz (D) zur Basis 2
Krypte I	13,015	12,869		1,000
Krypte II	13,537			1,000
Krypte III	12,056			1,000
Villus I	11,878		1,137	2,199
Villus II	11,427		2,111	4,318
Villus III	11,357		0,699	1,623

	Krypte-Villus-MW	Krypte-Villus I	Krypte-Villus II	Krypte-Villus III	Krypte-Villus I-III	Krypte-Villus I-III
RNA Isolation	Mittelwert	Exponent der Differenz (D) zur Basis 2	Exponent der Differenz (D) zur Basis 2	Exponent der Differenz (D) zur Basis 2	Standardabweichung	error of the mean
Krypte	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
Villus	2,713	2,199	4,318	1,623	1,419	0,819

Aus der dreifachen Ausführung des Experimentes erhält man also einen Mittelwert (hier 2,713), der den Faktor darstellt, um den die Genexpression von cdx2 im differenzierten Kompartiment (hier Villus) höher ist. Die Ergebnisse kann man dann in einer Grafik darstellen (s. Ergebnisteil 4.5.).

Alle Daten wurden nach der Erhebung auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Dafür wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, der „error of the mean“, sowie die Konfidenzintervalle für alle erhaltenen Daten erhoben. Für die Gruppenvergleiche

wurde der Student's T-Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Die Signifikanz wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ angenommen. Als hochsignifikant galten p-Werte < 0.001 , als signifikant p-Werte $< 0,05$ mit jeweils entsprechendem 95%-Konfidenzintervall. Alle gemessenen Daten bzw. erhobenen Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant.

3.9. Methode Gesamtprotein- und DPPIV-Assay

Auf die bei der Gewinnung von Material für die RNA-Isolation übrig gebliebene Hälfte des in der Kulturflasche verbliebenen Zellrasens wird nun 4,5ml Tris-HCl/Mannitol-Puffer und 45 μ l Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF) gegeben.

Diese Reagenzien wurden zuvor folgendermaßen hergestellt: Um einen Puffer mit 2mM Tris[hydroxymethyl]-amino-methan und 50mM Mannitol zu erhalten, gibt man 121,14 mg Tris und 4,555g Mannitol in 500ml destilliertes Wasser und titriert durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure (1 mol/l (1N)) die Lösung auf einen pH von 7,2. Um eine gute Vermengung zu erreichen, sollte die Lösung gut geschüttelt werden.

Eine 1mM PMSF-Lösung entsteht durch Hinzufügen von 0,52 mg in 3ml 2-Propanolol. Genau wie im vorherigen Arbeitsschritt bei der RNA-Isolation schabt man nun die verbliebenen Zellen in diese Lösung und überführt jene dann in ein 50ml Tube, welches auf Eis gelagert wird.

Jetzt homogenisiert man die Zell-Pufferlösung mit einem Homogenisiersystem für insgesamt 2x10 Sekunden bei niedriger Intensität, um eine Überwärmung oder Schaumbildung zu vermeiden.

Bis zur Durchführung der Assays kann die Suspension in Reaktionsgefäße (1,5ml) verteilt und bei -70°C gelagert werden.

Zunächst wird der Protein-Assay durchgeführt. Dazu verdünnt man das Protein Assay Dye Reagent Konzentrat 1:5. Von dem Konzentrat werden dann 100 μ l in eine Photometer 96-Well Platte vorgelegt. Daraufhin gibt man nun 5 μ l der Suspension hinzu und misst das ganze dann in einem Spectrophotometer bei 570nm. Eventuell ist eine nochmalige Zugabe von 150 μ l des verdünnten Dye Konzentrats erforderlich. Es wird dann erneut gemessen. Als Standard pipettiert man Bovines Serum Albumin (BSA) in aufsteigender Konzentration (0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 μ l/ml) ebenfalls auf die Platte. Man achte jeweils auf eine Doppelbestimmung.

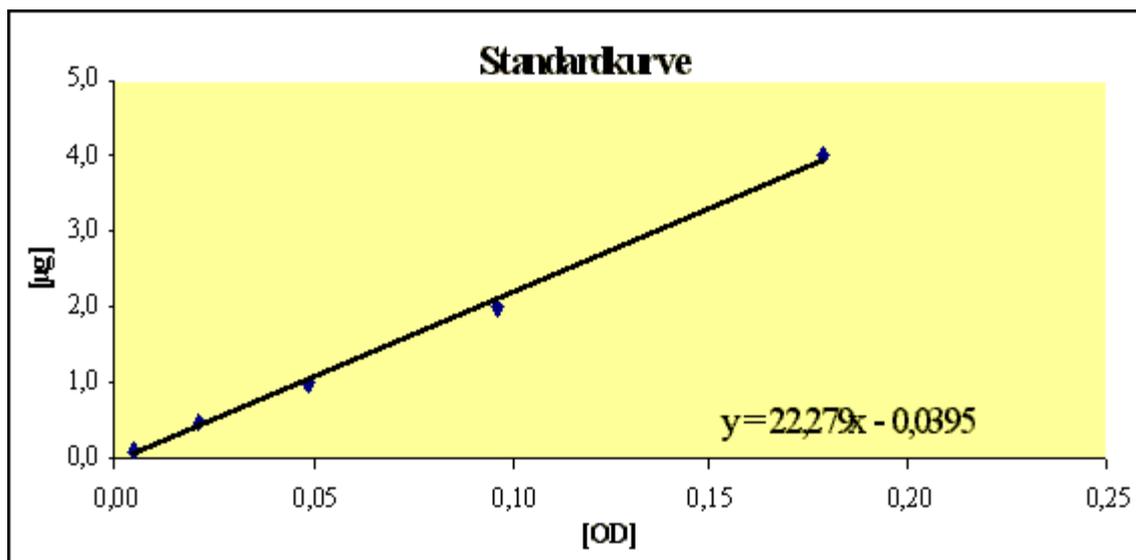
Zur Verdeutlichung sei hier das Pipettierschema für das hBRIE380i Experiment gezeigt, welches an den jeweiligen Versuchsaufbau der einzelnen Versuche angepasst werden muss:

	Standard (BSA)		hBRIE mit Kollagen		hBRIE ohne Kollagen							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1µg/ml	0,1µg/ml	Exp.1	Exp.1	Exp.1	Exp.1						
B	0,5µg/ml	0,5µg/ml	Exp.2	Exp.2	Exp.2	Exp.2						
C	1,0µg/ml	1,0µg/ml	Exp.3	Exp.3	Exp.3	Exp.3						
D	2,0µg/ml	2,0µg/ml										
E	4,0µg/ml	4,0µg/ml										

Exp.1, 2, 3 = hBRIE-Experimente n=3

Durch die Verdünnungsreihe des BSA und die gemessenen OD-Werte erhält man eine Standardkurve und eine Formel, mit deren Hilfe man die Daten aus den Experimenten berechnen kann:

OD1	OD2	Mittelwert[OD]	Konzentration[µg]
0,004	0,006	0,005	0,100
0,018	0,025	0,022	0,500
0,039	0,058	0,049	1,000
0,088	0,105	0,097	2,000
0,174	0,183	0,179	4,000



Die Formel $y=22,279x-0,0395$, die sich aus dem Steigungsdreieck ergibt, wird dann wie folgt mit den Messwerten (Mittelwert [OD]) des Experimentes verwendet:

Zelllinie	Bezeichnung	OD1	OD2	Mittelwert [OD]
hBrie 380i Exp.1	mit Kollagen	0,124	0,136	0,130
hBrie 380i Exp.1	ohne Kollagen	0,131	0,122	0,127
hBrie 380i Exp.2	mit Kollagen	0,098	0,084	0,091
hBrie 380i Exp.2	ohne Kollagen	0,116	0,094	0,105
hBrie 380i Exp.3	mit Kollagen	0,086	0,079	0,083
hBrie 380i Exp.3	ohne Kollagen	0,084	0,087	0,086

Gesamtproteinkonzentration [μg] in 5 μl
$22,279 \cdot 0,130 - 0,0395 = \mathbf{2,857}$
$22,279 \cdot 0,127 - 0,0395 = \mathbf{2,779}$
$22,279 \cdot 0,091 - 0,0395 = \mathbf{1,988}$
$22,279 \cdot 0,105 - 0,0395 = \mathbf{2,300}$
$22,279 \cdot 0,083 - 0,0395 = \mathbf{1,799}$
$22,279 \cdot 0,086 - 0,0395 = \mathbf{1,865}$

Die Ergebnisse geben die Gesamtproteinkonzentration [μg] in den pipettierten 5 μl der Suspension an.

Jetzt wird in Kombination mit den gewonnenen Daten und einer weiteren Messung die DPPIV Aktivität wie folgt bestimmt:

Es empfiehlt sich, zunächst die einzelnen Komponenten für den Assay vorzubereiten. Als erstes wird das Gly-Pro 4-methoxy- β -naphthylamid- Substrat angesetzt.

Danach folgt die Trichloressigsäure(TCA) -Lösung, die die Reaktion stoppen soll. 3,2g TCA werden hierfür in 10ml destilliertes Wasser gelöst, so dass eine 32%ige Stopplösung entsteht.

Zuletzt wird der Tris-Puffer angesetzt. Man gibt 278mg Tris[hydroxymethyl]-aminomethan in 400ml destilliertes Wasser und stellt den Puffer mit Hilfe von Salzsäure (1 mol/l (1N)) auf pH 8,4 ein.

Der sich jetzt anschließende Pipettiervorgang sollte in Doppelbestimmung erfolgen.

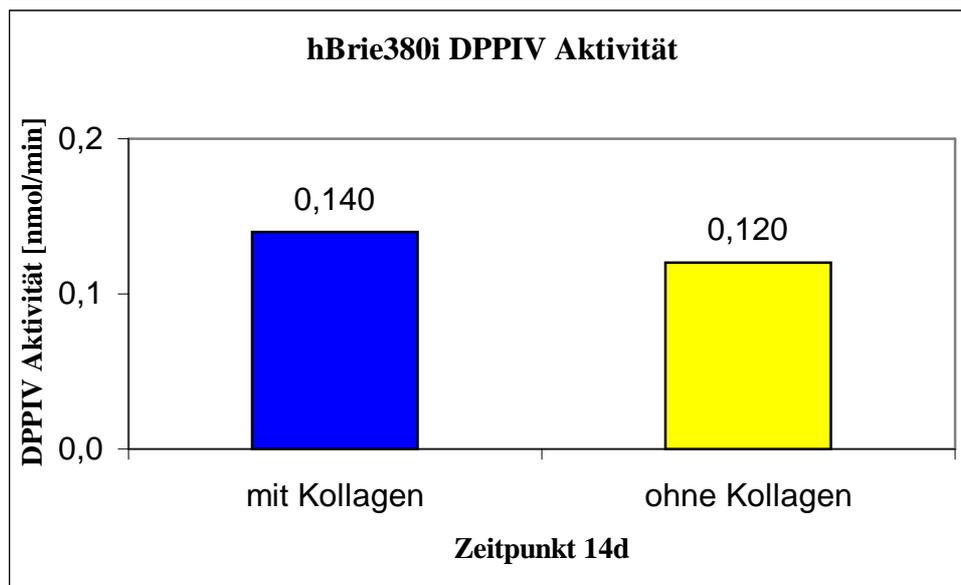
200 μl Tris-Puffer werden in ein Glasröhrchen gegeben, dann folgen 100 μl der homogenisierten Zellsuspension. Durch Zugabe von 100 μl des Gly-Pro 4-methoxy- β -naphthylamid- Substrates startet die Reaktion. Nach 20 Minuten beendet man den Vorgang mit 50 μl der 32%igen TCA- Lösung. Das Gemisch wird kurz gevortext, um

dann 200µl davon in ein Well der Photometer 96 Well Platte zu pipettieren und in einem Photometer bei 570nm den Endpunkt der Reaktion zu bestimmen. Die Ergebnisse geben die DPPIV-Aktivität in nmol/min an.

Diese gewonnenen Daten werden dann mit den Ergebnissen des Protein- Assays kombiniert:

Gesamtprotein-konzentration [µg] in 5µl	Gesamtprotein-konzentration [µg /100µl Probe]	DPPIV Aktivität [nmol/min/100µl]	DPPIV Aktivität [nmol/min/µg]	Mittelwert DPPIV Aktivität [nmol/min/µg]	Standardabweichung	Error of the mean
2,857 (mit Kollagen)	57,135	8,192	0,143	0,137 (mit Kollagen)	0,017	0,010
2,779 (ohne Kollagen)	55,576	7,410	0,133	0,119 (ohne Kollagen)	0,023	0,013
1,988 (mit Kollagen)	39,758	5,982	0,150			
2,300 (ohne Kollagen)	45,996	6,020	0,131			
1,799 (mit Kollagen)	35,970	4,248	0,118			
1,865 (ohne Kollagen)	37,307	3,467	0,093			

Zur Veranschaulichung werden die Ergebnisse in eine Grafik eingefügt:

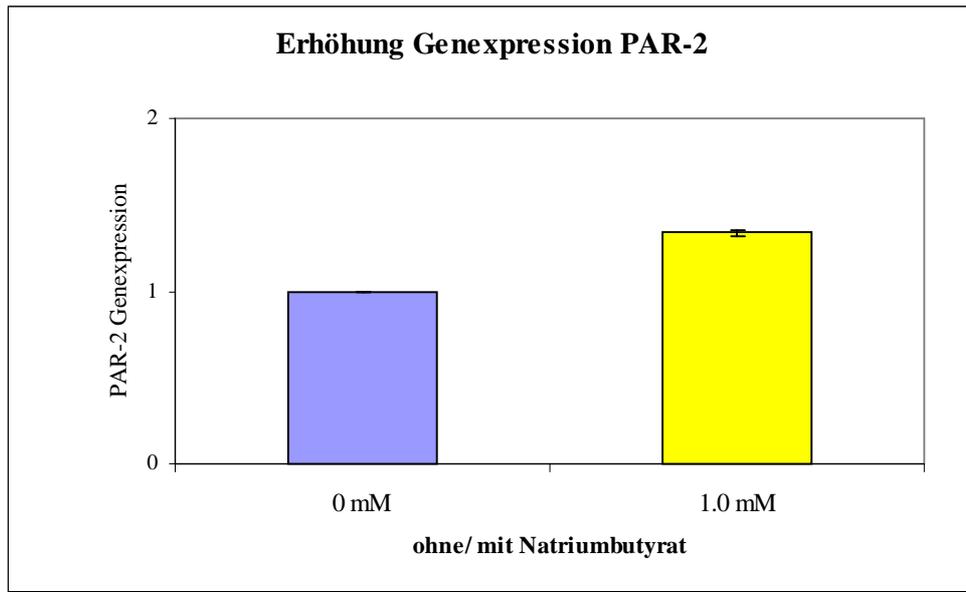


4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse HT29

4.1.1. Differenzierungsabhängige Genexpression

Die mit Natriumbutyrat substituierten Zellen zeigen nach 10 Tagen eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) 1,3fach höhere PAR-2-Genexpression.



