

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

Expression von membranständigen Proteasen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Michael Himpel
aus Ueckermünde

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 10.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: PD Dr. S. Böhm
Korreferent: Prof. Dr. Dr. A. Neff

Meiner Frau Anita und meinem Sohn Max, meinen Eltern sowie meinem besten Freund
Lars in Liebe, Dankbarkeit und Freundschaft gewidmet.

1. Einleitung	3
1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - M. Crohn & Colitis ulcerosa	3
1.2. Die PAR Familie	9
1.2.1. Expressionsmuster der Protease-aktivierten Rezeptoren	10
1.2.2. Signaltransduktion	11
1.2.3. Desensibilisierung	12
1.2.4. PAR2 aktivierende Proteine	15
1.3. Die Familie der membranständigen Proteasen – TTSP	16
1.3.1. Die HAT/DESC Familie	18
1.3.2. Corin	18
1.3.3. Die Hepsin/ TMPRSS Familie	18
1.3.4. Die Matriptase Familie	21
2. Materialien und Methoden	23
2.1. Materialien	23
2.1.1. M. Crohn und Colitis ulcerosa Patienten Proben	23
2.1.2. RNA-Isolierung	23
2.1.3. cDNA Synthese	24
2.1.4. Quantitative Real-Time-PCR	25
2.1.5. Konventionelle PCR	25
2.1.6. Gelelektrophorese	25
2.2. Methoden	27
2.2.1. M. Crohn und Colitis ulcerosa Patienten Proben	27
2.2.2. RNA-Isolierung	27
2.2.3. cDNA Synthese	28
2.2.4. Quantitative Real-Time-PCR	29
2.2.5. Konventionelle PCR	31
2.2.6. Gelelektrophorese	31
2.2.7. Statistische Testverfahren	32

3. Ergebnisse	33
3.1. Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn	34
3.2. Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa	42
3.3. Zusammenfassung Darmbiopsien	50
4. Diskussion	54
5. Literaturverzeichnis	64
6. Herstellerverzeichnis	83
7. Zusammenfassung	85
8. Verzeichnis der akademischen Lehrer	87
9. Danksagung	88

1. Einleitung

1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - M. Crohn und Colitis ulcerosa

Die Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa gehören zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Diese Erkrankungen stehen wegen ihres langen, schweren und teilweise mit multiplen Komplikationen einhergehenden Verlaufes seit geraumer Zeit im Fokus der Wissenschaft. Sie sind durch eine diskontinuierliche, segmentale im ganzen Gastrointestinaltrakt alle Wandschichten betreffende Entzündung (M. Crohn) bzw. eine kontinuierliche, die oberflächlichen Schleimhautschichten mit einbeziehende Entzündung (Colitis ulcerosa) charakterisiert. Die Hauptlokalisation für Läsionen bei M. Crohn liegt im terminalen Ileum bzw. proximalen Colon, die der Colitis ulcerosa befindet sich immer im Rectum und dehnt sich nachfolgend nach proximal aus. Die Hauptkomplikationen des M. Crohn liegen in Stenosen des Darmes, Fistelungen und Abszessen, bei der Colitis ulcerosa in Blutungen und einem im Vergleich zum M. Crohn weit erhöhten Entartungsrisiko begründet.

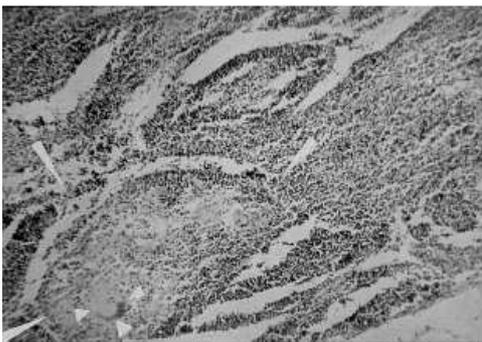


Abb.1. M.Crohn
mikroskopisch: granulomatöse Entzündung (Pfeil)



Abb.2. M.Crohn
makroskopisch: Stenose (Pfeile-groß)
Pflastersteinrelief (Pfeile-klein)



Abb.3. Colitis ulcerosa
makroskopisch: Verlust des Faltenreliefs
Pseudopolypen (Pfeil)

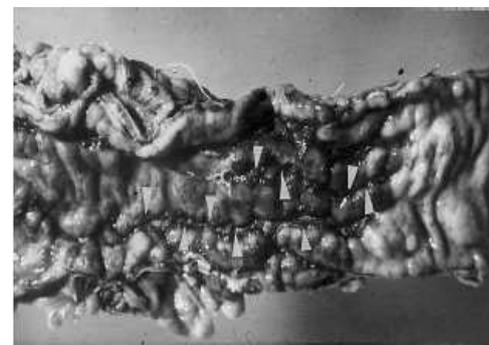


Abb.4. Colitis ulcerosa
makroskopisch: longitudinale Ulcerationen
(Pfeile)

Quelle: Karlinger K., Györke T., Makö E., Mester A., Tarján Z. (2000) - "The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. -" Eur J Radiol. 35, 154-162

Obwohl sie schon lange bekannt sind, konnte ihre genaue Ursache noch nicht bestimmt werden. Viele Studien befassten sich mit der Pathogenese der beiden Erkrankungen. So konnten in den Untersuchungen Indizien dargebracht werden, welche die Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung erhöhen. Unter anderem spielen geographische, ethnische bzw. genetische Faktoren sowie bestimmten Verhaltensweisen, Infektionen, genetischen Veränderungen, das Alter der Probanden sowie deren Geschlecht, virale bzw. bakterielle Infektionen sowie autoimmune Reaktionen eine entscheidende Rolle.

Im Auftreten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigte sich eine Häufung im Verlauf des Nord-Süd Gefälles, wobei im Norden eine höhere Inzidenz als im Süden gefunden werden konnte. Diese „Regel“ ist jedoch nicht nur auf Europa, sondern auch auf Amerika anwendbar (103, 106). Eine Lactoseunverträglichkeit, welche gehäuft in Afrika und in Asien auftritt, scheint ein Selektionsvorteil bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu sein. Populationen mit dieser Unverträglichkeit zeigen ein deutlich reduziertes Risiko einer Erkrankung (73).

Bestimmte Bevölkerungsgruppen zeigen ebenfalls eine verringerte Inzidenz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. So konnte dies für die in Ungarn lebenden Roma und Sinti bewiesen werden (53). Bei beiden Erkrankungen liegt der erste Erkrankungsgipfel zwischen 15 und 25 Jahren. Ein weitere Häufung dieser Erkrankungen tritt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf (11, 98). Im Hinblick auf die Geschlechter ist in der Verteilung ein geringes Überwiegen von männlichen Patienten bei Colitis ulcerosa und eine Häufung von weiblichen Erkrankten bei M. Crohn zu beobachten (81, 98).

Auch ist der Nachweis, dass Bestandteile der Nahrung bzw. deren Zusammensetzung als definitive Auslöser in Frage kommen, bis jetzt nicht erbracht. Jedoch ist der Konsum bestimmter Kohlenhydrate, vor allem raffinierte Zucker, Alkohole, bestimmte Fettsäuren und sogar von Ballaststoffen mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit in Zusammenhang gebracht worden (43, 53, 73, 115). Des Weiteren zeigen voll gestillte Kinder im Vergleich zu Kindern, welche Flaschennahrung erhielten, eine geringere Inzidenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Diese Kinder scheinen auch deutlich häufiger an chronischen Bronchitiden zu erkranken als die Vergleichspopulation (25, 36, 60). Möglicherweise ist eine unzureichende Präsentation von Antigenen mit der Flaschennahrung bzw. das Fehlen von Antikörpern aus der Muttermilch in der frühen Kindheit ein Faktor, der die Bereitschaft, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln, erhöht.

Neben Nikotin als möglichem Pathogen (25) werden orale Kontrazeptiva in der Genese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert. Es besteht die Hypothese, dass es durch die vasokonstriktive Wirkung von Nikotin bzw. durch die thrombogenen Eigenschaften der Kontrazeptiva zu einer Mikrothrombose mit nachfolgender lokaler Ischämie der Mucosa und anschließender erhöhter Wandpermeabilität und Eindringen von Gallensäuren sowie Mikroorganismen kommt (53).