Zelllinie: HT29

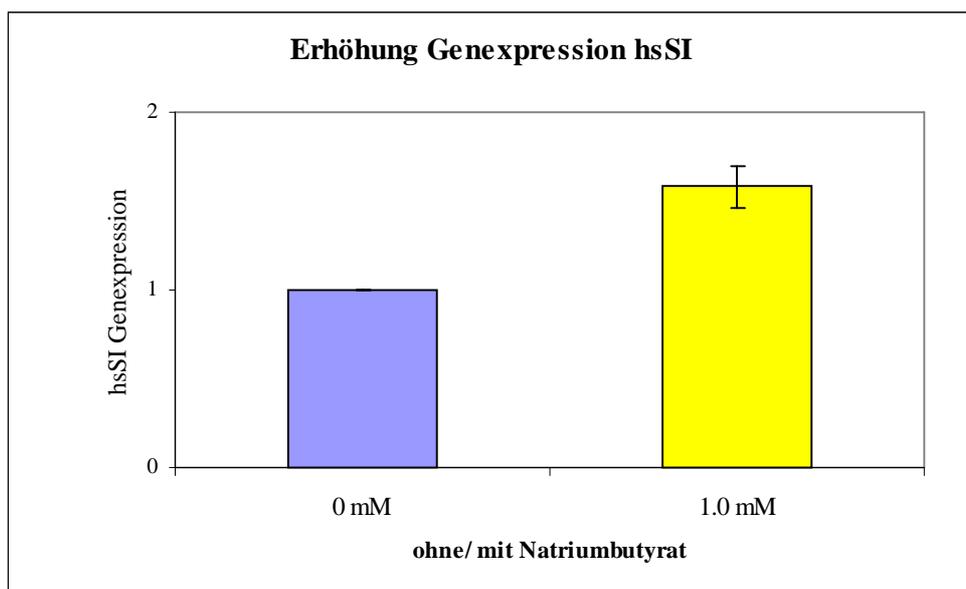
Anzahl der Ansätze: n=3

$p < 0,05$

Abb. 1

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchdauer in Tagen: d=10

Die mit Natriumbutyrat substituierten Zellen zeigen nach 10 Tagen eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) 1,6fach höhere hsSI-Genexpression.



Zelllinie: HT29

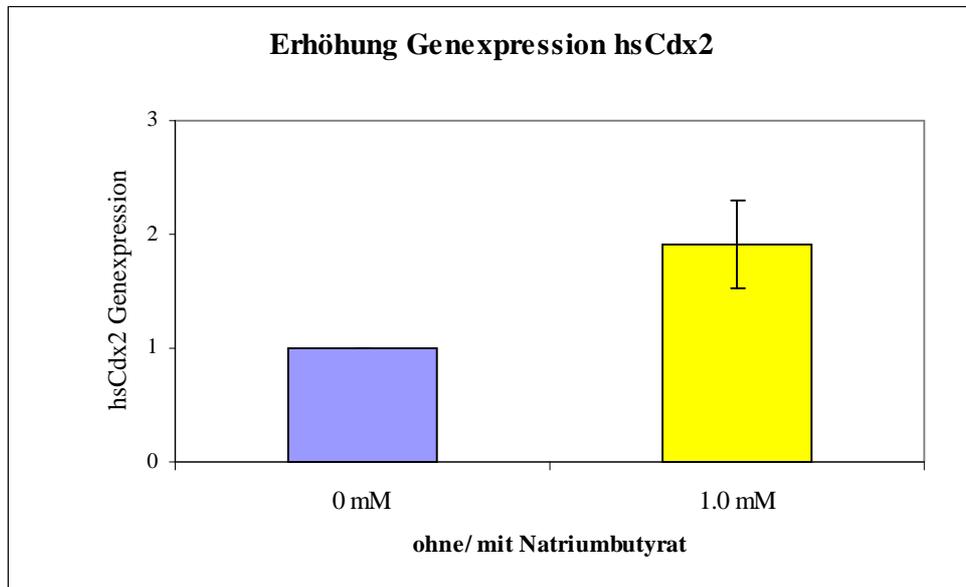
Anzahl der Ansätze: n=3

$p < 0,05$

Abb. 2

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchdauer in Tagen: d=10

Die Cdx2-Expression ist nach 10 Tagen bei den mit Natriumbutyrat versehenen Zellen statistisch signifikant ($p < 0,05$) 1,9fach höher.



Zelllinie: HT29

Anzahl der Ansätze: n=3

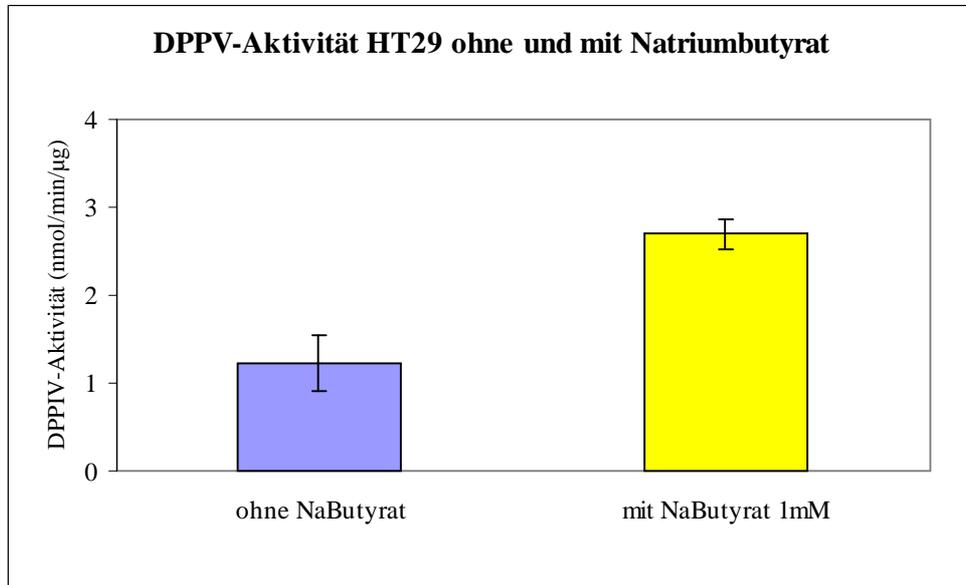
$p < 0,05$

Abb. 3

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=10

4.1.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität

Nach einem Zeitraum von 10 Tagen ist die DPPIV-Aktivität der mit Natriumbutyrat versehenen Zellen statistisch signifikant ($p < 0,05$) höher (2,7 nmol/min/ μ g) als der in Standardmedium gewachsenen (1,23 nmol/min/ μ g).



Zelllinie: HT29

Anzahl der Ansätze: n=3

$p < 0,05$

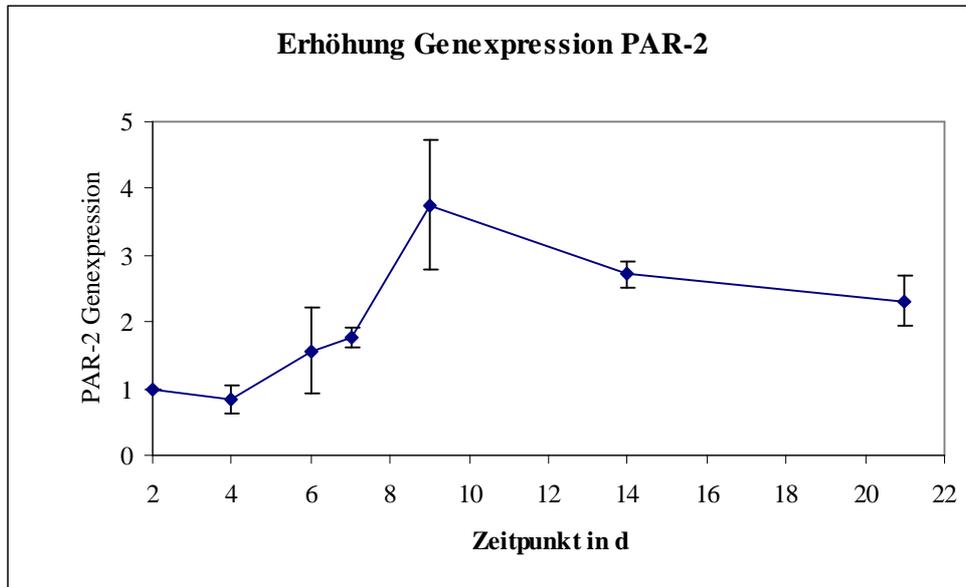
Abb. 4

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=10

4.2. Ergebnisse Caco2

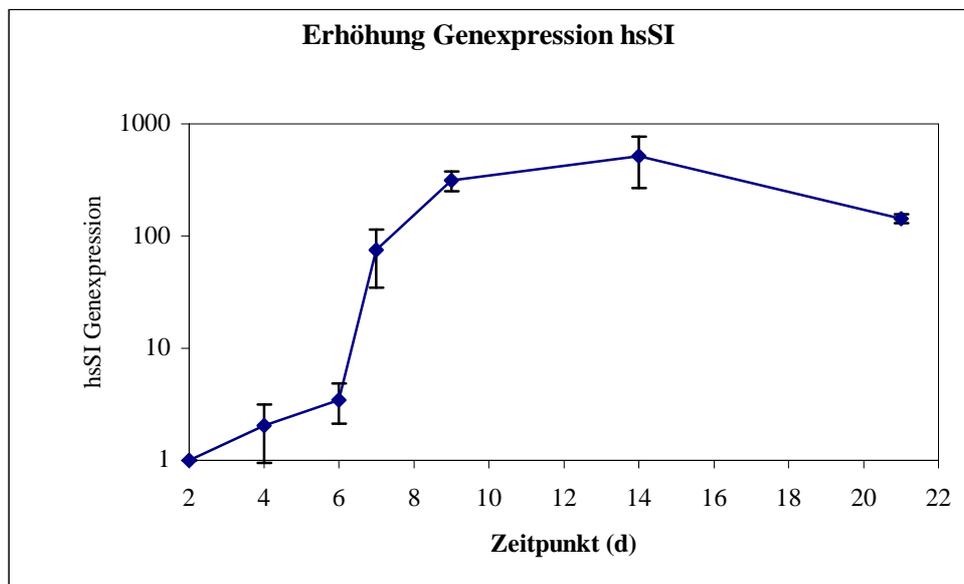
4.2.1. Differenzierungsabhängige Genexpression

Über einen Zeitraum von 21 Tagen lässt sich am 9. Tag eine maximale statistisch signifikante ($p < 0,05$) differenzierungsabhängige Erhöhung der PAR-2-Genexpression auf bis zu 3,75fache Werte nachweisen.



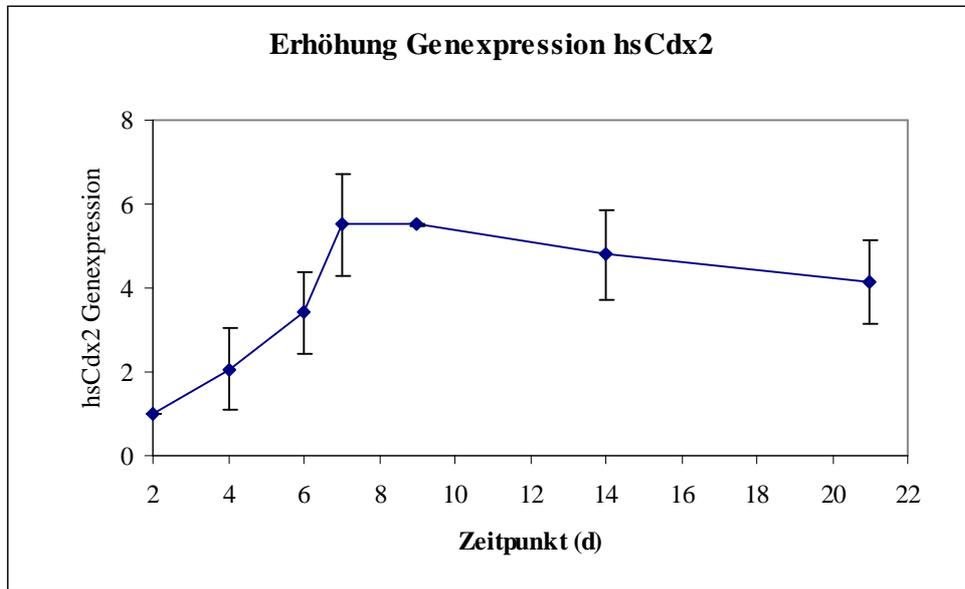
Zelllinie: Caco 2 Anzahl der Ansätze: n=3 $p < 0,05$ Abb. 5
Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchdauer in Tagen: d=21

Über einen Zeitraum von 21 Tagen lässt sich am 14. Tag eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) differenzierungsabhängige Erhöhung der hsSI-Genexpression auf bis zu 517fache Werte nachweisen.



Zelllinie: Caco 2 Anzahl der Ansätze: n=3 $p < 0,05$ Abb. 6
Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchdauer in Tagen: d=21

Über einen Zeitraum von 21 Tagen lässt sich am 7. Tag eine maximale statistisch signifikante ($p < 0,05$) differenzierungsabhängige Erhöhung der hsCdx2-Genexpression in Caco2-Zellen auf bis zu 5,5fache Werte nachweisen.



Zelllinie: Caco 2 Anzahl der Ansätze: n=3

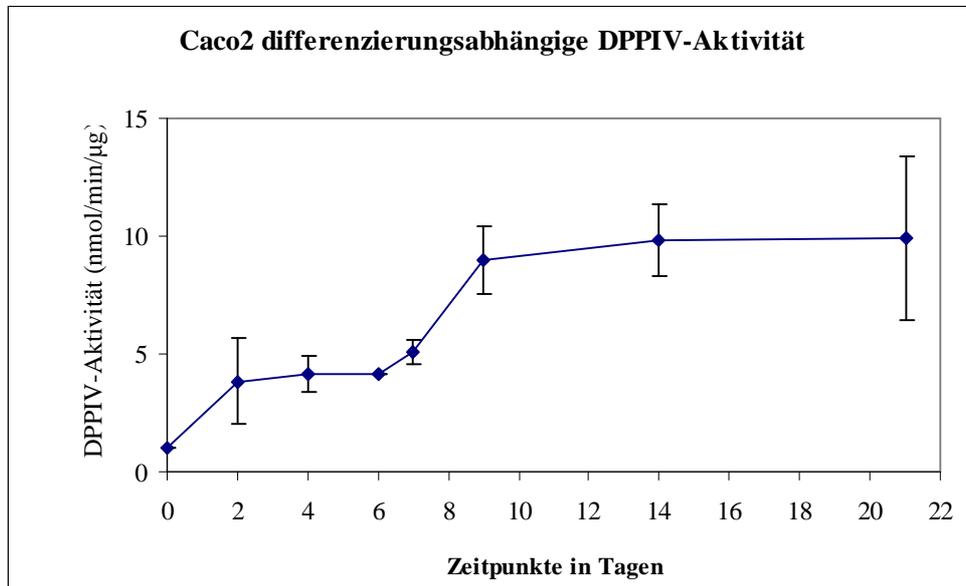
$p < 0,05$

Abb. 7

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=21

4.2.2. Differenzierungsabhängige DPPV-Aktivität

Über einen Zeitraum von 21 Tagen lässt sich ein kontinuierlicher statistisch signifikante ($p < 0,05$) Anstieg der differenzierungsabhängigen DPPV-Aktivität (nmol/min/ μg) auf ein Maximum am 21. Tag mit 10fachem Werte verzeichnen.



Zelllinie: Caco 2 Anzahl der Ansätze: n=3

$p < 0,05$

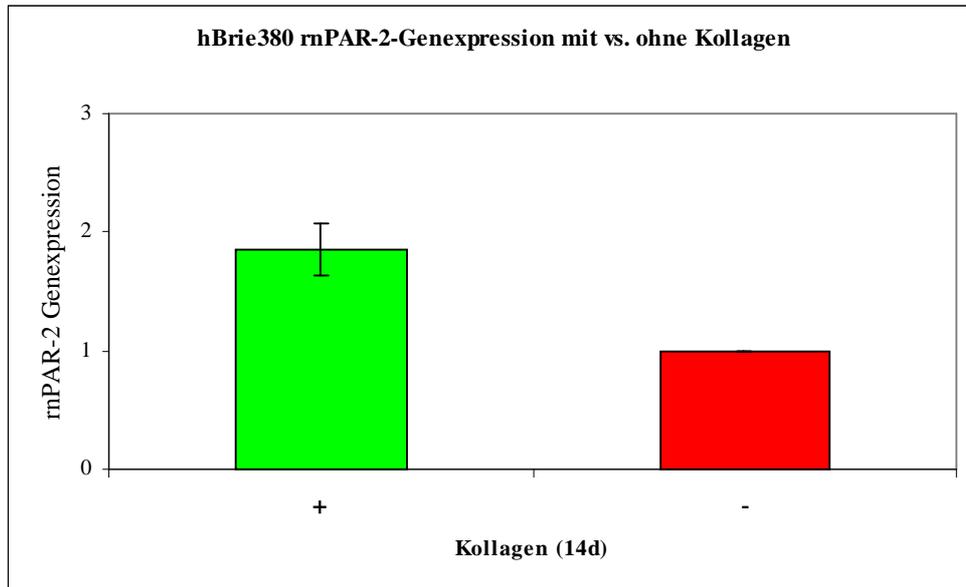
Abb. 8

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=21

4.3. Ergebnisse hBrie380i

4.3.1. Differenzierungsabhängige Genexpression

Bei Wachstum der Zellen über 14 Tage zeigt sich eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) höhere Genexpression von rnPAR-2 bei den auf Kollagen Typ I gewachsenen Zellen (1,86fach).



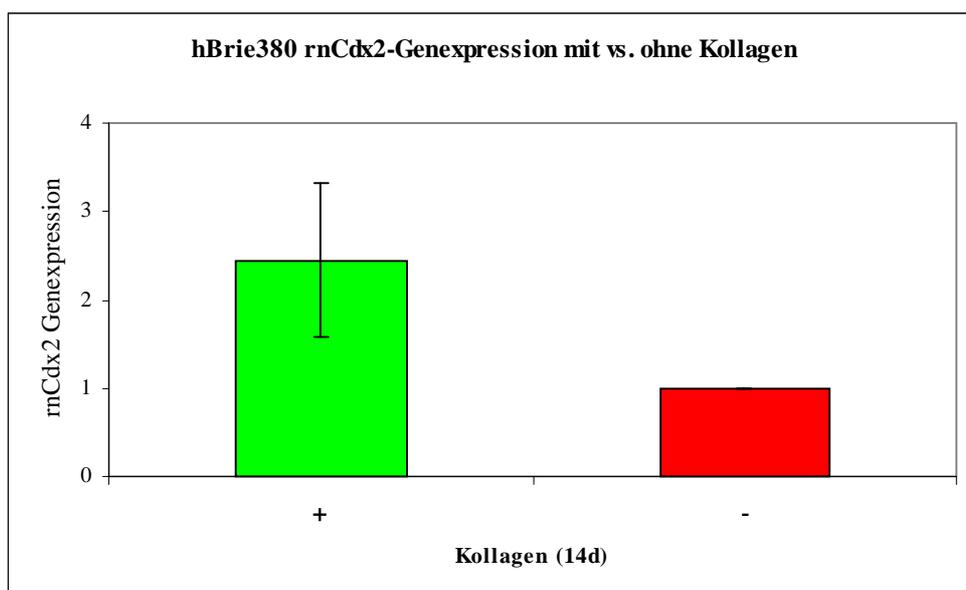
Zelllinie: hBrie380i Anzahl der Ansätze: n=3

$p < 0,05$

Abb. 9

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=14

Bei Wachstum der Zellen über 14 Tage zeigt sich eine höhere Genexpression von rnCdx2 (statistisch signifikant, $p < 0,05$) bei den auf Kollagen Typ I gewachsenen Zellen (2,45fach).



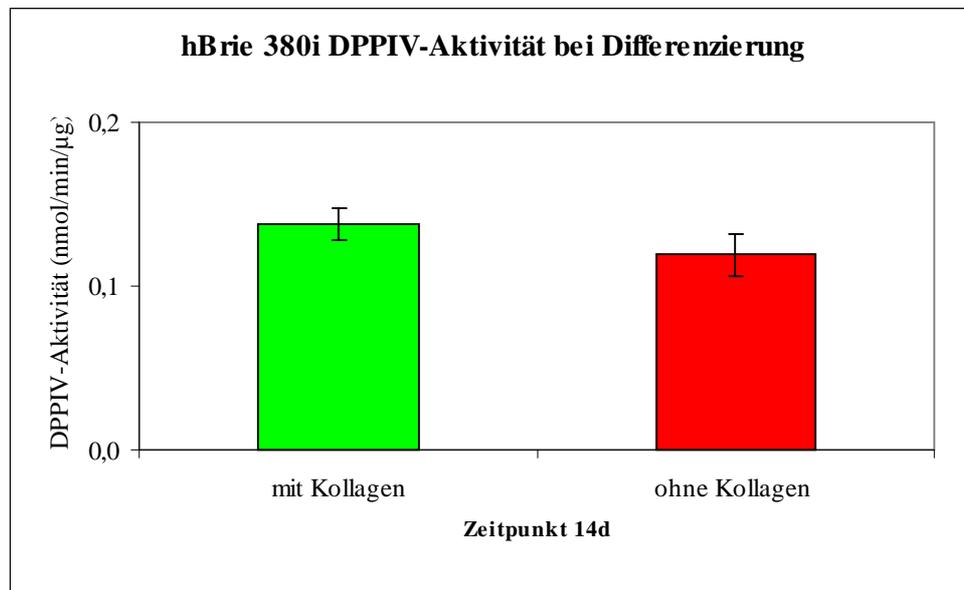
Zelllinie: hBrie380i Anzahl der Ansätze: n=3

Abb. 10

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=14

4.3.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität

Nach einem Zeitraum von 14 Tagen ist bei den in den mit Kollagen Typ I beschichteten Kulturflaschen gewachsenen Zellen eine diskret höhere DPPIV-Aktivität (1,4 nmol/min/ μ g) feststellbar, als bei den in den unbeschichteten Flaschen gewachsenen (1,2 nmol/min/ μ g) (statistisch signifikant, $p < 0,01$).



Zelllinie: hBrie380i Anzahl der Ansätze: n=3

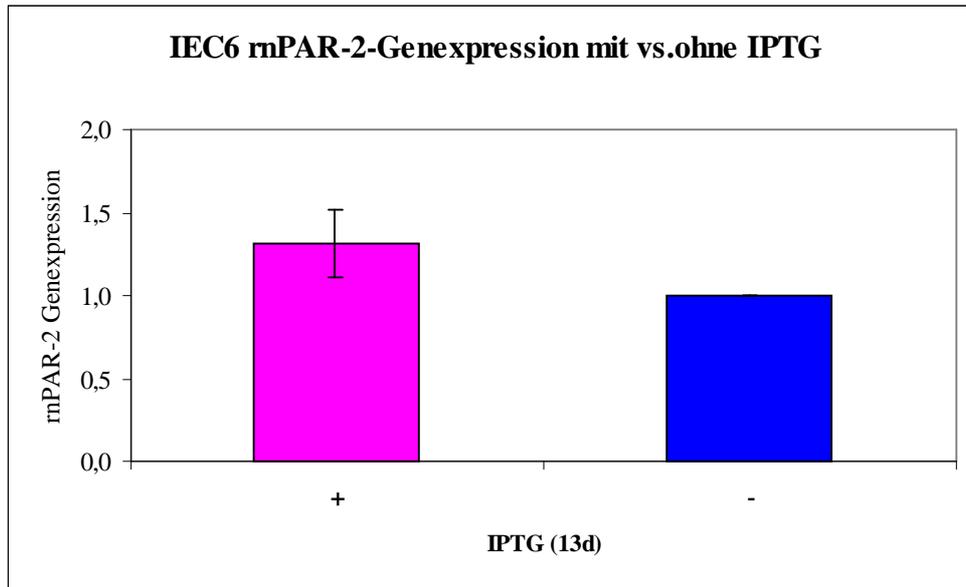
Abb. 11

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=14

4.4. Ergebnisse IEC6

4.4.1. Differenzierungsabhängige Genexpression

Nach einer Wachstumszeit von 13 Tagen zeigen die mit IPTG substituierten Zellen eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) 1,3fach höhere PAR-2-Genexpression als die nicht substituierten.



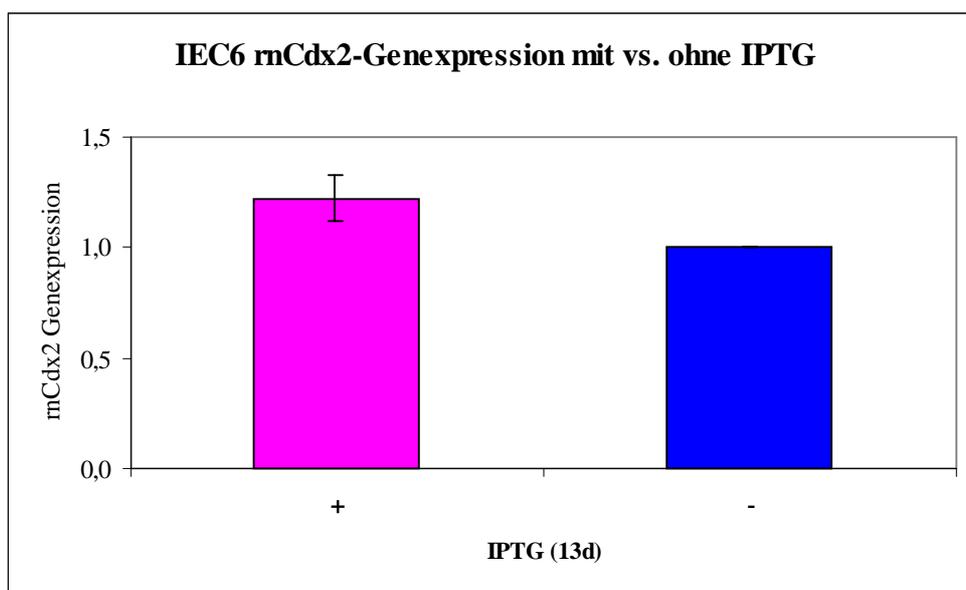
Zelllinie: IEC6-cdx2 Anzahl der Ansätze: n=3

$p < 0,05$

Abb. 12

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=13

Nach einer Wachstumszeit von 13 Tagen zeigen die mit IPTG substituierten Zellen eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) 1,22fach höhere mCdx2-Genexpression als die nicht substituierten.



Zelllinie: IEC6-cdx2 Anzahl der Ansätze: n=3

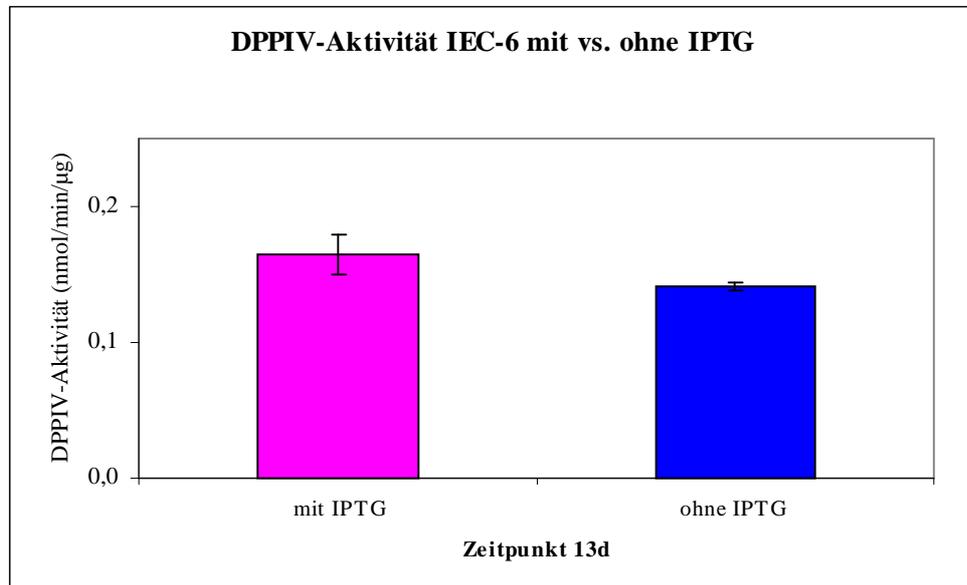
$p < 0,05$

Abb. 13

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchsdauer in Tagen: d=13

4.4.2. Differenzierungsabhängige DPPIV-Aktivität

Nach einer Wachstumszeit von 13 Tagen zeigen die mit IPTG substituierten Zellen eine diskret höhere statistisch signifikante ($p < 0,05$) DPPV-Aktivität ($1,164 \text{ nmol/min}/\mu\text{g}$) als die nicht substituierten ($0,141 \text{ nmol/min}/\mu\text{g}$).