Wegen der familiären Häufung von Erkrankungen wurde vielfach über eine genetische Prädisposition zur Ausbildung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spekuliert. Dies zeigt sich daran, dass ca. $\frac{1}{4}$ aller Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein ebenfalls betroffenes Familienmitglied aufweisen (53). Ebenfalls zeigen ca. 50-70% aller Erkrankten einen positiven Nachweis für HLA-B27 (86). So konnte am Beispiel des M. Crohn ein verdächtiges Gen lokalisiert werden. Dieses Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 16 (16q) und wird als NOD2/CARD15 bezeichnet. Bei M. Crohn Patienten konnte dort ein Gen-Polymorphismus nachgewiesen werden, der bei mehrfachem Vorhandensein das Risiko an M. Crohn zu erkranken auf das 20-40fache steigern kann. Alle diese Varianten zeigen eine verminderte Aktivierung von NF- κ B auf bakterielle Reize (7). Der Polymorphismus NOD2/CARD15 geht mit einer Häufung einer Ileitis, früherem Krankheitsbeginn und einer Neigung zu Strikturenbildung bei Patienten mit M. Crohn einher. Andere Polymorphismen auf Chromosom 12 und 6p konnten auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden (7). Dies wurde auch bei späteren Untersuchungen weiter positiv belegt (79, 92). Auch bestehen Parallelen zwischen den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der neurologischen Erkrankung Multiple Sklerose. Es gibt eine geringe, jedoch statistisch signifikant erhöhte Fallzahl von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Familien mit Multipler Sklerose (44).

Die Idee einer infektiösen Genese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhielt zum einen Unterstützung durch den Nachweis von *Escherichia coli* in Biopsieproben von Patienten mit Colitis ulcerosa (9) bzw. durch einen Anstieg der Inzidenz durch eine Infektion mit atypischen Paramyxoviren, wie dem Masern-Virus in der Kindheit (77). Jedoch wird von anderen Autoren keine Verbindung einer Maserninfektion mit dem Auftreten einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung propagiert (91).

Bei M. Crohn handelt es sich um eine teils ulcerative, teils granulomatöse Entzündung des Darmes. Granulomatös-ulceröse Entzündungen anderer Organe können zum

Beispiel durch *Mycobacterium leprae* i.B. der Haut oder durch *Mycobacterium bovis* i.B. des Darmes verursacht werden. Aus diesem Grund und mit dem pathohistologischen Korrelat einer granulomatösen Entzündung bei M. Crohn und dem Nachweis von *Mycobacterium kansasii* in mesenterialen Lymphknoten eines M. Crohn-Patienten geriet die Gruppe der Mycobakterien unter Verdacht am Auftreten der chronisch entzündlichen Darmerkrankung M. Crohn mitverantwortlich zu sein. Ebenfalls konnten in experimentellen Tiermodellen mit Mycobakterien granulomatöse Entzündungen des Darmes, ähnlich denen des M. Crohn ausgelöst werden (10, 23). Erstaunlich ist, dass 85% der untersuchten M. Crohn Patienten und 89% der Tuberkulose- bzw. Lepra-Patienten, jedoch nur 12% der Colitis ulcerosa Patienten einen positiven Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium paratuberculosis* aufwiesen (38).

Einen weiteren Ansatz zur Klärung der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lieferte die Annahme, dass es durch intraluminal befindliche pathogene Substanzen oder Mikroorganismen und ein gleichzeitiges Auftreten von Mikrotraumata zu einer Überwindung der epithelialen Barriere kommt. Die nachfolgende Stimulation von Makrophagen und T-Lymphozyten bewirkt eine Immunreaktion. Die, durch die körpereigene Immunabwehr bedingte Entzündungsreaktion führt zu einer weiteren Schädigung der Mucosa mit nachfolgend verstärkter Penetration von Pathogenen ins Gewebe. Die mündet schließlich in einer sich selbst unterhaltenden, chronischen (Auto)-Immunantwort (53). Eine weitere Studie an Mäusen untermauerte die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Tiere entwickelten durch eine Mutation eine chronische Colitis. Dies blieb jedoch bei Tieren, welche schon früh (innerhalb von 6 Wochen) appendektomiert wurden, aus (74). Weiter konnte gezeigt werden, dass 80% der Patienten mit Colitis ulcerosa zirkulierende Antikörper gegen Bestandteile von Neutrophilen aufweisen (100). Ob jedoch die Antikörper zu der Entwicklung des chronischen Geschehens beitragen, oder ob sie nur einen Marker für bestimmte pathogene Allergene darstellen, ist nicht bekannt (121). Ähnliches gilt für Patienten mit M. Crohn. Makrophagen und Endothelzellen sowie Leukozyten und sogar Hepatozyten scheinen an der immunvermittelten Entzündungsreaktion beteiligt zu sein (53). Eine Untersuchung aus dem Jahr 2004 kam zu dem Ergebnis, dass Leukozyten von M. Crohn Patienten eine geringere Produktion von IL-8 im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen (41). In einer weiteren Studie konnten zudem weitere Chemokine und Cytokine nachgewiesen werden, welche bei Patienten mit chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht waren. Unter anderem waren unter den genannten IL-1 β , IL-23 sowie das schon zuvor erwähnte IL-8 (107). Jedoch sind bei den beiden genannten Erkrankungen nicht nur der Magen-Darmtrakt, sondern auch andere Organe und Systeme betroffen. Unter anderem können die Erkrankungen die Haut (Dermatitis, Erythema nodosum), die Augen (Iridozyklitis, Episkleritis), das muskuloskelettale (Arthritis) sowie das urogenitale System (Urolithiasis) betreffen (53).

Wie bereits angesprochen, ist die Ursache der o.g. Erkrankungen bis heute nur unzureichend verstanden. Neben einer genetischen Prädisposition sowie Ernährungs- und Umweltfaktoren werden virale bzw. bakterielle Infektionen, eine gestörte Schleimhautbarriere, Entzündungsreaktionen und psychischer Stress für die Auslösung und Unterhaltung dieser Entzündungen diskutiert (62). Auf immunhistochemischer Ebene konnte z.B. eine verstärkte Expression des Protease-aktivierten Rezeptor 2 (PAR2) und von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) aufgezeigt werden. PAR2 ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, der unter anderem auch stark im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen wurde. Er gehört zur Gruppe der Protease-aktivierten Rezeptoren. Dies umfasst insgesamt vier Mitglieder (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4). PAR2 kann durch eine proteolytische Spaltung, z.B. durch Trypsin und Chymotrypsin, aber auch durch bestimmte membranständige Serin-Proteasen (TTSP) aktiviert werden.

Die oben erwähnte Studie untersuchte die Aktivierung von PAR2 durch die Mastzell-Tryptase. Dabei wurden 9 Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa mit 9 Gewebeproben von gesunden Patienten auf das Vorhandensein von PAR2 und TNF- α hin mittels Immunhistochemie verglichen (56). Zudem wurde in dieser Arbeit die Sekretion von TNF- α durch die humane Mastzell-Zelllinie HMC-1 (human leukemic mast cell line-1) nach der Aktivierung von PAR2 durch Trypsin, Tryptase und dem PAR2-aktivierenden Peptid SLIGRL näher beleuchtet. Es zeigte sich, dass bei den Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa deutlich mehr Zellen vorlagen, die PAR2 oder TNF- α exprimierten. Es konnte ebenfalls belegt werden, dass ca. 65% der in den Gewebeproben nachgewiesenen PAR2 positiven Zellen auch Tryptase-positive Zellen waren. 60% der TNF- α exprimierenden Zellen waren Tryptase-positive Mastzellen. Mastzellen wird dabei eine wichtige Rolle bei der Auslösung und der Unterhaltung von Entzündungen durch die Mastzell-Tryptase über die Aktivierung von PAR2 zugeschrieben.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Aktivierung von PAR2 entzündliche Prozesse ausgelöst werden können und es scheint, dass PAR2 durch seine beinahe ubiquitäre Expression für den Ablauf eines Entzündungsprozesses eine bedeutende Rolle spielt. PAR2 ist dabei für die Auslösung grundlegender Reaktionsmechanismen wie der Aktivierung von Mastzellen (31), neutrophilen (48) und eosinophilen (71) Granulozyten verantwortlich.