Zelllinie: IEC6-cdx2 Anzahl der Ansätze: n=3

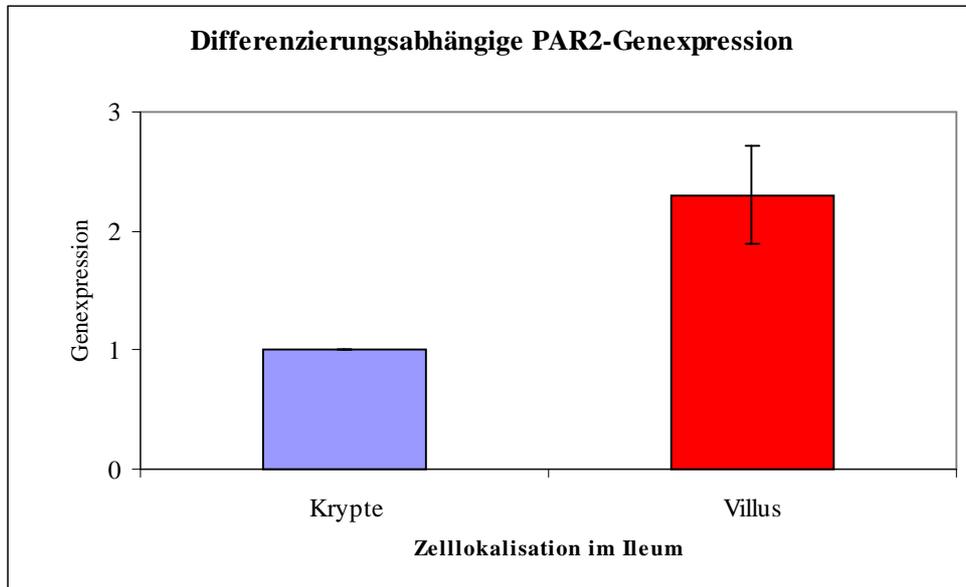
$p < 0,05$

Abb. 14

Anzahl ausgesäte Zellen bei Versuchsbeginn: 2×10^6 Versuchdauer in Tagen: d=13

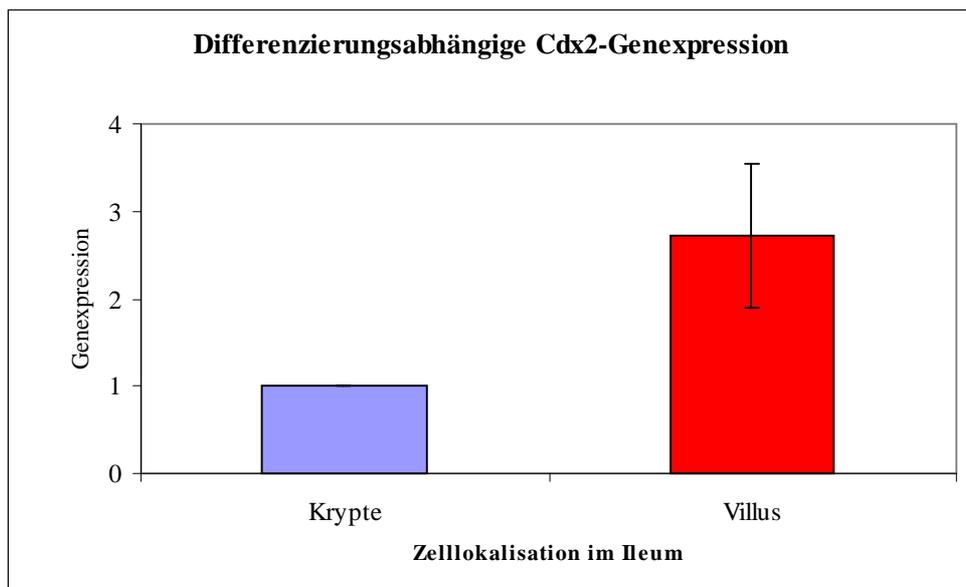
4.5. Ergebnisse Ileum Maus

Im Ileum der Maus kann eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) höhere PAR-2-Genexpression (2,3fach) bei den differenzierteren in den Villi lokalisierten Zellen nachgewiesen werden.



Zellherkunft: Epithelzellen aus dem Ileum der Maus Probenanzahl: jeweils n=3 $p < 0,05$ Abb. 15

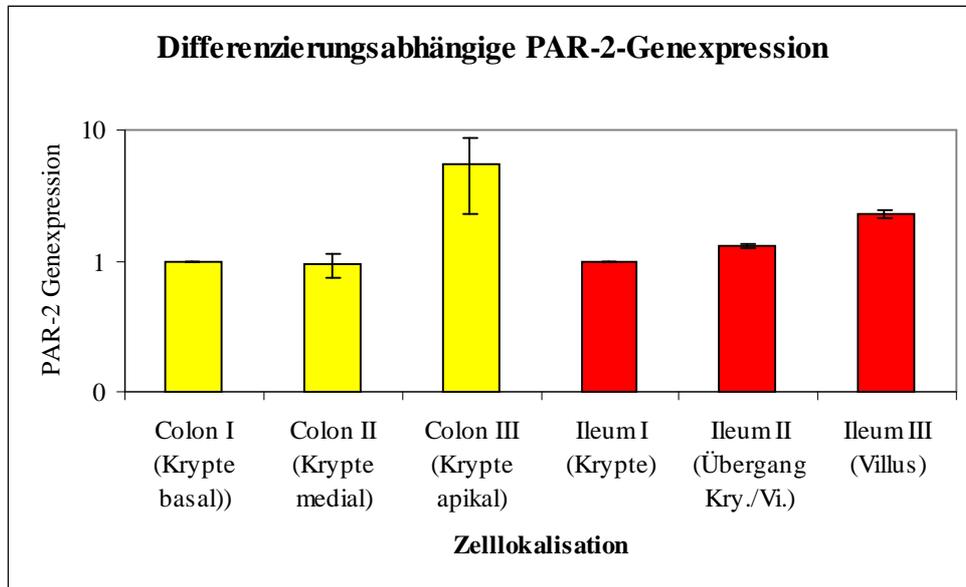
Die differenzierteren in den Villi des Ileum der Maus gelegenen Epithelzellen zeigen eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) höhere Genexpression (2,7fach) von Cdx2 als die in den Krypten gelegenen undifferenzierten Zellen.



Zellherkunft: Epithelzellen aus dem Ileum der Maus Probenanzahl: jeweils n=3 $p < 0,05$ Abb. 16

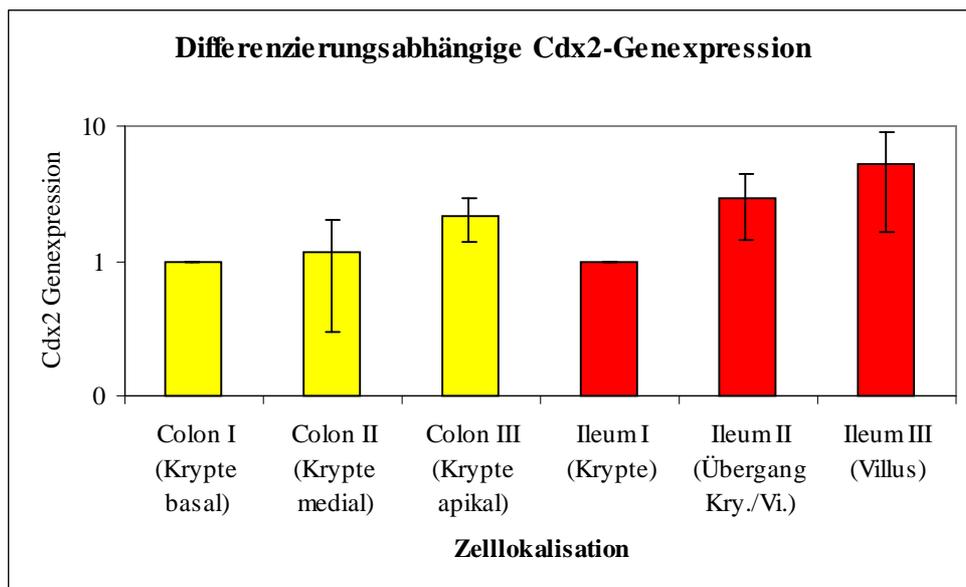
4.6. Ergebnisse Colon und Ileum

Im humanen Gastrointestinaltrakt zeigen die differenzierten Epithelzellen (= Colon III: Krypte apikal, Ileum III: Villus) eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) höhere PAR-2-Genexpression (5,47fach bzw. 2,19fach) als die undifferenzierten Zellen.



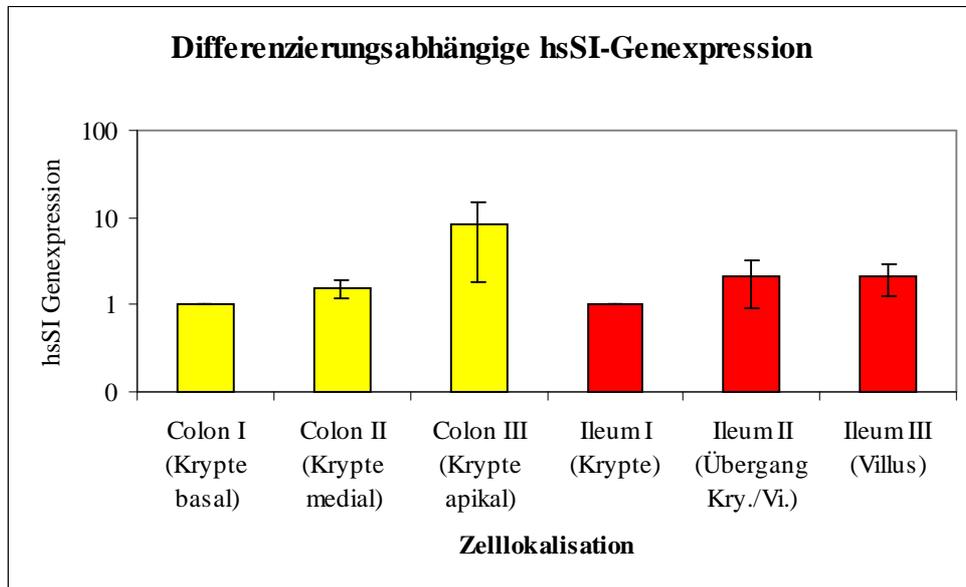
Zellherkunft: humanes Colon und Ileum Probenanzahl: jeweils n=3 $p < 0,05$ Abb. 17

Auch die Cdx2-Genexpression steigt mit Zelldifferenzierung statistisch signifikant ($p < 0,05$) auf 2,14fache (Colon: Krypte apikal) bzw. 5,32fache (Ileum: Villus) Werte.



Zellherkunft: humanes Colon und Ileum Probenanzahl: jeweils n=3 $p < 0,05$ Abb. 18

Bei der hsSI-Genexpression erkennt man ebenfalls eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) differenzierungsabhängige Erhöhung auf bis zu 8,34fache (Colon: Krypte apikal) bzw. 2,09fache (Ileum: Villus) Werte.



Zellherkunft: humanes Colon und Ileum Probenanzahl: jeweils n=3 $p < 0,05$ Abb. 19

5. Diskussion

Wir konnten in unseren Versuchsreihen, das heißt im Zellkulturmodell mit den Zelllinien HT29, Caco2, IEC6 und hBrie380, im Tiermodell (Maus) und auch bei humanen Gewebeproben aus Colon und Ileum deutlich zeigen, dass PAR-2 sowohl in vitro als auch in vivo vermehrt durch differenzierte Epithelzellen des Intestinaltraktes exprimiert wird.

Demnach besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Zelldifferenzierung und Höhe der PAR-2 Genexpression.

Einen Hinweis auf diesen Zusammenhang gab bereits die Arbeit von Böhm et al, in der zum Nachweis die Methode der in situ Hybridisierung gewählt wurde und gezeigt werden konnte, dass das Signal für PAR-2 in den oberen 2/3, also im differenzierteren Teil humaner intestinaler Villi, am stärksten ist (8).

Wenn man davon ausgeht, dass insbesondere, wie schon beschrieben, differenzierte bzw. spezialisierte Zellen zu gezielten Antworten fähig sind, scheint bei diesen PAR-2 eine besondere Position bei Stoffwechsel- und Verdauungsvorgängen, bei Zellantwort auf interne und externe Reize sowie bei Zellwachstum und Proliferation im gesamten Gastrointestinaltrakt einzunehmen und könnte die von uns festgestellte erhöhte Expression im differenzierten Kompartiment entlang der Krypte-Villus-Achse erklären. Im Einzelnen kann dies für die jeweiligen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts belegt werden.

5.1. Magen

PAR-2 nimmt bei zytoprotektiven Vorgängen im Magen eine wichtige Rolle ein. Dort produzieren differenzierte Epithelzellen, die Nebenzellen, den gastroprotektiven Mucus. PAR-2 aktivierendes Peptid (PAR-2 AP) triggert die Sekretion von Mucus im Magen durch Stimulation von sensorischen Neuronen, die CGRP und Tachykinin ausschütten, und kann dadurch z. B. durch HCL-Ethanol oder Indomethacin hervorgerufene Verletzungen der Magenschleimhaut verhindern (36). Außerdem suprimiert eine PAR-2 Aktivierung die Säure-Sekretion aus differenzierten Belegzellen und erhöht die Durchblutung der Schleimhaut über mehrere Zwischenschritte (37). In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass ein protektiver Effekt durch Erhöhung der Motilität erzielt werden kann. Hier zeigten Versuche an Ratten, dass das PAR-2 aktivierende Peptid SLIGRL (SL)-NH₂ über mehrere Zwischenschritte eine vorübergehende Kontraktion der glatten Magenmuskulatur bewirkt (38). Ähnliches

wurde an lebenden Mäusen festgestellt, der gastrointestinale Transit wurde durch intraperitoneale Gabe von PAR-2 Agonisten dosisabhängig beschleunigt (2). Es ist also vorstellbar, dass z.B. aufgenommene Noxen durch die durch PAR-2 Aktivierung erhöhte Propulsion schneller abtransportiert bzw. entfernt werden können.

Als gastroprotektiv erwies sich ebenfalls eine durch PAR-2 Aktivierung hervorgerufene capsaicin-sensitive nervenabhängige Ausschüttung eines mit Calcitonin genverwandten Peptids und von Neurokininen (49).

Des Weiteren bewirkt eine PAR-2 Aktivierung eine Ca^{2+} -Mobilisierung und die Sekretion von Pepsinogen aus den differenzierten Hauptzellen. Dieser Effekt scheint ein direkter Mechanismus zu sein, da er sich, hervorgerufen durch SLIGRL (SL)- NH_2 , resistent gegen Omeprazolgabe, N(G)-Nitro-L-Arginin Ester, Atropin und sogar der Capsaicin-Ablation von sensorischen Neuronen zeigt (25, 37, 40). Das Vorläuferhormon Pepsinogen wird im sauren Magensaft (pH-Optimum 2 bis 3) in verschiedene Pepsine umgewandelt und diese spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinverdauung - diese Pepsine spalten Proteine in Polypeptide (32).

5.2. Dünndarm

Im Dünndarm, wo PAR-2 noch stärker als z.B. im Magen exprimiert wird (8, 57, 58), hat seine Aktivierung u. a. nicht nur eine protektive Funktion, sondern sie kann auch in proinflammatorische Vorgänge münden.

Unter anderem reagieren differenzierte Enterozyten auf diese Aktivierung mit einer Cl^- -Sekretion. Daran beteiligt scheinen bestimmte Prostaglandine (siehe auch weiter unten), die den aktiven Ionen-Transport ermöglichen. Daraus kann Diarrhö resultieren, als z.B. ein Zeichen intestinaler Inflammation, welche aber auch bewirken kann, dass im Rahmen einer Entzündung im Sinne protektiver Wirkung durch verstärkte Sekretion Toxine schneller entfernt werden (8, 20, 82). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass bei einer Rotavirus-Infektion (Versuchstier: junges Kaninchen) besonders die im Bereich der Villusspitze gelegenen Zellen, d.h. die differenzierteren Epithelien, verstärkt Cl^- sekretieren, was durchaus mit der höheren Expression von PAR-2 und dessen Aktivierung zusammenhängen kann (48).

Aber auch unabhängig von Eicosanoiden oder Prostaglandinen stimuliert die Aktivierung von PAR-2 in isolierten Jejunumsegmenten der Ratte die Chloridstimulation unabhängig vom enterischen Nervensystem, was auf einen direkt mit den Epithelien in Zusammenhang stehenden Effekt schließen lässt (49).

Ebenso wie im Magen ist PAR-2 an der Motilität des Dünndarms beteiligt. Im Tiermodell (Ratte) konnte am präparierten Duodenum gezeigt werden, dass PAR-2 exzitatorisches Potenzial besitzt. Durch Kontakt der an der Villusspitze gelegenen Enterozyten mit der PAR-2 AP SLIGRL (SL)-NH₂ und Trypsin wird eine Kontraktion der glatten Darmmuskulatur bewirkt. Diese kontraktile Antwort wird teilweise über nachfolgende Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen, Proteinkinase C und evtl. Tyrosinkinase vermittelt und kann durch apaminsensitive Kaliumkanäle moduliert werden. (38, 39). In einem anderen Modell wurde zusätzlich belegt, dass Trypsin und SLIGRL (SL)-NH₂ im gesamten Dünndarm dosisabhängig zunächst eine leichte Relaxation mit nachfolgender Kontraktion der murinen Muskulatur bewirken, wobei vermutlich Neurokininrezeptoren beteiligt sind, was auf eine Beteiligung von sensorischen Nerven hinweist (85). Differenzierte Enterozyten stehen also u. a. durch PAR-2 Aktivierung mit motilitätsmodulierenden Mechanismen in Verbindung.

Des Weiteren wurde an apikal in den Villi gelegenen Enterozyten des Jejunums der Ratte nachgewiesen, dass nach PAR-2-Aktivierung durch PAR-2 AP und Trypsinstimulation Prostaglandine (PGE₂ und PGF_{1α}) sekretiert und Arachidonsäure ausgeschüttet werden (42).

Die Ausschüttung von Arachidonsäure ist essentiell für die Verfügbarkeit von Eicosanoiden wie z.B. PGE₂ und PGF₁, weil sie Derivate dieser mehrfach ungesättigten Fettsäure sind. Die Synthese von Eicosanoiden aus Arachidonsäure durch PAR-2 Aktivierung erfordert vermutlich die Aktivierung zytoplasmatischer Phospholipase A₂, welche dann aus membranären Phospholipiden Arachidonsäure freisetzt. Die Geschwindigkeit, mit der nach PAR-2 Aktivierung Prostaglandine sezerniert werden, lässt auf eine Beteiligung der Cyclooxygenase 1 an diesem Prozess schließen (8, 42, 45, 82). Wie oben schon erwähnt, regulieren Eicosanoide bzw. Prostaglandine die Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion, also den epithelialen Transport. Des Weiteren spielen sie in der Dünndarmwand eine lokale Rolle bei der Regulation von Wachstum und Blutfluss und vermitteln außerdem bei Entzündung und Zytoprotektion (42). Was bis jetzt über Prostaglandine in diesem Zusammenhang herausgefunden wurde, gibt Hinweis auf Ihre Wichtigkeit bei der Heilung von mukosaler Verletzung, beim Schutz gegen bakterielle Invasion und bei der Down-Regulation des mukosalen Immunsystems (84).

Es folgen einige Beispiele: Es konnte gezeigt werden, dass differenzierte intestinale Epithelzellen durch ein Prostaglandinanalogen vor Schaden durch das

Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil oder durch Methotrexat geschützt werden bzw. zu Zellwachstum –und Vermehrung angeregt werden (30, 33). Deshalb könnten unter Umständen in Zukunft PAR-2 AP in der supportiven Therapie von Karzinompatienten unter Chemotherapie ihren Platz finden.

Prostaglandin E₂ beschleunigt die postnatale intestinale Reife, erkennbar an einer deutlichen Zunahme der Enzymaktivität von Sucrase, Maltase, Lactase und Aminopeptidase und der morphologischen Veränderung der Darmwandstruktur in Form von Zunahme der Kryptentiefe (>35%) (50).

Eine Beteiligung von PAR-2 an diesen in den Beispielen genannten Prozessen scheint daher aufgrund der oben beschriebenen Mechanismen eine entscheidende Rolle zu spielen und unterstreicht daher die von uns postulierte Stellung von PAR-2 in differenzierten Zellen.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die PAR-2 Aktivierung zur Bildung von Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat (InsP₃) führt, welches für den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration verantwortlich ist. Die Calciummobilisierung in das Zytosol erfolgt hierbei im Wesentlichen aus intrazellulären Calciumspeichern, welche im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind. Dort findet sich auch der InsP₃-Rezeptor, der ein Protein, bestehend aus zwei Membrandomänen und einer großen N-terminalen Schleife, ist. Vier dieser Rezeptormoleküle bilden einen durch InsP₃ aktivierten Calciumkanal. Jede Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration führt zu markanten Änderungen des Zellstoffwechsels. So kommt es u. a. zu einer Stimulierung sekretorischer Prozesse (42, 46). PAR-2-Aktivierung führt somit mittels dieses Mechanismus über Zwischenschritte zu entscheidenden Stoffwechselveränderungen in differenzierten Enterozyten und zeigt damit noch einmal deutlich die wichtige Rolle dieses Rezeptors auf.

5.3. Dickdarm

Auch im Colon wird PAR-2 durch differenzierte Epithelien stark exprimiert und hat auch hier nach dessen Aktivierung nachgewiesenermaßen einen bedeutenden Stellenwert in der Homöostase in diesem Abschnitt des Gastrointestinaltrakts (8).

Wie auch im Magen und Dünndarm ist PAR-2 im Dickdarm an der Motilität und deren Zunahme bei z.B. entzündlichen Prozessen beteiligt. PAR-2 wird z.B. von differenzierten Colonenterozyten der Ratte exprimiert und spielt hier eine duale Rolle bei der Kontrolle der Colonmotilität, indem seine Aktivierung Kontraktionen der

longitudinalen Muskulatur hervorruft und gleichzeitig die Kontraktilität der zirkulären Muskulatur hemmt.

Unter physiologischen Bedingungen findet man wenige Proteasen mit PAR-2 aktivierendem Potential im Darmlumen, doch dies ändert sich bei einem mukosalen Trauma mit Plasmaexsudation oder einem entzündlichen Ereignis mit Mastzelldegranulation. Die Konzentration der endogenen Proteasen wie Tryptase und Thrombin steigt in diesem Zusammenhang und diese können suffizient den von den differenzierten Enterozyten exprimierten PAR-2 aktivieren. Die nun durch PAR-2 vermittelte mechanische Antwort könnte den Zweck haben, das trauma- oder inflammationauslösende Agens möglichst schnell aus dem intestinalen Lumen zu entfernen und scheint eine entscheidende Rolle bei der während Entzündungsprozessen beobachteten erhöhten Darmmotilität zu spielen. In der Tat ist bekannt, dass die hauptsächlichsten Veränderungen der Motilität während einer Entzündung auf einer Unterdrückung der spontanen phasischen Kontraktionen und einer Zunahme der ultrarapiden Propulsion beruhen (53).

Hier wird wieder der Zusammenhang zwischen der PAR-2-Expression mit Aktivierung und einer gezielten funktionellen Antwort, die ihren Ursprung in einer differenzierten Zelle findet, deutlich.

Weitere Studien, die sich ebenfalls mit Entzündungsmodellen beschäftigen, kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Allen gemeinsam aber ist, dass hauptsächlich über die PAR-2 Aktivierung auf differenzierten Enterozyten die nachfolgenden Prozesse initiiert werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass mit 2,4,6-Trinitrobenzenschwefelsäure (TNBS) intrarektal behandelte Mäuse (Hapten-induzierte Colitis) eine deutlich weniger ausgeprägte Entzündungsreaktion zeigten, wenn nachfolgend subkutan SLIGRL-NH₂, ein PAR-2-aktivierendes Peptid (PAR-2 AP), injiziert worden war (26). Die Studie deutet darauf hin, dass PAR-2 ein antiinflammatorischer Rezeptor im Colon ist und lässt darauf schließen, dass PAR-2 Liganden effektiv bei der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden könnten. Obwohl hier nicht PAR-2 direkt auf differenzierten Enterozyten aktiviert wurde sondern die subkutane Gabe von SLIGRL-NH₂ erfolgte, liegt dennoch die Vermutung nahe, dass eine lokale Applikation den gleichen Effekt hätte. Dies gilt es noch herauszufinden.

Die Daten demonstrieren auch, dass dieser defensive Mechanismus von PAR-2 durch inflammatorische Stimuli ausgelöst wird und lassen vermuten, dass eine Fehlfunktion

von PAR-2 bei der Limitierung von mukosaler Immunsystemreaktivität eine Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen spielt (26).

Andererseits sollte man in diesem Zusammenhang aber auch erwähnen, dass durch PAR-2-Aktivierung nicht nur eine protektive Wirkung erzielt wurde, sondern auch Inflammation erzeugt werden kann. Wird Trypsin oder SLIGRL-NH₂ in entsprechender Dosis in das Lumen und somit zunächst auf die apikalen Kryptenanteile des gesunden Colons der Maus appliziert, resultiert daraus bei Wildtypmäusen, aber nicht bei PAR-2-defizienten Mäusen, eine generalisierte Entzündungsreaktion. Auch die parazelluläre Permeabilität wird heraufgesetzt und somit die intestinale Barrierenintegrität gestört. Diese Störung beruht offenbar auf einer der PAR-2-Aktivierung nachfolgenden Sekretion von IFN- γ . Dosen von SLIGRL-NH₂, die keine Entzündung auslösen, erhöhen dennoch die Permeabilität über eine Aktivierung von Calmodulin, welches an Myosin-Leicht-Ketten-Kinase bindet und diese ebenfalls aktiviert. Diese Daten sind sicher von ebenfalls großer Relevanz bei der Pathophysiologie von entzündlichen Darmerkrankungen (12, 13, 14). Es müssen aber noch weitere Untersuchungen erfolgen, um die kontroversen Aussagen bezüglich Entzündungsinitiierung und -limitierung durch PAR-2 Aktivierung besser zu verstehen. Unter Umständen sind noch andere Faktoren beteiligt, die dazu führen, dass es in bestimmten Situationen entweder zu einer Inflammation oder zu Heilungsprozessen kommt.

Des Weiteren konnte eine Beteiligung von PAR-2 an viszeralem Schmerz nachgewiesen werden. Ratten erhielten in subinflammatorischen Dosen Infusionen mit PAR-2 AP in das Darmlumen. PAR-2 wurde auf den differenzierten Enterozyten aktiviert und produzierte mit Hilfe von spinalen afferenten Neuronen eine verzögerte rektale Hyperalgesie, messbar an der Zunahme von abdominalen Kontraktionen, was ein Kriterium für viszeralem Schmerz ist. Bei der Hyperalgesie waren auch Änderungen der intestinalen Permeabilität und eine Aktivierung des NK 1 Rezeptor involviert.

Diese Ergebnisse identifizieren den von differenzierten Colonenterozyten exprimierten PAR-2 als einen bei der Genese von viszeralem Schmerz wichtige Rolle spielenden Rezeptor (16).

5.4. Intestinale Tumoren

Aufgrund unserer Ergebnisse in den einzelnen Versuchen, die belegen, dass PAR-2 besonders von differenzierten intestinalen Epithelien exprimiert wird und der in der Literatur in diesem Zusammenhang beschriebenen Funktionen dieses Rezeptors, scheint

auch eine Beteiligung von PAR-2 an der Entstehung von intestinalen Tumoren wahrscheinlich (49).

So konnte gezeigt werden, dass diverse humane Colonkarzinomzelllinien, die PAR-2 exprimieren, auf eine Aktivierung dieses Rezeptors mittels Trypsin mit Proliferation reagieren (22). Bei der colorektalen Karzinogenese spielen Trypsin und PAR-2 in einer autokrinen Schleife zusammen, welche Proliferation, Progress, Invasion und Metastasierung durch unterschiedliche Mechanismen initiiert. Die Synthese von Prostaglandinen scheint hierbei wichtig, ebenso wie die Beteiligung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) wie MMP-2, -7 und -9. Durch Trypsinstimulation aktivieren PAR-2 und MMPs den mitogenen MAPK-ERK Weg über eine Transaktivierung des Epidermal-Growth-Factor Rezeptor (EGF-R). Dies mündet letztendlich in der oben beschriebenen Tumorentstehung bzw. in weiterem Tumorwachstum (21, 70).

Denkbar ist also, dass in vivo durch bestimmte auslösende Faktoren über eine PAR-2 Aktivierung differenzierte intestinale Epithelzellen oder Tumoren, die vermehrt PAR-2 exprimieren, bösartig entarten, bzw. zu Proliferation und Metastasierung angeregt werden.

Nun stellt sich die Frage, ob besonders differenzierte Epithelzellen aufgrund ihrer höheren PAR-2 Expression entarten. Dies ist zumindest gut vorstellbar, da bereits subnanomolare Konzentrationen von PAR-2 aktivierendem Trypsin eine Proliferation von Colonkarzinomzelllinien bewirken (22). Da nun in diesem Zusammenhang Trypsin als ein Wachstumsfaktor für Colontumoren bezeichnet werden muss, könnte es gut sein, dass Epithelzellen mit einer höheren PAR-2 Expression einer größeren Entartungsgefahr unterliegen, da sie Trypsin dadurch eine vergrößerte „Angriffsfläche“ bieten. Hier sollten Mechanismen in Betracht gezogen werden, die bei der Entartung von chronisch entzündeten Darmabschnitten eine Rolle spielen. Gerade bei Inflammation wird vermehrt Trypsin gebildet und könnte im Zusammenspiel mit PAR-2 auf Dauer ein Promoter bei der Karzinogenese sein.

Auch an Entstehung und Wachstum des Magenkarzinoms scheint PAR-2 beteiligt.

So ist es vorstellbar, dass ausdifferenzierte Magenepithelien bei entsprechenden Risikofaktoren (chronische Gastritis, Nikotinkonsum, bakterielle Besiedlung, etc.) aufgrund der höheren PAR-2 Expression und der damit verbundenen Aktivierung z.B. durch Trypsin proliferieren und daraus Tumoren entstehen, die je nach Ursprungszellart Kriterien der verschiedenen differenzierten und undifferenzierten Karzinome aufweisen.

Das ist denkbar, weil dieser Mechanismus auch bei der Entstehung von Colonkarzinomen diskutiert wird (49).

Ist ein Karzinom entstanden, so ist hier meistens die PAR-2 Expression höher als in normalen Geweben. Es zeigte sich, dass diese Überexpression im Zusammenspiel mit dem durch PAR-2 transaktivierten EGF-R, zu Zellwachstum bzw. zur Tumorproliferation führt (11).

Weiterhin ist die PAR-2 Expression von Relevanz bei der Progression von Magenkarzinomen. Magenkarzinome werden nach Borrmann in 4 Typen unterteilt. Dabei richtet sich die Unterteilung weniger nach dem Zelltyp als nach der Wuchsform. Die Einteilung verläuft über die Wachstumstypen polypös (Typ I), schüsselförmig (Typ II), ulzerierend/infiltrierend (Typ III) und diffus infiltrierend/szirrhös (Typ IV). Die Prognose verschlechtert sich aufsteigend von Typ I bis Typ IV – je infiltrativer ein Karzinom wächst, desto geringer ist die 5-Jahre-Überlebensrate (64). Eine Beziehung zu PAR-2 lässt sich auch hier feststellen. So korreliert die Höhe der Expression mit der Tiefe der Magenwandinfiltration, der lymphatischen und venösen Invasion sowie mit der Metastasierung in die Leber. Die Patienten, bei denen PAR-2 positive Karzinome diagnostiziert wurden, hatten eine signifikant schlechtere Prognose, somit kann eine PAR-2 Expression als negativer Prädiktor identifiziert werden (29).