Bisherige Studien konnten zwar eine Mitwirkung von PAR2 und seinen regulierenden Genen PSTI und T8 bei der Auslösung und Modulation von Entzündungsprozessen *in vitro* bei intestinalen Epithelzellen bzw. *in vivo* bei Entzündungsmodellen im Tierversuch nachweisen, jedoch gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von PAR2 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen, wie z.B. M. Crohn oder Colitis ulcerosa, befassen. Für PAR2 kann zusammenfassend festgestellt werden, dass es durch die Aktivierung des Rezeptors zur Relaxation von Blutgefäßen (40), Hypotension (19, 89), vermehrter Adhäsion und Migration von Leukozyten (111) und Granulozyten (119), verstärkter Gefäßdurchlässigkeit mit Ödem (105) und zu neurogenen Schmerzen (112) kommt. Außerdem zeigte sich nach der Aktivierung von PAR2 ein Anstieg von Prostaglandinen und Cytokinen (109). Wie zuvor erwähnt, ist bei beiden Erkrankungen die genaue Ursache noch nicht eindeutig geklärt, jedoch werden bei beiden Erkrankungen Theorien über eine abnorme Immunreaktion, eine gestörte Schleimhautbarriere sowie bakterielle bzw. virale Infektionen diskutiert. Wir konnten in der Vergangenheit zeigen, dass es bei chronischen intestinalen *in vivo* Entzündungsreaktionen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa für PAR2 sowie für die ihn beeinflussenden Gene PSTI und T8 ein verändertes Expressionsmuster gibt.

1.2. Die PAR-Familie

Die Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR's) gehören zu einer in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts neu entdeckten Klasse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die, wie der Name andeutet, durch eine proteolytische Spaltung aktiviert werden (29). Bisher wurden vier Rezeptoren, PAR1 bis PAR4, entdeckt.

Der erste Rezeptor dieser Gruppe, PAR1, der Thrombin-Rezeptor, wurde bei Untersuchungen, die die Aktivierung von Thrombozyten näher beleuchten sollte, identifiziert.

Zwei Arbeitsgruppen klonierten den Rezeptor, der aus 425 Aminosäuren besteht und die für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor typischen 7 hydrophoben Domänen enthielt. Die Schnittstelle für Thrombin liegt zwischen Arginin⁴¹ und Serin⁴² (87, 95, 132).

Der zweite Protease-aktivierte Rezeptor, PAR2, wurde bei der Durchsichtung einer Gen-Bibliothek der Maus mittels eines Primers für die 6. bzw. 7. transmembranäre Domäne des bovinen Neurokinin-2 Rezeptors entdeckt. Der Klon kodierte für ein Protein, welches aus 395 Aminosäuren aufgebaut ist und wies zudem deutliche Eigenschaften eines Protease-aktivierten Rezeptors auf. Der PAR2 zeigte außerdem eine 30-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit der Sequenz des PAR1 Rezeptors. Das N-terminale Ende besteht aus 46 Aminosäuren, wobei zwischen Arginin³⁴ und Serin³⁵ die Schnittstelle für Trypsin zu finden ist (83, 84, 87).

Einer Arbeitsgruppe aus San Francisco gelang es, aus humaner cDNA den Protease-aktivierten Rezeptor 2 zu isolieren. PAR2 des Menschen besteht aus 1191 Basenpaaren, die für ein aus 397 Aminosäuren aufgebautes Protein kodieren. Der humane PAR2 ist zu 83 Prozent mit dem Maus-PAR2 (mPAR) identisch (6).

Die Erkenntnis, dass Thrombozyten von Mäusen, die kein mPAR1 exprimieren können, trotzdem auf Thrombin reagierten, während Fibroblasten, welche nachweislich ausschließlich PAR1 exprimieren, keinen Effekt aufzeigten (24, 87), legte die Theorie nahe, dass weitere Protease-aktivierte Rezeptoren existieren müssen.

Die Suche nach Homologen zwischen PAR1 und PAR2 Sequenzen in der RNA von Ratten-Thrombozyten führte zur Entdeckung von PAR3. Der humane Rezeptor PAR3 hat eine 28prozentige Ähnlichkeit mit dem humanen PAR1 bzw. PAR2 (49).

Wie PAR1 und PAR2 ist auch PAR3 ein charakteristischer G-Protein gekoppelter Rezeptor mit einer Thrombin-Schnittstelle im extrazellulären N-terminalen Ende zwischen Lysin³⁸ und Threonin³⁹ (87).

PAR-ähnliche Sequenzen wurden beim Screening von Sequenz-Datenbanken entdeckt (52, 87). Diese wurden für die Klonierung von PAR4 verwendet (140). Die Proteasen-Schnittstelle befindet sich bei PAR4 zwischen Arginin⁴⁷ und Glycin⁴⁸. PAR4 ist zu 33 Prozent mit den anderen Protease-aktivierten Rezeptoren identisch (87).

1.2.1. Expressionsmuster der Protease-aktivierten Rezeptoren

Die Protease-aktivierten Rezeptoren sind eine im menschlichen Körper weit verbreitete Gruppe von Rezeptoren.

PAR1 befindet sich z. B. in humanen Thrombozyten (51), Epithelzellen der humanen V. umbilicalis (72, 85), den glatten Muskelzellen der humanen Blutgefäße (30), im Gehirn von Ratten (80), in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, den Zellen von glatter Muskulatur, den Nervenzellen des Gastrointestinaltraktes (6, 27), den Atemwegen der Ratte (19) und in der Haut (108).

PAR2 wird von humanen Granulozyten (neutrophil) (48), von Epithelzellen der humanen V. umbilicalis (72, 85), Muskelzellen der Gefäßwand (30), dem menschlichen Gehirn (30), dem ersten affarenten Neuron des Rückenmarks (109) und der Niere (6) exprimiert. Besonders stark kann PAR2 im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden, hier vor allem in den Epithelzellen des Dün- und Dickdarms, dem Magen, dem Pankreas und der Leber (6). In den Atemwegen ist PAR2 in den Epithelzellen, den glatten Muskelzellen der Luftwege, einigen Drüsen und im Endothel der Gefäße anzutreffen (19, 22, 30). In der Haut zeigt sich PAR2 im Stratum spinosum, Stratum corneum, den Haarfollikeln, nicht jedoch in Melanozyten (109).

PAR3 ist, wie auch PAR1 und PAR2, in der humanen V. umbilicalis (72) und im Dünndarm (49) exprimiert.

PAR4 konnte in humanen Thrombozyten (51), im Pankreas und Dün- und Dickdarm (52, 140) nachgewiesen werden.

Dabei übernehmen die Rezeptoren in Physiologie wie auch Pathophysiologie wichtige Aufgaben. In bisherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von PAR2 zur Relaxation von Blutgefäßen (42), Hypotension (21, 96), vermehrter Adhäsion und Migration von Leukozyten (128) und Granulozyten (129), verstärkter Gefäßdurchlässigkeit mit Ödem (109) und zu neurogenen Schmerzen (130) führte. Außerdem zeigte sich nach der Aktivierung von PAR2 ein Anstieg von Prostaglandinen und Cytokinen (123).

Mit dem Nachweis, dass intestinale Epithelzellen auf entzündliche Stimuli mit einem Anstieg der IL-8 Expression reagieren, war es möglich, die Reaktion der intestinalen

Epithelzellen nach Aktivierung des PAR2 zu untersuchen. Eine Studie befasste sich mit dem Nachweis von PAR2 und mit der Produktion von IL-8 und IL-1 in dermalen Kapillarendothelzellen (104). Diese Ergebnisse sprechen PAR2 eine Beteiligung bei der der Initiation und Modulation von entzündlichen Reaktionen zu.