Obwohl wie oben erwähnt der Zelltyp bei der Prognosestellung eine untergeordnete Rolle spielt, sollte aber aufgrund der Häufigkeit des Auftretens eher differenzierter Adenokarzinome des Magens (64) und einer wohl damit verbundenen höheren PAR-2 Expression in Zukunft auf diesen Aspekt ein erhöhtes Augenmerk gelegt werden.

5.5. PAR-2 in anderen Geweben

Der Focus unserer Nachforschung lag primär auf intestinalen Epithelien, doch findet sich auch in vielen anderen differenzierten Geweben eine Expression von PAR-2.

Zu diesen Geweben zählen im Gastrointestinaltrakt u. a. glatte Muskelzellen, mesenterische afferente Nerven, Neuronen der myenterischen und submukosalen Nervenplexus, Endothelzellen, vaskuläre glatten Muskeln und einige Zellen des Immunsystems wie Neutrophile, Mastzellen und Lymphozyten (17, 18, 20, 56, 63).

Auch in der Leber und in pankreatischen Ductusepithelien wurde PAR-2 nachgewiesen (57).

Doch nicht nur im gastrointestinalen, im zirkulatorischen und im kardiovaskulären System findet sich eine Expression von PAR-2, sondern auch im Respirationstrakt und in der Haut.

Anhand von einigen Beispielen soll hier noch einmal gezeigt werden, dass besonders differenzierte Zellen PAR-2 exprimieren und damit unsere in den Versuchen erlangten Ergebnisse unterstützen und dieser Rezeptor eine wichtige Position auch in anderen Geweben einnimmt.

5.5.1. Lunge

So konnte immunreaktives PAR-2 im Lungengewebe der Ratte, der Maus, des Guinea-Schweins und des Menschen lokalisiert werden. Hier wird der Rezeptor von zilien- und nichtzilientragenden Epithelien (besonders auf der apikalen Membran) sowie von Drüsen, glatter Atemwegsmuskulatur, Endothelzellen und glatten vaskulären Muskelzellen exprimiert (15, 65, 67).

Dadurch, dass PAR-2 im Atemtrakt von verschiedenen differenzierten Zellen mit unterschiedlicher Funktion exprimiert wird, hat dessen Aktivierung diverse Auswirkungen auf die Homöostase in diesem System. PAR-2 hat Anteil an der Regulierung des Atemwegwiderstandes, des Elektrolyttransportes und spielt eine Rolle bei Entzündung und Entstehung von Fibrose (1, 5, 15, 19, 44).

Gerade weil Lungenepithel morphologisch Darmepithel ähnelt, scheint von differenzierten Zellen exprimierter PAR-2 hier ähnliche Funktion zu haben. Die Epithelauskleidung des Bronchialbaumes besteht aus mehrreihig gebautem flimmerndem Zylinderepithel. Basalzellen, die auf der Basalmembran gelegen sind und das Lumen nicht erreichen, bilden die Stammzellpopulation, aus der die differenzierten Zellen wie zilientragende Zellen, Becherzellen, neuroendokrine Zellen und Intermediärzellen (transformieren sich vermutlich gerade zu den anderen Zellen) entstehen. Die Wand der Bronchien enthält glatte Muskulatur, submuköse Bronchialdrüsen mit Myoepithelzellen sowie schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) (74).

So hat eine Aktivierung von PAR-2 einen prostanoidvermittelten zytoprotektiven Effekt: es folgt eine Relaxierung der Atemwege (Präparate verschiedener Spezies: Maus, Ratte, Guinea-Schwein, Mensch) durch Ausschüttung eines Cyclooxygenaseprodukts aus dem differenzierten Epithel. Des Weiteren verhinderte eine Aktivierung die Bronchokonstriktion in Ratten. PAR-2 übernimmt also auch in der Lunge eine Schutzfunktion, dies geschieht auf eine den Mechanismen im Gastrointestinaltrakt ähnliche Weise und bietet interessante Optionen für medikamentöse Therapien (15).

Auf der anderen Seite hat eine PAR-2 Aktivierung noch weitere bronchomotorische Auswirkungen: Die intratracheale Gabe von der PAR-2 AP SLIGRL-NH₂ bewirkt bei anästhesierten Guinea-Schweinen eine Bronchokonstriktion, andererseits relaxieren Trypsin und SLIGRL-NH₂ isolierte Trachea und Hauptbronchien und kontrahieren intrapulmonale Bronchien (65).

Dies zeigt, dass je nach Lokalisation der differenzierten Epithelien die durch PAR-2 Aktivierung vermittelte Antwort unterschiedlich ausfallen kann. Hier wird wieder die Komplexität der Homöostase ebenso wie die wichtige Rolle von PAR-2 deutlich. Gleiches gilt auch für andere Bereiche:

Wie schon weiter oben für den Gastrointestinaltrakt beschrieben, spielt die PAR-2 Expression differenzierter Epithelien auch im Respirationstrakt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts.

PAR-2 Aktivierung bewirkt hier u. a. die Na⁺- Absorption und Anionen- Sekretion. Dies sind zentrale Prozesse um die Flüssigkeitsmenge auf der Atemwegsoberfläche zu kontrollieren. Außerdem bedingt dies die für die jeweilige Situation erforderliche Flüssigkeitszusammensetzung. Es wurde festgestellt, dass die Stimulation des Ionentransports in der Hauptsache vom Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ abhängig ist, ein Effekt, der auch im Intestinum beschrieben wird (19, 25, 44).

Für PAR-2 wurde in der Lunge eine Beteiligung an der Entstehung von Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und pulmonaler Fibrose nachgewiesen. Die Ausschüttung von Tryptase aus aktivierten Mastzellen bedingt über eine PAR-2 Aktivierung eine fibroproliferative Antwort und kann auf Dauer zu den oben genannten Erkrankungen führen. Auch differenzierte glatte Muskelzellen in den Atemwegen reagieren auf die Tryptase Aktivierung von PAR-2 proliferativ, was durch den daraus resultierenden Umbau der Atemwege in Zusammenhang mit der Entstehung von Asthma steht (1, 5, 51).

In Zusammenhang mit der erhöhten PAR-2 Expression von differenziertem respiratorischem Epithel und der damit verbundenen Stellung des Rezeptors bei der Entzündungsregulierung steht auch die Beobachtung, dass hier eine Mehr- oder Überexpression zu allergischer Inflammation führt.

So konnte an Mäusen, deren Lungenepithel PAR-2 exprimiert, eine Exazerbation von methacholin-induzierter Hyperreaktivität der Atemwege und die Infiltration von Eosinophilen in das Atemwegslumen bei einer induzierten allergischen Inflammation beobachtet werden, wohingegen bei PAR-2 defizienten Tieren diese Effekte minimal

waren. Außerdem konnte bei PAR-2 Deletion in dieser Situation ein signifikant niedrigeres IgE Level als bei Wildtyp Tieren festgestellt werden (67).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unserer These, dass eine höhere Expression von PAR-2 durch differenzierte Zellen eine gezielte Reaktion auf externe Reize bewirkt. Findet sich wie in dem oben erwähnten Versuch eine geringe PAR-2 Expression, so fällt die Antwort auf z.B. eine ausgelöste allergische Entzündungsreaktion geringer aus, was für Therapieansätze interessante Optionen eröffnet.

5.5.2. Haut

Der von uns erstellte Zusammenhang zwischen Differenzierung einer Zelle und damit verbundenen erhöhten PAR-2 Expression lässt sich auch in der Haut nachvollziehen. Auch hier wird der Rezeptor von diversen differenzierten Zellen exprimiert und hat damit durch seine speziellen Funktionen Anteil an entscheidenden physiologischen Prozessen, aber auch bei der Entstehung von Krankheit.

PAR-2 konnte besonders in im Stratum Granulosum der Epidermis gelegenen Keratinozyten lokalisiert werden, außerdem in kutanen sensorischen Nerven, in mikrovaskulären Endothelzellen, in Haarfollikeln und in Myoepithelzellen von Schweißdrüsen, allesamt differenzierte Zellen (62, 71).

In der Haut spielt nachgewiesenermaßen die PAR-2 Expression der oben genannten Zellen eine zentrale Rolle bei der Pigmentation, beim Schutz der Haut, und sie bedingt auch proinflammatorische Effekte.

Für die Hautpigmentierung ist die Interaktion zwischen den Melanozyten, die melaninhaltige Melanosomen produzieren, und den differenzierten Keratinozyten, die PAR-2 exprimieren, essentiell. Melanosomen werden zu den Dendriten der Melanozyten transferiert und dann von den Keratinozyten durch Phagozytose aufgenommen. Dieser Prozess wird durch die Aktivierung von PAR-2 auf Keratinozyten durch PAR-2 aktivierende Proteasen gesteuert. So konnte an mit menschlicher Haut transplantierten Mäusen beobachtet werden, dass die topische Applikation von PAR-2 AP die Haut deutlich sichtbar dunkler werden ließ. Im Kontrast dazu zeigte eine Inhibierung der PAR-2 Aktivierung mittels eines Serin Protease Inhibitors eine histochemisch nachweisbare Aufhellung der Haut von Schweinen (68, 69).

Somit kontrollieren differenzierte Keratinozyten durch Ihre PAR-2 Expression und dessen Aktivierung u. a. die Pigmentierung der Haut und verdeutlichen damit die von uns betonte Stellung des Rezeptors im Zusammenhang mit Zelldifferenzierung.

Durch die oben beschriebene Phagozytose der differenzierten Keratinozyten, die bei PAR-2 Aktivierung vermehrt stattfindet, kann diesen „Nichtimmunzellen“ eine Rolle beim Schutz der Haut zugeschrieben werden, denn natürlich werden nicht nur Melanosomen phagozytiert, sondern auch Stoffe, die bei einer Entzündung und bei Wundheilung anfallen (69).

Wie auch schon weiter oben für den Dickdarm beschrieben, konnte im Entzündungsmodell (Versuchstiere: Ratten und Mäuse) ein Zusammenhang zwischen einer PAR-2 Aktivierung auf differenzierten Zellen und der entsprechenden Hautreaktion hergestellt werden und damit die Wichtigkeit dieses Rezeptors auch in diesem Organ und dessen Homöostase hervorgehoben werden.

Differenzierte PAR-2 exprimierende primär afferente Spinalneuronen, die die Haut innervieren, schütten nach einem Stimulus durch PAR-2 AP verschiedene Neuropeptide wie Substanz P und CGRP (Calcitonin-ge-nereltes Polypeptid = engl. calcitonin gene-related peptide) aus, die zusammen eine neurogene Entzündung der Haut hervorrufen (73). Außerdem triggert diese Signalkaskade eine prolongierte mechanische und thermale somatische Hyperalgesie (81).

Des Weiteren kann Hautjuckreiz, der u. a. ein Symptom der atopischen Dermatitis ist, eine Folge von einer PAR-2 Aktivierung auf sensorischen Hautnerven sein. Diese Krankheit ist mit einer Hochregulation von PAR-2 auf den Nervenzellen und einer vermehrten Ausschüttung von Tryptase, einer PAR-2 aktivierenden Protease, verbunden. So konnte festgestellt werden, dass kutane Applikation von diesen Proteasen zu einem prolongierten Juckreiz führt, auch wenn zuvor Antihistaminika verabreicht worden waren. So kann diese Beteiligung von differenzierten PAR-2 exprimierenden Zellen an der Pathogenese der atopischen Dermatitis der Grund dafür sein, dass Patienten, die an dieser Krankheit leiden, nur schlecht auf Antihistaminika ansprechen (72).

Hier zeigt sich erneut, wie entscheidend auch bei der Entstehung von Pathologie die Expression von PAR-2 durch differenzierte Zellen ist.

5.6. Therapieausblicke

Weiter oben wurde bereits in den verschiedenen Geweben die Beteiligung des besonders von differenzierten Zellen exprimierten PAR-2 an der Entstehung von Krankheit beschrieben. U. a. ist PAR-2 und dessen Aktivierung durch PAR-2 aktivierende Proteasen wie z.B. Trypsin an intestinaler Inflammation, an der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, an der Entstehung von

viszeralem Schmerz und auch an intestinaler Tumorentstehung bzw. -progredienz beteiligt. In der Lunge besteht ein Zusammenhang mit Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und pulmonaler Fibrose. In der Haut besteht eine Beziehung zur Pathologie der atopischen Dermatitis sowie zur Entstehung von neurogener Entzündung.

Aber auch physiologische bzw. protektive Prozesse werden durch eine PAR-2 Aktivierung auf differenzierten Zellen initiiert. Somit bietet dieser Rezeptor ein interessantes Ziel für medikamentöse Therapien in sowohl agonistischer wie auch in antagonistischer Form.

Einige Beispiele hierfür sind die durch PAR-2 Aktivierung hervorgerufene Bronchodilatation bei Mäusen, Guinea Schweinen und Menschen. Diese prostanoidvermittelte Reaktion differenzierter Lungeneithelien muss zweifelsohne als starke Bronchoprotektion angesehen werden (15).

In diesem Zusammenhang muss auch die Beobachtung erwähnt werden, dass eine PAR-2 Aktivierung mittels SLIGRL auf differenzierten Pneumozyten einen durch bakterielle Lipopolysaccharide hervorgerufenen Einfluss von neutrophilen polymorphonukleären Leukozyten potent verhindert und somit PAR-2 Agonisten als nützliche therapeutische Agenzien bei der Behandlung von inflammatorischen pulmonalen Erkrankungen identifiziert (52).

Weitere nützliche therapeutische Optionen können PAR-2 Agonisten bei der Verhinderung von Magengeschwüren durch Anregung der Mucussekretion sein (36), sowie bei der Behandlung von entzündlichen Dickdarmerkrankungen, wo bereits bei einer experimentell erzeugten Colitis die Wirksamkeit von PAR-2 Liganden nachgewiesen wurde (26).

Auch bei der Behandlung von Myokardinfarkten könnten in der Zukunft PAR-2 AP zum Einsatz kommen. So konnte im Tiermodell (Versuchstier: Ratte) anhand einer durch Ischämie und anschließender Reperfusion verursachten myokardialen Verletzung PAR-2 AP eine protektive Rolle zugeordnet werden. Erstmals wurde gezeigt, dass eine PAR-2 Aktivierung auf differenzierten Myozyten das Herz vor einer Reperfusionsverletzung schützt. Dies war erkennbar an der signifikanten Verbesserung der myokardialen Funktion, nachdem PAR-2 AP infundiert wurden. Darüber hinaus reduzierten sich die ischämische Risikozone und Ausschüttung der Kreatinkinase (CK).

Außerdem verbesserte sich durch die PAR-2 Aktivierung die postischämische Remodellierung und es konnte im Rattenherz histologisch eine reduzierte kardiale Entzündungsreaktion festgestellt werden (54, 55).

Auf der anderen Seite muss festgestellt werden, dass gerade bei der Behandlung oben genannter Erkrankungen auch für Therapeutika in PAR-2 antagonistischer Form bzw. Protease-Inhibitoren eine Wirksamkeit nachgewiesen wurde. So wurde z.B. an Schafen erfolgreich ein Mastzelltryptase-Inhibitor getestet. 16 an mildem atopischem Asthma leidenden Tieren, die alle auf einen Histaminreiz eine frühe antigen-induzierte allergische Reaktion, eine späte allergische Reaktion und eine bronchiale Überreaktion zeigten, wurde per Aerosol ein Tryptase-Inhibitor verabreicht. Somit konnte vermutlich keine Tryptase bzw. Trypsin den von differenzierten Pneumozyten exprimierten PAR-2 aktivieren. Als Folge konnte vor allem eine signifikante Verringerung des Ausmaßes der späten allergischen Reaktion festgestellt werden (43).

Ebenso wurden in einer Studie Patienten, die an einer milden oder moderat aktiven Colitis ulcerosa litten, der hochspezifische Tryptase-Inhibitor APC 2059 verabreicht.

Eine tryptaseinduzierte PAR-2 Aktivierung auf differenzierten Enterozyten konnte somit wahrscheinlich nicht oder nur gering erfolgen.

Bei vielen Patienten konnte eine Verbesserung der Krankheitssituation festgestellt werden, ohne dass es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kam (79).

Wie schon weiter oben beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass PAR-2 und dessen Aktivierung hauptsächlich mittels Trypsin zusammen mit co-aktivierten Proteinkaskaden (MAPK-ERK Weg, Transaktivierung des Epidermal-Growth-Factor Rezeptor) an der Entstehung von intestinalen Tumoren (vornehmlich Colon und Magen) beteiligt ist, ein Wachstumsfaktor ist und an der Konversion vom Adenom zum Karzinom Anteil hat. Einige Tumoren produzieren sogar selbst Trypsin in Konzentrationen, die ausreichen, um PAR-2 zu aktivieren. Darüber hinaus haben solche kolorektalen Karzinome eine schlechtere Prognose und eine kürzere symptomfreie Überlebenszeit (22, 24, 70).

Vor diesem Hintergrund erscheint zumindest eine unterstützende Therapie mit PAR-2 Antagonisten oder Inhibitoren von PAR-2 aktivierenden Proteasen möglich bzw. sinnvoll. So ist es vorstellbar, dass durch derartige Medikamente die Entstehung oder der Progress von Tumoren verhindert und/oder verzögert werden kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich aus diesem Wissen vielfältige Therapieoptionen erschließen und PAR-2 Agonisten und Antagonisten in der Zukunft nützliche Medikamente bei der Behandlung von unterschiedlichsten Erkrankungen werden können. Es ist momentan noch schwer zu erkennen, ob für eine bestimmte Erkrankung spezifische Medikamente hergestellt werden können, da eine PAR-2 Aktivierung oder Inhibierung in die Gesamthomöostase des Körpers eingreifen kann und damit unter Umständen zu Nebenwirkungen führt, die den Nutzen des Medikaments aufheben.

Außerdem erzielten, wie in oben genannten Ausführungen erwähnt, in unterschiedlichen Versuchen Agonisten und Antagonisten von PAR-2 den gleichen Effekt. Als konkretes Beispiel sei hier noch einmal der Einsatz bei einer Colitis genannt. Sowohl Agonist als auch Antagonist bewirkten eine Verbesserung der Entzündungssituation (26, 79). Hier muss in Zukunft sicher noch genauer nachgeforscht werden, in welcher Situation oder unter welchen Umständen entsprechende Therapeutika eingesetzt werden können.

Das Wissen, dass gerade differenzierte (Epithel-) Zellen vermehrt PAR-2 exprimieren könnte dabei hilfreich sein. So ist es denkbar, dass aufgrund dieser Tatsache vor allem eine lokale Applikation von Medikamenten, die PAR-2 entweder inhibieren oder aktivieren sinnvoll ist, da ein direkter Wirkungseintritt erzielt werden könnte. Vorstellbar ist bei einer systemischen Gabe, dass durch eine agonistische oder antagonistische Wirkweise weitere Aktivierungskaskaden (Prostaglandinsynthese, MAP-ERK Weg, Aktivierung von Metalloproteinasen) initiiert werden und damit die direkten PAR-2 Effekte verschleiern. Dennoch könnte auch diese Applikationsform z.B. bei der Therapie von Tumoren sinnvoll sein, da hier häufig lokale Maßnahmen z.B. aufgrund der Lokalisation des Tumors nicht möglich oder weniger effektiv sind.

Schlussfolgernd zeigt sich also, dass PAR-2 an einer Vielzahl von physiologischen wie auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist und durch seine Aktivierung oder Hemmung häufig sogar der Ausgangspunkt für diese Vorgänge zu sein scheint. Unsere Feststellung, dass besonders bei differenzierten Zellen, die in den verschiedenen Kompartimenten spezielle Aufgaben haben, eine erhöhte PAR-2 Expression zu verzeichnen ist, unterstützt die wichtige Position von PAR-2, da bekanntermaßen diese Zellen den größten Teil der Stoffwechselfvorgänge (mit häufiger Beteiligung von PAR-2) initiieren oder ausführen.

6. Zusammenfassung

Der G-Protein-gekoppelte Proteinase-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) wird insbesondere von intestinalen Epithelzellen exprimiert und im jeweiligen Abschnitt des Gastrointestinaltrakts z.B. durch Trypsin oder Mastzelltryptase aktiviert.

PAR-2 spielt hier bei der Homöostase eine wichtige Rolle, da seine Aktivierung in direkter oder über Zwischenschritte in indirekter Weise Einfluss auf vielerlei Stoffwechselfvorgänge hat.

Aber auch in anderen Geweben (z.B. Pankreas, Niere, Leber, Atemwege und Haut) wurde PAR-2 nachgewiesen und übernimmt hier ebenfalls wichtige Funktionen (9, 17, 42).

Im Intestinaltrakt haben differenzierte Epithelzellen eine Vielzahl von Aufgaben wie z.B. Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltsregulation, Sekretion von Verdauungsenzymen und Protektion bei mikrobiellem und parasitärem Befall. Unser Interesse war daher, die Genexpression von PAR-2 abhängig vom Differenzierungsgrad intestinaler Epithelien darzustellen und einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen und anderen Aufgaben und dem Rezeptor aufzuzeigen.

Um ein möglichst umfassendes Bild abzugeben, wurden in Zellkulturexperimenten verschiedene intestinale Zelllinien (HT29, Caco2, IEC-6 Cdx2, hBRIE 380) zur Differenzierung angeregt und anschließend mittels quantitativer RT-PCR die Genexpression abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen gemessen. Analoge Messungen wurden auch an Gewebeproben aus dem humanen Intestinaltrakt und dem Dünndarm der Maus durchgeführt.

Als Differenzierungsmarker wurde die Gene *hsSI* und *Cdx2*, die bekanntermaßen spezifisch im differenzierten Kompartiment der intestinalen Krypte-Villus Achse exprimiert werden, eingesetzt. Des Weiteren wurde in den Zellkulturexperimenten mittels Enzym-Assay die Enzymaktivität der Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) bestimmt, da man weiß, dass höher differenzierte Zellen eine vermehrte Enzymaktivität aufweisen (6, 47, 78).

Die Resultate unserer Experimente und Messungen zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen Zelldifferenzierung und Höhe der PAR-2 Genexpression: PAR-2 wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermehrt durch differenzierte Epithelzellen des Intestinaltraktes exprimiert.

Führt man sich nun die Aufgaben und Funktionen differenzierter Epithelien in den einzelnen Abschnitten des Intestinaltraktes vor Augen und prüft dann eine mögliche Beteiligung von PAR-2, so stellt sich die besondere Position dieses Rezeptors dar: Im Magen triggern PAR-2 aktivierende Proteasen die Sekretion von gastroprotektivem Mucus aus differenzierten Nebenzellen. Außerdem supprimiert eine PAR-2 Aktivierung, ebenfalls gastroprotektiv, die Säure-Sekretion aus differenzierten Belegzellen und erhöht die Durchblutung der Schleimhaut über mehrere Zwischenschritte (37).

Des Weiteren schütten differenzierte Hauptzellen nach PAR-2 Aktivierung die Propeptidase Pepsinogen aus, welche nach Spaltung durch Salzsäure eine wichtige Rolle bei der Proteinverdauung spielt (25, 32, 37, 40).

Im Dünndarm bewirkt die Aktivierung von PAR-2 auf differenzierten Enterozyten vor allem die Sekretion von Prostaglandinen, die die Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion sowie Wachstum und Blutfluss regulieren und außerdem bei Entzündung und Zytprotektion vermitteln (42). So schützen z.B. Prostaglandinanaloga vor mukosalem Schaden durch 5-Fluoruracil oder durch Methotrexat. Prostaglandin E₂ spielt eine Rolle bei der postnatalen intestinalen Reifung (30, 33, 50).

PAR-2-Aktivierung führt außerdem über die Generation von Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat (InsP₃), welches für den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration verantwortlich ist, über Zwischenschritte zu entscheidenden Stoffwechselveränderungen in differenzierten Dünndarmenterozyten (42, 46).

Weiterhin stehen differenzierte Enterozyten, wie ebenfalls im Magen beobachtet, im Dünndarm durch PAR-2 Aktivierung mit motilitätsmodulierenden Mechanismen in Verbindung (2, 38, 39, 85).

Wie auch im Magen und Dünndarm ist PAR-2 im Dickdarm an der Motilität und deren Zunahme z.B. bei entzündlichen Prozessen beteiligt. Bei einem mukosalen Trauma mit Plasmaexsudation oder einem entzündlichen Ereignis mit Mastzelledegranulation steigt die Konzentration der endogenen PAR-2 aktivierenden Proteasen wie Tryptase und Thrombin und diese können suffizient den von den differenzierten Enterozyten vermehrt exprimierten PAR-2 aktivieren. Die nun nachfolgende mechanische Antwort auf diese Aktivierung in Form von Kontraktionen der longitudinalen Muskulatur und gleichzeitiger Hemmung der Kontraktilität der zirkulären Muskulatur könnte den Zweck haben, das trauma- oder inflammationauslösende Agens möglichst schnell aus dem

intestinalen Lumen zu entfernen und scheint eine entscheidende Rolle bei der während Entzündungsprozessen beobachteten erhöhten Darmmotilität zu spielen (8, 53).

Studien, die sich mit Entzündungsmodellen beschäftigen, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Rolle von PAR-2. Zum einen wird PAR-2 als ein antiinflammatorischer Rezeptor im Colon identifiziert, zum anderen führt eine PAR-2 Aktivierung zu Inflammation. Wird z.B. Trypsin oder SLIGRL-NH₂ (PAR-2 AP) in entsprechender Dosis in das Lumen des gesunden Colons der Maus appliziert, resultiert daraus bei Wildtypmäusen, aber nicht bei PAR-2-defizienten Mäusen, ausgehend von den apikalen Kryptenanteilen eine generalisierte Entzündungsreaktion. Unter Umständen sind noch andere Faktoren an diesen Prozessen beteiligt, die in bestimmten Situationen entweder zu einer Inflammation oder zu Heilungsprozessen führen. Diese Daten sind sicher von großer Relevanz bei der Pathophysiologie von entzündlichen Darmerkrankungen (12, 13, 14).

Weitere Studienergebnisse identifizieren den von differenzierten Colonenterozyten exprimierten PAR-2 als einen bei der Genese von viszeralem Schmerz wichtige Rolle spielenden Rezeptor (16).

Die Beobachtung, dass diverse humane Colonkarzinomzelllinien, die PAR-2 exprimieren, auf eine Aktivierung dieses Rezeptors mittels Trypsin mit Proliferation reagieren, und dass bei der colorektalen Karzinogenese Trypsin und PAR-2 in einer autokrinen Schleife zusammenspielen, zeigt, dass differenzierte intestinale Epithelzellen oder Tumoren, die vermehrt PAR-2 exprimieren, bösartig entarten können, bzw. zu Proliferation und Metastasierung angeregt werden. Dies gilt nicht nur im Colon, sondern u. U. auch im Magen. Hier konnte die PAR-2 Expression von PAR-2 positiven Karzinomen als negativer Prädiktor identifiziert werden (11, 21, 22, 29, 49, 70).

Um die Position von PAR-2 weiter hervorzuheben, sei auch auf dessen Stellung in anderen Geweben hingewiesen. Beispielhaft seien hier Lungenepithel und die Haut genannt. Der Rezeptor wird in der Lunge u. a. von zilien- und nichtzilientragenden Epithelien (besonders auf der apikalen Membran) exprimiert und hat Anteil an der Regulierung des Atemwegwiderstandes, des Elektolyttransportes und spielt eine Rolle bei Entzündung, bei allergischer Reaktion, bei Asthma bronchiale und der Entstehung von Fibrose (2, 5, 15, 19, 25, 44, 51).

Der von uns erstellte Zusammenhang zwischen Differenzierung einer Zelle und damit verbundenen erhöhten PAR-2 Expression lässt sich auch in der Haut nachvollziehen. Dort exprimieren vor allem differenzierte Zellen wie Keratinozyten und sensorische

kutane Nerven PAR-2. Der Rezeptor spielt hier eine Rolle bei der Pigmentation, beim Schutz der Haut (Phagozytose) und bedingt auch proinflammatorische Effekte (62, 68, 69, 71, 72, 73, 81)

Aufgrund der Beteiligung des besonders von differenzierten Zellen exprimierten PAR-2 an der Entstehung von Krankheit, aber auch an physiologischen bzw. protektiven Prozessen, ist dieser Rezeptor ein interessantes Ziel für medikamentöse Therapien in sowohl agonistischer wie auch in antagonistischer Form.

PAR-2 Agonisten könnten z.B. ihren Einsatz als Bronchodilatoren und als antiinflammatorische Agenzien bei pulmonaler Entzündung finden (15, 52).

Bei der Behandlung von Magengeschwüren wären PAR-2 Liganden einsetzbar, da sie die Mucusproduktion anregen und die Säureproduktion hemmen, u. U. könnten sie von Nutzen bei der Therapie der Colitis sein (26, 36).

Interessanterweise bewirkten PAR-2 aktivierende Proteasen ein besseres „postmyokardinfarkt Outcome“, so dass auch hier in der Zukunft mit Therapieoptionen gerechnet werden kann (54, 55).

Andererseits zeigen aber auch PAR-2 Antagonisten bzw. Inhibitoren von PAR-2 aktivierenden Proteasen ihre Wirksamkeit. Denkbar sind auch hier Einsätze bei atopischem Asthma sowie bei der Colitis ulcerosa (43, 79).

Vor dem Hintergrund, dass PAR-2 und dessen Aktivierung zusammen mit co-aktivierten Proteinkaskaden an der Entstehung von intestinalen Tumoren (vornehmlich Colon und Magen) beteiligt ist, ein Wachstumsfaktor ist und an der Konversion vom Adenom zum Karzinom Anteil hat, erscheint zumindest eine unterstützende Therapie mit PAR-2 Antagonisten oder Inhibitoren von PAR-2 aktivierenden Proteasen möglich bzw. sinnvoll. So ist es vorstellbar, dass durch derartige Medikamente die Entstehung oder der Progress von Tumoren verhindert und/oder verzögert werden kann (22, 24, 70). Schlussfolgernd zeigt sich also, dass PAR-2 an einer Vielzahl von physiologischen wie auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist oder auch durch seine Aktivierung oder Hemmung der Ausgangspunkt für diese Vorgänge ist. Unsere Feststellung, dass besonders bei differenzierten Zellen, die in den verschiedenen Kompartimenten spezielle Aufgaben haben, eine erhöhte PAR-2 Expression zu verzeichnen ist, unterstützt die wichtige Position von PAR-2, da bekanntermaßen diese Zellen den größten Teil der Stoffwechselfvorgänge (mit häufiger Beteiligung von PAR-2) initiieren oder ausführen.