In einer weiteren Studie führte die Aktivierung von PAR2 in nativen Mäusen zu proinflammatorischen Effekten (13). Andere Studien zeigten für PAR2 eine proinflammatorische Wirkung und wiesen dies in einem PAR2 Knock-Out-Maus-Modell bei Tieren mit einem Mangel an PAR2 nach (67). In weiteren Studien mit PAR2 Knock-Out-Mäusen konnte im Zusammenhang mit der Aktivierung von PAR2 ebenfalls eine proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden (39, 101). Die Ergebnisse der genannten Studien können als weitere Hinweise für die proinflammatorische Wirkung von PAR2 angesehen werden. Zwei Studien zeigten für PAR2 eine antiinflammatorische Wirkung auf (40, 54). Alle diese Studien, bis auf die Arbeiten von Fiorucci et al. (40) und Kawabata et al. (54), welche für PAR2 eine antiinflammatorische Wirkung proklamieren, zeigten, dass sich durch eine Aktivierung von PAR2, sei es durch Proteasen wie Trypsin und β -Tryptase oder PAR2 aktivierendem Peptid, proinflammatorische Prozesse auslösen lassen.

1.2.2. Signaltransduktion

Trypsin bindet an den N-terminalen Teil des PAR2 und spaltet diesen zwischen Arginin³⁴ und Serin³⁵. Durch diese Spaltung entsteht ein neuer, veränderter N-Terminus. Dieser dient als Ligand, welcher eine intramolekulare Bindung im Rezeptor eingeht. Beim humanen PAR2 besteht dieser neue Ligand aus den Aminosäuren Serin, Leucin, Isoleucin, Glycin, Lysin und Valin (6).

Dass Trypsin eine Spaltung von PAR2 bewirkt, zeigten Versuche mit Antikörpern gegen den N-terminalen Anteil des Rezeptors an der Oberfläche von Epithelzellen. Bei diesen Versuchen wurden zunächst PAR2 exprimierende Epithelzellen mit Trypsin versetzt. Nachfolgend konnte immunhistochemisch durch das Ausbleiben der Immunantwort gegen das Oberflächenantigen des Rezeptors die Spaltung von PAR2 aufgezeigt werden (5). Für die intramolekulare Bindung des Liganden und damit für die Aktivierung des Rezeptors ist die zweite extrazelluläre Schleife von besonderer Bedeutung (64), da Mutationen in diesem Teil des Rezeptors zu einer deutlichen Reduktion der Signalstärke bzw. Zellantwort nach Stimulation mit Trypsin führten (2).

Nachdem die Bindung des Liganden an der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors zu Stande gekommen ist, wird die intrazelluläre Phospholipase C- β_1 aktiviert,

was in der Bildung von Inositol-Triphosphat mündete. Dies bewirkte z.B. in Enterocyten, PAR2-transfizierten Zellen und Tumorzellen einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} , eine Zunahme von Diacylglycerol und die Aktivierung der Protein-Kinase-C (6, 61, 82, 83).

PAR2 vermittelte Effekte werden wahrscheinlich über die G_{α} Untereinheit des Rezeptors $G_{q\alpha}$ übertragen, da die Signalantwort von PAR2 nicht durch Pertussis-Toxin, welches das G-Protein G_i hemmt, beeinflusst wird (34). Außerdem spricht die Kopplung von PAR2 an Phospholipase C- β_1 und das Expressionsmuster des Rezeptors für die $G_{q\alpha}$ und gegen die G_i Subfamilie oder andere Mitglieder der G_q Subfamilie. Des Weiteren kommt es in Enterocyten und PAR2-transfizierten Zellen durch die Aktivierung von PAR2 zur Freisetzung von Arachidonsäure und zur verstärkten Bildung von Prostaglandin E_2 und $F_{1\alpha}$. Wahrscheinlich führt die Aktivierung von PAR2 zur Aktivierung von Phospholipase A2 und Cyclooxygenase-1 (61, 87). Substanzen, die die PAR2-Signalkaskade in Gang bringen, aktivieren zudem Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAP - Kinasen) (4, 34).

1.2.3. Desensibilisierung

Da Proteasen wie Trypsin PAR2 spalten und damit irreversibel aktivieren, könnte dies prinzipiell zu einer ständigen Signalübertragung führen. Der generelle Mechanismus, durch den die Signalübertragung von PAR's beendet wird, ist gut an Untersuchungen des Rhodopsins und des β_2 -adrenergen Rezeptors beschrieben (4, 87). Jedoch bestehen gewisse Unterschiede zwischen konventionellen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und den Protease-aktivierten Rezeptoren.

Repetitive Stimulation von Enterozyten und PAR2-transfizierten Zellen mit Trypsin und PAR2-aktivierendem Peptid zeigen einen verminderten Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} (5).

Dieser nachlassende Effekt von PAR2-aktivierendem Peptid und Trypsin, gemessen am intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, lässt auf ein ausgeprägtes Regulationssystem schließen.

Die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelten Effekte nehmen nach längerer Zeit der Aktivierung ab. Eine Schlüsselrolle für diesen Aktivitätsverlust spielen dabei Proteinkinasen, die zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Domänen des Rezeptors (C-terminale Serin- oder Threonin-Reste) führen. Generell müssen dabei zwei Typen von Kinasen unterschieden werden. Dies sind zum einen die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und zum anderen Kinasen, welche durch Second-

Messenger aktiviert werden. Die Phosphorylierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann, je nach Rezeptor, zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, ausgelöst durch bestimmte elektrochemische Wechselwirkungen führen oder eine Bindung des Rezeptors mit β -Arrestinen herbeiführen. Diese Reaktion mit β -Arrestinen verhindert bei manchen Rezeptoren die Wiederankopplung der G-Proteinuntereinheit bzw. führt durch die Bindung an β -Arrestin zur Internalisierung des Rezeptors.

Bei PAR2 ist der Mechanismus der Desensibilisierung wahrscheinlich Protein-Kinase C vermittelt, wobei dieser durch Phosphorylierung verändert wird. Beim humanen PAR2 besteht der neue Ligand aus den Aminosäuren Serin, Leucin, Isoleucin, Glycin, Lysin und Valin (6). Die Protein-Kinase-C mit ihrer Spezifität zur Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten scheint deshalb eine besondere Rolle zu spielen (5, 34). Ein Hinweis für die Inaktivierung des Rezeptors durch die Protein-Kinase-C liefert die Aktivierung der Kinase durch Phorbol-Ester. Die Aktivierung von PAR2 in Enterocyten und transfizierten Zellen zeigt keinen messbaren Effekt der PAR-Aktivierung, während eine Hemmung der Protein-Kinase-C eine Verstärkung der PAR2-Wirkung hervorruft (87).

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung der Protein-Kinase-C wird durch Versuche, mit einer Mutation des PAR2 im carboxyterminalen Teil belegt, einem Teil, der für den Angriff der Protein-Kinase-C und damit für die Signalterminierung von Bedeutung ist. Bei dieser Mutation führt eine Aktivierung der Protein-Kinase-C durch Phorbol-Ester nicht zu einer Signalterminierung. Die Mutation bewirkt im Gegenteil einen überhöhten Ca^{2+} Anstieg und eine geringere Desensibilisierung bei wiederholten Stimulationen mit Trypsin und PAR2-aktivierendem Peptid (5, 34).

Durch die permanente Bindung des Liganden am Rezeptor erfolgt die Rekrutierung intrazellulär gelegener G-Protein-Rezeptor-Kinasen zum PAR2. Bei den G-Protein-Rezeptor-Kinasen handelt es sich um Serin-Threonin-Kinasen, die den aktivierten Rezeptor im carboxyterminalen Bereich bzw. in der dritten intrazellulären Schleife phosphorylieren (87).

Daraus resultiert nun eine Trennung des Rezeptors vom G-Protein, was die Signalübertragung des Rezeptors im Zytosol beendet.

Die Phosphorylierung wiederum bewirkt eine Translokation von β_1 -Arrestin vom Zytosol zur Plasmamembran. β_1 -Arrestin, ein mit dem Rezeptor interagierendes Membranprotein, koppelt den Rezeptor an Clathrin und AP2, ein weiteres Adapterprotein. Nachdem der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt wurde, wird er über

β_1 -Arrestin und Clathrin-Coated-Pits endozytiert und PAR2 und β_1 -Arrestin erscheinen kurze Zeit später gleichzeitig in frühen Endosomen (5, 35).