7. Literaturverzeichnis

1. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ.
Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278(1):L193-201, 2000.
2. al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD.
Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle.
Can J Physiol Pharmacol 73(8):1203-7, 1995.
3. Aponte GW, Keddie A, Halldén G, Hess R, Link P.
Polarized intestinal hybrid cell lines derived from primary culture: establishment and characterization.
Proc Natl Acad Sci U S A 88(12):5282-6, 1991.
4. Bacher A, Griebel K, Mackamul S, Mitreiter R, Mückter H, Ben-Shaul Y.
Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines.
Exp Cell Res 200(1):97-104, 1992.
5. Berger P, Perng DW, Thabrew H, Compton SJ, Cairns JA, McEuen AR, Marthan R, Tunon De Lara JM, Walls AF.
Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells.
J Appl Physiol 91(3):1372-9, 2001.
6. Böhm SK, Gum JR Jr, Erickson RH, Hicks JW, Kim YS.
Human dipeptidyl peptidase IV gene promoter: tissue-specific regulation from a TATA-less GC-rich sequence characteristic of a housekeeping gene promoter.
Biochem J 311 (Pt 3):835-43, 1995.

7. Böhm SK, Khitin LM, Grady EF, Aponte G, Payan DG, and Bunnett NW. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 271: 22003–22016, 1996.
8. Böhm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 314 (Pt 3):1009-16, 1996.
9. Böhm SK, McConalogue K, Kong W, Bunnett NW. Proteinase-Activated Receptors: New Functions for Old Enzymes. *News Physiol Sci* 13:231-240, 1998.
10. Boren J, Lee WN, Bassilian S, Centelles JJ, Lim S, Ahmed S, Boros LG, Cascante M. The stable isotope-based dynamic metabolic profile of butyrate-induced HT29 cell differentiation. *J Biol Chem* 278(31):28395-402, 2003.
11. Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol* 169(1):268-78, 2006.
12. Cenac N, Chin AC, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N, Buret AG, Fioramonti J, Bueno L. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 558(Pt 3):913-25, 2004.

13. Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L, Vergnolle N.

Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2.

Am J Pathol 161(5):1903-15, 2002.

14. Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L.

Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability.

J Immunol 170(8):4296-300, 2003.

15. Cocks TM, Fong B, Chow JM, Anderson GP, Frauman AG, Goldie RG, Henry PJ, Carr MJ, Hamilton JR, Moffatt JD.

A protective role for protease-activated receptors in the airways.

Nature 398(6723):156-60, 1999.

16. Coelho AM, Vergnolle N, Guiard B, Fioramonti J, Bueno L.

Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats.

Gastroenterology 122(4):1035-47, 2002.

17. Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW.

Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2.

J Clin Invest 100(6):1383-93, 1997.

18. Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, Caughey GH, Hollenberg MD, Bunnett NW.

Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2.

J Physiol 517 (Pt 3):741-56, 1999.

19. Danahay H, Withey L, Poll CT, van de Graaf SF, Bridges RJ.
Protease-activated receptor-2-mediated inhibition of ion transport in human bronchial epithelial cells.
Am J Physiol Cell Physiol 280(6):C1455-64, 2001.
20. D'Andrea MR, Derian CK, Leturcq D, Baker SM, Brunmark A, Ling P, Darrow AL, Santulli RJ, Brass LF, Andrade-Gordon P.
Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues.
J Histochem Cytochem 46(2):157-64, 1998.
21. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M.
Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation.
J Biol Chem 279(20):20927-34, 2004.
22. Darmoul D, Marie JC, Devaud H, Gratio V, Laburthe M.
Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2.
Br J Cancer 85(5):772-9, 2001.
23. Domon-Dell C, Wang Q, Kim S, Keding M, Evers BM, Freund JN.
Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells.
Gut 50(4): 525-9, 2002.
24. Ducroc R, Bontemps C, Marazova K, Devaud H, Darmoul D, Laburthe M.
Trypsin is produced by and activates protease-activated receptor-2 in human cancer colon cells: evidence for new autocrine loop.
Life Sci 70(12):1359-67, 2002.
25. Fiorucci S, Distrutti E, Federici B, Palazzetti B, Baldoni M, Morelli A, Cirino G.
PAR-2 modulates pepsinogen secretion from gastric-isolated chief cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285(3):G611-20, 2003.

26. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL, Morelli A, Cirino G.
Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis.
Proc Natl Acad Sci U S A 98(24):13936-41, 2001.
27. Fogh J, Trempe G.
Human Tumor Cells in Vitro.
Plenum Publishing Corp., New York, 115-141, 1975.
28. Fogh J, Wright WC, Loveless JD.
Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.
J Natl Cancer Inst 58(2):209-14, 1977.
29. Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A.
Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer.
J Surg Oncol 93(2):139-44, 2006.
30. Gao F, Horie T.
Protective effect of prostaglandins on the methotrexate induced damage of small intestine in rats.
In Vivo 14(3):453-6, 2000.
31. Gaschott T, Werz O, Steinmeyer A, Steinhilber D, Stein J.
Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor.
Biochem Biophys Res Commun 288(3):690-6, 2001.
32. Golenhofen K.
Physiologie: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten.
Urban und Schwarzenberg, München; Wien; Baltimore: S. 367, 1997.

33. Hirata K, Horie T.
Stimulation of intestinal epithelial restitution by prostaglandin E(1) analogue.
Cancer Chemother Pharmacol 51(3):216-20, 2003.
34. Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E, Louvard D.
Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation.
J Cell Biol 105(1):345-57, 1987.
35. Jobin C, Behrns KE, Brenner DA.
Molecular and cellular biology of the small intestine.
Curr Opin Gastroenterol 15(2):103-7, 1999.
36. Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H, Arizono N, Oda Y, Kakehi K.
The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection.
J Clin Invest 107(11):1443-50, 2001.
37. Kawabata A, Kuroda R.
PAR (protease-activated receptor) as a novel target for development of gastric mucosal cytoprotective drugs.
Nippon Yakurigaku Zasshi 120(1):85P-87P, 2002.
38. Kawabata A, Kuroda R, Nagata N, Kawao N, Masuko T, Nishikawa H, Kawai K.
In vivo evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse.
Br J Pharmacol 133(8):1213-8, 2001.
39. Kawabata A, Kuroda R, Nishikawa H, Kawai K.
Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation.
Br J Pharmacol 128(4):865-72, 1999.

40. Kawao N, Sakaguchi Y, Tagome A, Kuroda R, Nishida S, Irimajiri K, Nishikawa H, Kawai K, Hollenberg MD, Kawabata A.

Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the rat gastric mucosa: immunolocalization and facilitation of pepsin/pepsinogen secretion.

Br J Pharmacol 135(5):1292-6, 2002.

41. Kirkup AJ, Jiang W, Bunnett NW, Grundy D.

Stimulation of proteinase-activated receptor 2 excites jejunal afferent nerves in anaesthetised rats.

J Physiol 552(Pt 2):589-601, 2003.

42. Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Böhm SK, Bunnett NW.

Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2.

Proc Natl Acad Sci U S A 94(16):8884-9, 1997.

43. Krishna MT, Chauhan A, Little L, Sampson K, Hawksworth R, Mant T, Djukanovic R, Lee T, Holgate S.

Inhibition of mast cell tryptase by inhaled APC 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma.

J Allergy Clin Immunol 107(6):1039-45, 2001.

44. Kunzelmann K, Schreiber R, König J, Mall M.

Ion transport induced by proteinase-activated receptors (PAR2) in colon and airways.

Cell Biochem Biophys 36(2-3):209-14, 2002.

45. Löffler G, Petrides P.

Biochemie und Pathobiochemie.

Springer, Berlin; Heidelberg; New York, 6. korrigierte Auflage: S. 441-445, 1998.

46. Löffler G, Petrides P.

Biochemie und Pathobiochemie.

Springer, Berlin; Heidelberg; New York, 6. korrigierte Auflage: S. 777, 1998.

47. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN.
Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation.
J Cell Biol 139(6):1553-65, 1997.
48. Lorrot M, Benhamadouche-Casari H, Vasseur M.
Mechanisms of net chloride secretion during rotavirus diarrhea in young rabbits: do intestinal villi secrete chloride?
Cell Physiol Biochem 18(1-3):103-12, 2006.
49. MacNaughton WK.
Epithelial effects of proteinase-activated receptors in the gastrointestinal tract.
Mem Inst Oswaldo Cruz 100 Suppl 1:211-5, 2005.
50. Marti A, Fernandez-Otero MP.
Prostaglandin E2 accelerates enzymatic and morphological maturation of the small intestine in suckling rats.
Biol Neonate 65(2):119-25, 1994.
51. Matsushima R, Takahashi A, Nakaya Y, Maezawa H, Miki M, Nakamura Y, Ohgushi F, Yasuoka S.
Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290(2):L385-95, 2006.
52. Moffatt JD, Jeffrey KL, Cocks TM.
Protease-activated receptor-2 activating peptide SLIGRL inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced recruitment of polymorphonuclear leukocytes into the airways of mice.
Am J Respir Cell Mol Biol 26(6):680-4, 2002.

53. Mulè F, Baffi MC, Cerra MC.

Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon.

Br J Pharmacol 136(3):367-74, 2002.

54. Napoli C, Cicala C, Wallace JL, de Nigris F, Santagada V, Caliendo G, Franconi F, Ignarro LJ, Cirino G.

Protease-activated receptor-2 modulates myocardial ischemia-reperfusion injury in the rat heart.

Proc Natl Acad Sci U S A 97(7):3678-83, 2000.

55. Napoli C, De Nigris F, Cicala C, Wallace JL, Caliendo G, Condorelli M, Santagada V, Cirino G.

Protease-activated receptor-2 activation improves efficiency of experimental ischemic preconditioning.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 282(6):H2004-10, 2002.

56. Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo C, Koh DS, Bunnett NW.

Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2.

J Clin Invest 103(2):261-9, 1999.

57. Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strombeck B, Sundelin J.

Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2.

Europ J Biochem 232, 84-89, 1995.

58. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J.

Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A 91(20):9200-2, 1994.

59. Ossovskaya VS, Bunnett NW.

Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease.

Physiol Rev 84(2):579-621, 2004.

60. Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P, Beaulieu JF.
Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis.
Microsc Res Tech 49(4):394-406, 2000.
61. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ.
Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria.
J Cell Biol 80(2):248-65, 1979.
62. Rattenholl A, Steinhoff M.
Role of proteinase-activated receptors in cutaneous biology and disease.
Drug Development Research 59 (4) 408 – 416, 2003
63. Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF, Bunnnett NW, Vanner SJ.
Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons.
J Physiol 547(Pt 2):531-42, 2003.
64. Renz-Polster H, Braun J.
Basislehrbuch Innere Medizin
Urban & Fischer Verlag, München; Jena, 2. Auflage, S. 535- 537, 2001.
65. Ricciardolo FL, Steinhoff M, Amadesi S, Guerrini R, Tognetto M, Trevisani M, Creminon C, Bertrand C, Bunnnett NW, Fabbri LM, Salvadori S, Geppetti P.
Presence and bronchomotor activity of protease-activated receptor-2 in guinea pig airways.
Am J Respir Crit Care Med 161(5):1672-80, 2000.

66. Rousset M.

The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation.

Biochimie 68(9):1035-40, 1986.

67. Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW, Gater PR, Geppetti P, Bertrand C, Stevens ME.

Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway.

J Immunol 169(9):5315-21, 2002.

68. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, Shapiro SS.

The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions.

Exp Cell Res 254(1):25-32, 2000.

69. Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M.

The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis.

J Cell Sci 113 (Pt 17):3093-101, 2000.

70. Soreide K, Janssen EA, Korner H, Baak JP.

Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis.

J Pathol 209(2):147-56, 2006.

71. Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW.

Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase.

Exp Dermatol 8(4):282-94, 1999.

72. Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M.

Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin.

J Neurosci 23(15):6176-80, 2003.

73. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW.

Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism.

Nat Med 6(2):151-8, 2000.

74. Stevens A, Lowe J.

Histologie des Menschen.

Chapman and Hall, London; Glasgow; Weinheim, 2. Auflage, S. 165-167, 1997.

75. Stevens A, Lowe J.

Histologie des Menschen.

Chapman and Hall, London; Glasgow; Weinheim, 2. Auflage, S. 197-201, 1997.

76. Stevens A, Lowe J.

Histologie des Menschen.

Chapman and Hall, London; Glasgow; Weinheim, 2. Auflage, S. 204-205, 1997.

77. Stevens A, Lowe J.

Histologie des Menschen.

Chapman and Hall, London; Glasgow; Weinheim, 2. Auflage, S. 208-209, 1997.

78. Suh E, Traber PG.

An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation.

Mol Cell Biol 16(2):619-25, 1996.

79. Tremaine WJ, Brzezinski A, Katz JA, Wolf DC, Fleming TJ, Mordenti J, Strenkoski-Nix LC, Kurth MC; AXYS Ulcerative Colitis Study Group.
Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): an open-label pilot study.
Aliment Pharmacol Ther 16(3):407-13, 2002.
80. Vergnolle N
Review article: proteinase-activated receptors - novel signals for gastrointestinal pathophysiology.
Aliment Pharmacol Ther 14(3):257-66, 2000.
81. Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL.
Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway.
Nat Med 7(7):821-6, 2001.
82. Vergnolle N, Macnaughton WK, Al-Ani B, Saifeddine M, Wallace JL, Hollenberg MD.
Proteinase-activated receptor 2 (PAR2)-activating peptides: identification of a receptor distinct from PAR2 that regulates intestinal transport.
Proc Natl Acad Sci U S A 95(13):7766-71, 1998.
83. Wächtershäuser A, Loitsch SM, Stein J.
PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate.
Biochem Biophys Res Commun 272(2):380-5, 2000.
84. Wallace JL.
Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease.
Gastroenterol Clin North Am 30(4):971-80, 2001.
85. Zhao A, Shea-Donohue T.
PAR-2 agonists induce contraction of murine small intestine through neurokinin receptors.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285(4):G696-703, 2003.

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanfy, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fruhstorfer, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Klenk, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lammel, Lang, Lorenz, Maier, Maisch, Moll, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seitz, Seyberth, Slenczka, Stempel, Suske, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Stephan Böhm für die Überlassung des Themas und die vielen wertvollen Hinweise.

Außerdem gebührt Frau Annegret Bosshammer ein großer Dank für Ihre unterstützende Hilfe im Labor sowie für ihr Organisationstalent, durch das viele Engpässe umgangen werden konnten.

Mein ganz besonderer Dank gilt der AG Böhm, mit der ich mitunter tage- und nächtelang im Labor verbracht habe und mit deren Hilfe und Unterstützung in Phasen von Frustration und „laborchemischen Rückschlägen“ sicherlich die Vollendung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Danke Michael, danke Marcus.

Nicht zuletzt gehört mein Dank meiner Familie, die mich während des gesamten Medizinstudiums und darüber hinaus in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.