β_1 -Arrestin taucht später wieder im Zytosol auf, während PAR2 in Lysosomen abgebaut wird. Viele dieser Schritte werden durch rab-GTPasen, im speziellen durch Rab5a, vermittelt (97). Zwei Beobachtungen verdeutlichen, dass β_1 -Arrestin für die Endozytose von PAR2 von besonderer Bedeutung ist.

Eine Mutation im Bereich der Clathrin-Bindungsstelle von β_1 -Arrestin, genau β_1 -Arrestin⁴¹⁸⁻⁴¹⁹, verhindert eine Endozytose. Zudem zeigt ein PAR2-Mutant, welcher unfähig ist, mit β_1 -Arrestin zu interagieren, eine fehlende Internalisation des Rezeptors und eine beeinträchtigte Desensibilisierung (87).

Des Weiteren ist am Vorgang der Endozytose auch Dynamin beteiligt. Dies belegen Untersuchungen, bei denen es unter GTPase-defektem Dynamin nicht zur Endozytose kam (97).

Bei herkömmlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit löslichem Liganden ist der Rezeptor nach der Aktivierung und Bindung des G-Proteins an den Rezeptor wieder aktivierbar.

Wie schon beschrieben, ist die Spaltung von PAR's und damit deren Aktivierung ein einmaliger Vorgang, da die Rezeptoren nicht regeneriert werden können. Um die Zelle weiterhin für neue Signale empfangsbereit zu halten, müssen neue Rezeptoren synthetisiert und/ oder vorhandene in die Membran eingebaut werden. In vielen Zellen sind für PAR2 vorgefertigte Speicher nachweisbar (5). Für den Transport von PAR2 aus dem Golgi-Apparat sind wiederum GTPasen von Bedeutung. Im Falle des Transportes zur Zellmembran ist dies Rab11a (97). Rab11a defekte Zellen, welche stattdessen Rab11aS25N exprimieren, zeigen eine deutliche Ansammlung von PAR2 Speichervesikeln im Golgi-Apparat. Die Überexpression von Rab11a wiederum führt zu einer schnelleren Erholung der Rezeptorantwort nach repetitiven Stimulationen mit Trypsin.

1.2.4. PAR2 aktivierende Proteine

PAR2 kann durch die unterschiedlichsten Proteasen aktiviert werden (49, 52). Unter anderem erfolgt die Spaltung und Aktivierung von PAR2 durch Enzyme, Gerinnungsfaktoren, Proteasen von Mikroorganismen, proteolytische Allergene, Zellen der Immunabwehr, ein synthetisch hergestelltes Peptid sowie durch verschiedene membranständige Serin-Proteasen.

Zu den Enzymen gehören vor allem Trypsin und Chymotrypsin. Dies sind Enzyme, die im Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle bei der Verdauung einnehmen (61)

Ein Komplex der Gerinnungskaskade bestehend aus Gewebefaktor, Faktor VIIa (Konvertin) und Faktor Xa (aktivierter Stuart–Prower–Faktor) ist ebenfalls in der Lage, PAR2 zu aktivieren (12).

Des Weiteren ist bekannt, dass Staubmilben, *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae* über Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin verfügen und damit PAR2 spalten können.

Die proteolytischen Allergene DerP3 und DerP9 führten in Epithelzellen des humanen Atemtraktes zu einer Ausschüttung von Cytokinen und einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg mittels Aktivierung von PAR2 (57). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Allergene in der Lage, sind Teile von PAR2 zu spalten, was wiederum zu den beschriebenen Effekten bei den Epithelzellen des Bronchialsystems führte (111). Auch ist eine PAR2 Aktivierung durch Mastzellen (31), neutrophile (48) und eosinophile (71) Granulozyten in der Literatur beschrieben.

Für experimentelle Zwecke wurde ein spezielles Peptid entwickelt, welches aus der Aminosäuresequenz Serin-Leucin-Isoleucin-Glycin-Lysin-Valin besteht und in der Lage ist, PAR2 selektiv zu aktivieren.

PAR2 kann auch durch membranständige Serin-Proteasen gespalten werden. Zur Familie der membrangebundenen Serin-Proteasen gehören vier Sub-Familien. Die HAT/ DESC Familie, Corin, die Hepsin/ TMPRSS Familie und die Matriptase Familie. Die membranständigen Serin-Proteasen übernehmen neben der Aktivierung von PAR2 bedeutende Aufgaben in diversen physiologischen wie auch pathophysiologischen Zellfunktionen. Vor allem die Hepsin/ TMPRSS Familie sowie die Matriptase Familie sind im Gastrointestinaltrakt weit verbreitet und rücken wegen ihrer weitreichenden Funktionen und dem Potenzial, PAR2 zu aktivieren, immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (15, 17, 32, 33, 50, 59, 93).

1.3. Die Familie der membranständigen Serinproteasen - TTSP

Die proteolytische Spaltung von Proteinen ist eine für den menschlichen Organismus existenzielle Funktion. Diese Funktion wird durch Proteasen wahrgenommen, die in fünf Klassen eingeteilt werden können. Dazu gehören die Serin-, Threonin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen. Die am längsten bekannte Klasse ist die Gruppe der Serin-Proteasen. Trypsin und Chymotrypsin, beides für die Verdauung essentielle Enzyme, sind dabei die bekanntesten Vertreter. In den letzten Jahren gewann eine Unterklasse der Serin-Proteasen, die transmembranären Serin-Proteasen, immer mehr an Bedeutung. Die transmembranären Serin-Proteasen, kurz TTSP, gehören zur Familie der membrangebundenen Serin-Proteasen. Zu dieser Familie der Serin-Proteasen gehören diverse Subgruppen. Die Gruppe der Serin-Proteasen spielen eine bedeutende Rolle in diversen physiologischen wie auch pathophysiologischen Zellfunktionen. Unter anderem sind sie in Aufgaben bei der Zellentwicklung, der Gerinnung, der Komplementaktivierung, der Wundheilung, der Verdauung, bei Zell-Zell-Interaktionen, Entzündungsreaktionen sowie bei Tumorwachstum und Metastasierung eingebunden (15, 17, 32, 33, 50, 59, 93). Die kürzlich entdeckte Gruppe der transmembranären Serin-Proteasen sind entweder über eine Carboxy- (Typ I) oder eine Aminogruppe (Typ II) zellmembrangebunden, wobei sich der katalytisch wirkende Bereich der Serin-Protease extrazellulär befindet. Die intrazelluläre Kopplung wird bei den transmembranären Serin-Proteasen über die Carboxy-Gruppe (Typ I) oder über eine Verbindung der Aminogruppe ins Zytoplasma (Typ II) erreicht (46). Nach dieser Nomenklatur ergibt sich die Bezeichnung Typ II transmembranäre Serin-Protease (TTSP). Zu dieser Familie zählen bis dato 17 Proteasen (46), welche in vier Subgruppen katalogisiert sind. Enterokinase, eine schon seit hundert Jahren bekannte Protease, konnte durch den Vergleich von Gensequenzen zur Gruppe der TTSP zugeordnet werden, nachdem es gelungen war, die TTSP Hepsin mittels cDNA zu klonen (58, 65). Mit dem Fortschreiten des „Humanen Genom Projektes“ war es möglich, weitere Proteasen wie die Human airway trypsin-like Protease (HAT) (143) und TMPRSS2 (90), gefolgt von Corin (144), Matriptase/ MTSP1 (118), TMPRSS3 (133), TMPRSS4 (125), Spinesin/ TMPRSS5 (142), DESC-1 (78, 142), DESC-2 (127, 142), DESC-3 (127, 142) Matriptase 2 (63) und Matriptase 3 (78) als TTSP's zu identifizieren. Die Katalogisierung erfolgte anhand ähnlicher phylogenetischer Eigenschaften der Serin-Protease-Region, der Zusammensetzung des Stamm-Bereiches und der Lokalisation auf dem informationstragenden Chromosom. Wie schon beschrieben, bestehen die TTSP's aus einer intrazellulären Aminogruppe, einer transmembranären Einheit, einer sich

extrazellulär befindenden, aus unterschiedlichen Bereichen zusammengesetzten Stamm-Region und einem katalytisch wirkenden Serin-Protease Bereich. Die Gruppe von Hepsin/ TMPRSS2-5 stellt bislang die größte Subfamilie, gefolgt von der HAT/ DESC-Gruppe, der Matriptase-Gruppe und der Corin-Gruppe dar.

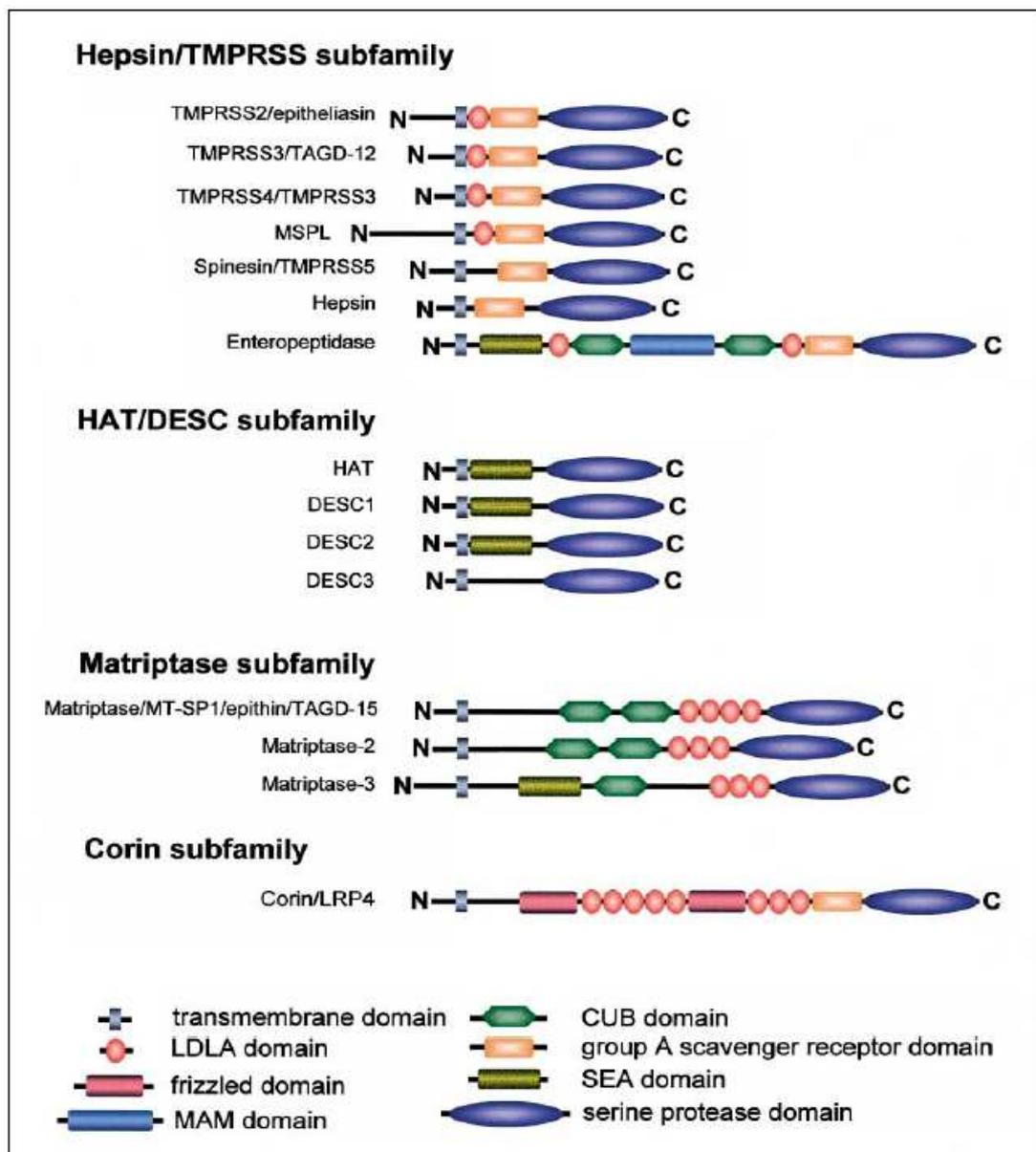


Abb.5.

Quelle: Szabo, R., Wu Q., Dickson, R.B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T.M., Bugge, T.H. (2003) - „Type II transmembrane serine proteases“ - Thromb Haemost. 90, 185 - 193

1.3.1. Die HAT/ DESC Familie

Die HAT/ DESC Familie der TTSP wird hauptsächlich von epithelialen Geweben exprimiert. HAT wurde im zilientragenden Epithel des Bronchialsystems und des Oesophagus nachgewiesen. HAT zeigte in vitro fibrinolytische Eigenschaften (116), ist ebenfalls in der Lage, PAR2 zu aktivieren (137) und scheint eine Rolle in der extravasculären Fibrinstabilisierung zu übernehmen (146). Die Expression von DESC-1 konnte im Epithel der Haut, den Speicheldrüsen, dem Oesophagus, den Hoden und der Prostata aufgezeigt werden (63, 78). Für DESC-2 liegen die Hauptexpressionsorte im Bereich der Tonsillen, dem Herzen, der Niere, der Brustdrüse, der Haut und dem Dünndarm (63, 78). DESC-3 konnte noch keinem Gewebe sicher zugeordnet werden (114).

1.3.2. Corin

Im menschlichen Herz wurde eine weitere membrangebundene Serin-Protease entdeckt und nachfolgend als Corin bezeichnet (144). In Studien konnte gezeigt werden, dass Corin in atrialen und ventrikulären cardialen Myozyten exprimiert wird und die inaktive Vorstufe des atrialen natriuretischen Peptides (Pro-ANP) in die aktive Form (ANP) umwandeln kann (47, 144, 145). Eine Mutation von Corin bedingt das völlige Aussetzen der Umwandlung von Pro-ANP in ANP, was vermuten lässt, dass es sich bei Corin um die Convertase von ANP handelt (138). Eine Fehlfunktion von Corin führt in vivo bei Mäusen zu Bluthochdruck und Hypertrophie des Herzmuskels.

1.3.3. Die Hepsin/ TMPRSS Familie

Die Enteropeptidase stellt das am besten untersuchte Mitglied der Gruppe Hepsin/ TMPRSS dar. Seine Hauptaufgaben liegen im Verdauungstrakt. Enteropeptidase wandelt die inaktive Vorstufe Trypsinogen in das stoffwechselaktive Trypsin um (99). Trypsin wiederum wandelt verschiedene verdauungsinactive Vorstufen in einer proteolytischen Aktivierungskaskade in ihre aktiven Formen um. Unter anderem werden so Chymotrypsin, Elastase und Lipase aktiviert (37). Eine Mutation bzw. ein Ausfall von Enteropeptidase führt zu chronischer Diarrhoe, generalisierten Ödemen und infantilen Entwicklungsstörungen (99). Die Ursache für die Funktionsstörungen konnte in Mutationen in verschiedenen Regionen des extrazellulären Stammes der Enteropeptidase identifiziert werden (45).

Die mRNA von TMPRSS2 wurde unter anderem in den Epithelien des Gastrointestinaltraktes z.B. im Colon, im Dünndarm, im Pancreas, den Speicheldrüsen

sowie in vielen anderen Geweben wie der Niere, der Lunge, der Brustdrüse oder der Prostata nachgewiesen werden (90, 126). Die Genexpression wird durch Androgene reguliert (66). Ein erhöhter TMPRSS2 mRNA Level ist zum Beispiel bei einem androgenabhängigen Prostatakarzinom zu finden (17). Eine deutlich gesteigerte Genexpression konnte in colorectalen Karzinomen und Pancreaskarzinomen nachgewiesen werden (1). Des Weiteren wurde für TMPRSS2 eine proteolytische Aktivierung des humanen Metapneumovirus, einem Atemwegsvirus, sowie für das 1918 Influenza Virus Hämagglutinin aufgezeigt (14, 17). Über diese TMPRSS2 vermittelte Aktivierung ist eine Ausbreitung der Virusinfektion möglich. Ebenfalls konnte für TMPRSS2 ein Zusammenhang zu entzündlichen Veränderungen der Prostata hergestellt werden. Diese Entzündungen laufen dabei PAR2 vermittelt ab (8, 137).

Ein weiteres Mitglied der Hepsin/ TMPRSS Familie, TMPRSS3, konnte kürzlich mit kongenitaler Entwicklung in Zusammenhang gebracht werden. Eine Fehlfunktion von TMPRSS3 führt zu kongenitaler oder einer in der frühen Jugend einsetzenden Taubheit (102). Auch TMPRSS3 wird im Gastrointestinaltrakt im Dünndarm, dem Pankreas, den Speicheldrüsen, dem Knochenmark, dem Gehirn, der Lunge, dem Hoden, dem Ovar und der Niere exprimiert (102). Trotz der weiten Verbreitung im menschlichen Körper führt eine Funktionsstörung hauptsächlich zu Taubheit, was möglicherweise auf eine Kompensation der TMPRSS3-Funktion durch andere Proteasen schließen lässt. Eine Überexpression der TMPRSS3 Genexpression konnte in Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden (125).

TMPRSS4 wird in vielen Geweben des Verdauungssystems und des Urogenitaltraktes exprimiert. Dies sind unter anderem das Colon, der Dünndarm, der Oesophagus und die Gallenblase. Auffällig ist, dass die Protease ebenfalls in colorectalen Karzinomen, Magen- und Leber-, Lungen-, Ovarial-, Schilddrüsen-, Pankreas- sowie Prostatakarzinomen überexprimiert ist (133). Für das Prostatakarzinom konnte eine Korrelation zwischen dem erhöhten Expressionsmuster von TMPRSS4 und dem Tumorwachstum, der Invasivität und der Metastasierung aufgezeigt werden (18). Eine Arbeitsgruppe um Chaipan konnte neben TMPRSS2 auch für TMPRSS4 eine Aktivierung des 1918 Influenza Virus und damit eine TMPRSS4 vermittelte Ausbreitung des Virus im Lungengewebe nachweisen (14).

Wie aus dem Zweitnamen von TMPRSS5, Spinesin, ersichtlich, ist diese Protease vor allem im Nervensystem zu finden. Das Gen konnte in Axonen und Synapsen von Nerven nachgewiesen werden, wodurch seine Funktion möglicherweise in der Entwicklung und der Regeneration von Nerven begründet liegt (142).

Eine weitere Protease dieser Familie, Hepsin, wird hauptsächlich in der Leber exprimiert (65). In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass Hepsin in der Lage ist, Faktor VII, einen Gerinnungsfaktor, der eine wichtige Rolle im extrinsischen System der Gerinnung einnimmt, zu aktivieren (55). Des Weiteren konnten Studien Hepsin eine Rolle in der Zellentwicklung von Leberzellen zuschreiben, wobei eine Senkung des Hepsinspiegels zu einer veränderten Zellmorphologie der Leberzellen und einer gestörten Zellteilung dieser Zellen führte (122). Hepsin konnte bei Embryonen der Maus bereits im Zwei-Zell-Stadium nachgewiesen werden, was neben den Funktionen bei der Gerinnung und dem Leberzellwachstum eine Rolle bei der Befruchtung und Embryogenese vermuten lässt (131). Jedoch ist die Funktion von Hepsin nicht essentiell für die Entwicklung und das Wachstum eines Organismus, wie auch für den physiologischen Ablauf der Gerinnung und die Leberfunktion. Dies zeigten Experimente an Hepsin-Knockout-Mäusen, die trotz fehlender bzw. reduzierter Expression von Hepsin lebensfähig waren, eine normal ablaufende Gerinnung zeigten und sich unauffällig entwickelten (139, 147). Bei den Tieren konnten lediglich erhöhte Level von verschiedenen Leberenzymen, wie der Alkalischen Phosphatase, der Aspartat-Aminotransferase und der Alanin-Aminotransferase nachgewiesen werden (139, 147). Hepsin wurde zudem in humanen Prostatatumoren, Ovarialzellkarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Hepatomen nachgewiesen (113). Frühere Studien proklamierten für Hepsin eine bedeutende Rolle in der Tumorentstehung (141). In neueren Studien wurde Hepsin zusätzlich eine tumorprogressive sowie metastasierende Wirkung zugeschrieben, wobei eine Inaktivierung von Hepsin durch Antikörper in einem Maus-Modell zur Inhibierung der Tumorinvasivität führte (141). Eine weitere Studie wies für Hepsin in einem Maus-Modell ein Zusammenspiel mit Desmosomen und damit eine Rolle bei Tumorwachstum und Progression nach (70). Hepsin ist auch in die Auslösung und Modulation von Infektionen eingebunden. Eine Studie konnte zwischen HBx, einem Bestandteil des humanen Hepatitis B Virus, und Hepsin *in vivo* und *in vitro* Interaktionen nachweisen und legte so für Hepsin eine Mitwirkung bei der Proliferation sowie der Inhibierung der Apoptose bei Leberzellen nahe (148). Eine weitere Studie beschrieb für Hepsin nach der Verletzung von bronchialen Epithelzellen proinflammatorische Funktionen (120).

1.3.4. Die Matriptase-Familie (MTSP-1, MTSP-2, MTSP-3)

Eine weitere Familie von TTSP's ist die Matriptase Familie. Zu ihr gehören die Matriptase oder MTSP-1, Matriptase 2 und 3. Von diesen drei Proteasen ist MTSP-1 die am besten untersuchte. Sie ist vielfältig im Epithel der Haut, dem des Gastrointestinaltraktes, dem Bronchialsystem, dem Urogenitaltrakt, dem Thymus sowie in Endothelzellen, Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten und in Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (114). Ein Fehlen von MTSP-1 führt bei Mäusen innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt zum Tod. Die Versuchstiere zeigten ausgeprägte Veränderungen im Bereich des Stratum corneum, was zu einer eingeschränkten epidermalen Flüssigkeitsbarriere mit unkontrollierter Dehydratation und Hypothermie führte (68). Des Weiteren bedingt ein Fehlen von epidermalem MTSP-1 eine veränderte Entwicklung des epidermalen Haarfollikels (68). Ebenso bewirkt das Fehlen von MTSP-1 einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate von unreifen CD4+ und CD8+ Thymozyten (68). Matriptase ist auch verstärkt in vielen Tumoren exprimiert. Dazu gehören unter anderem Mamma-, Nieren-, Colon-, Leber-, Lungen-, Ovarial- und Prostatakarzinome sowie Mesotheliome (17). Es wird angenommen, dass durch MTSP-1 die Karzinomentstehung über eine Aktivierung der Vorstufen Urokinase-Plasminogen Aktivator sowie den Hepatocyte-growth Faktor (pro-HGF) vermittelt abläuft (17). Für beide konnte ein Zusammenhang mit invasivem Wachstum aufgezeigt werden (124). In einem Mausexperiment konnte das invasive Wachstum direkt am Beispiel von epidermalem Gewebe über die Steigerung der MTSP-1 Expression nachgewiesen werden (17). Außerdem wurde für MTSP-1 gezeigt, dass es MTSP-1 vermittelt zu einer Veränderung der Zell-Zell Adhäsion bzw. zur Aktivierung von PAR2 und darüber zu Gewebsinvasion und Infektion kommt. Dies beschrieb auch eine Arbeitsgruppe um Seitz et al., die Untersuchungen an arteriosklerotischen Läsionen durchführten. Dabei kam es nach Aktivierung von MTSP-1, PAR2 vermittelt, zu einem Anstieg von Entzündungsmediatoren (88). Eine weitere Studie legte für MTSP-1 wie auch für Hepsin nach der Verletzung von bronchialen Epithelzellen proinflammatorische Funktionen nahe (120). Dies wird weiter durch den Nachweis der erhöhten MTSP-1 Expression in frühen Leishmanien Infektionen erhärtet, bei der MTSP-1 eine Assoziation in der Pathogenese dieser Infektion zugeschrieben wurde (76). Zudem scheinen MTSP-1 und seine Inhibitoren eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung zahlreicher Karzinome sowie bei der Entstehung und Unterhaltung von Entzündungen zu spielen und werden als potentielle Tumormarker diskutiert (8, 17, 117, 118, 124). Einige der nachgeschalteten Reaktionen

bei der Tumorentstehung und Metastasierung sind unter anderem über den Hepatocyte-growth Faktor, den Pro-urokinase Plasminogen Aktivator und, den von uns näher untersuchten, PAR2 vermittelt (8).

Zusammenfassend können wir feststellen, dass bis heute die Funktion von PAR2 in Physiologie und Pathophysiologie des Gastrointestinaltraktes noch immer unzureichend verstanden ist.

Um ein besseres Verständnis der Funktion von PAR2 in Bezug auf Entzündungsreaktionen zu erhalten, war die Fragestellung dieser Arbeit, das Expressionsmuster der den Rezeptor beeinflussenden Faktoren zu evaluieren. Zu diesen Faktoren gehört zum Beispiel die Gruppe der membranständigen Serin-Proteasen (TTSP). Bis heute gibt es in der Literatur keine Studien, die das Expressionsmuster der membranständigen Serin-Proteasen bei Entzündungen, wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen widerspiegeln. Aus diesem Grund haben wir bei vier Vertretern der membranständigen Serin-Proteasen das Expressionsmuster bei Gewebsbiopsieproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa näher untersucht.

2. Allgemeine Materialien

Für die Punkte 2.1.1. bis 2.2.9. wurden folgende Pipetten (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 2ml Art.Nr.710180, 5ml Art.Nr.606180, 10ml Art.Nr.607180, 25ml Art.Nr.760180 und 50ml Art.Nr.768160) in Verbindung mit einem Pipetboy (Integra Biosciences ⁽¹⁵⁾) eingesetzt. Zudem sind Pipetten mit Volumina zwischen 0,2µl und 1000µl (Eppendorf ⁽⁷⁾, Research, 0,1-2,5µl Art.Nr.3111 000.114, 0,5-10µl Art.Nr.3111 000.122, 10-100µl Art.Nr.3111 000.149, 10-1.000µl Art.Nr.3111 000.165) und Filterpipettenspitzen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 10µl Art.Nr.765288, 100µl Art.Nr.772288, 1000µl Art.Nr.740288) verwendet worden.

2.1. Spezifische Materialien

2.1.1. M. Crohn und Colitis ulcerosa Patientenproben

Bei den Proben handelt es sich um Biopsie-Proben mit einem maximalen Volumen von 2mm³. Die Proben wurden in Form von 10ng/µl cDNA aus Stuttgart (IKP-Stuttgart, Robert Bosch Klinikum, Dr. M. Schmid) bezogen und jede Probe einzeln mittels quantitativer Real-Time-PCR mit dem entsprechenden Primer/Probe Gemisch gemessen. Anschließend bestimmten wir von den jeweiligen Expressionsraten der gemessenen Gene der einzelnen Gewebeproben die Mittelwerte bzw. bestimmten die Signifikanz der erhaltenen Messwerte und stellten diese graphisch dar.

2.1.2. RNA-Isolierung

Für unsere Versuchsreihe verwendeten wir die oben genannten Pipetten in Verbindung mit ebenfalls oben genannten Filterpipettenspitzen. Außerdem wurden Eppendorf Cups (Eppendorf ⁽⁷⁾, 22339 Hamburg, Safe-Lock, 2ml, farblos, Art.Nr.0030 120.094) oder Cups der Marke Sarstedt (Sarstedt ⁽²⁸⁾, 500 Reagiergefäße, 1,5ml, No./REF 72.690) eingesetzt. Das Mischen durch Vortexen erfolgte mit einem Gerät der Marke Heidolph, (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Typ Reax 1DR). Wir benutzten eine Zentrifuge (Eppendorf ⁽⁷⁾, 22339 Hamburg, Centrifuge 5417R, Art.Nr.5407 000.317) mit maximal 14000 Umdrehungen pro Minute.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit einem Kit der Firma Quiagen (Quiagen ⁽²⁵⁾, 40724 Hilden, Deutschland, RNeasy Mini Kit, Cat.Nr. 74104), bestehend aus 50 RNeasy Mini Columns, 50 Collection Tubes (1,5ml), 50 Collection Tubes (2ml), RNase Free Water (10ml), RLT Lysis Buffer (45ml), RPE Wash Buffer (11ml), RW1 Wash Buffer (45ml).

Der RPE Buffer war bei Lieferung noch nicht einsatzbereit. Vor der ersten Benutzung musste der RPE Buffer noch mit 44ml Alkohol abs. versetzt werden.

Weiter benötigte man für die RNA Isolierung β -Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 64293 Darmstadt, 50ml, ZA 1573506-541). β -Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 50ml, ZA 1573506-541) mischten wir im Verhältnis 1:100 mit dem RLT Puffer. D.h. zu 600 μ l RLT-Buffer wurden 6 μ l β -Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 64293 Darmstadt, 50ml, ZA 1573506-541) in ein Eppendorf Cup gegeben. Dieses Gemisch wurde kurz gevortext und konnte so für die nächsten 4 Wochen gebrauchsfertig bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Außerdem setzten wir zur RNA Isolierung ein RNase Free DNase Set (Quiagen ⁽²⁵⁾, Art.Nr. 79254), das aus DNase, RNase Free Water und RDD Buffer bestand. Die in Pulverform gelieferte DNase wurde mit dem RNase Free Water in Lösung gebracht und erreichte so bei 4°C im Kühlschrank eine Haltbarkeit von 4 Wochen. Vor der Anwendung für die RNA-Isolierung mussten je 10 μ l der gelösten DNase mit je 70 μ l RDD Buffer versetzt werden.

2.1.3. cDNA Synthese

Auch für die cDNA Synthese wurden oben genannte Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Wie bei der RNA Isolierung, nutzten wir denselben Vortexer (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Typ Reax 1DR) und dieselbe Zentrifuge (Eppendorf ⁽⁷⁾, 22339 Hamburg, Centrifuge 5417R, Art.Nr.5407 000.317).

Für die cDNA-Synthese verwendeten wir einen Kit der Firma Fermentas (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Revert Aid First Strand cDNA Sythesis Kit (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Art.Nr.1622). Dieser enthält 1,5ml destilliertes Wasser, 120 μ l Random Hexamer Primer (0,2 μ g/ml), 120 μ l Ribonuclease Inhibitor (20U/ μ l), 250 μ l dNTP Mix (10mM), 240 μ l M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l), 40 μ l Control Primer (10pmol/ μ l) und 120 μ l Oligo (dT) 18 Primer (0,5 μ g/ μ l). Die cDNA Synthese wurde in einem Thermocycler (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Typ - Varius V) durchgeführt. Die Temperatur- und Zykluseinstellungen wurden den Anweisungen der Firma MBI-Fermentas entsprechend am Thermocycler vorgenommen. Diese werden im Teil Methoden 2.2.6. genauer beschrieben.

2.1.4. Quantitative Real-Time-PCR

Für die Quantitative Real-Time-PCR wurden folgende Materialien benutzt:

96 Well Optical Reaction Plate (Part.Nr.4306737) der Firma Applied Biosystems ⁽²⁾ in Kombination mit Optical Caps (Part.Nr.4323032) und das ABI Prism 7700 Sequence Detection System desselben Herstellers.

Auch für die Quantitative Real-Time-PCR nutzten wir bei der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese die gleichen Pipetten und Pipettenspitzen, dieselbe Zentrifuge (Eppendorf ⁽⁷⁾, Centrifuge 5417R Art.Nr.5407 000.317) und denselben Vortexer (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Typ Reax 1DR).

Die eingesetzten Primer bzw. fluoreszierenden Sonden (Probes) wurden zuvor individuell gefertigt. Verwendet wurden Primer und Probes von Applied Biosystems ⁽²⁾ und Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾ / Sigma-Geniosys ⁽²⁹⁾. Die quantitative PCR wurde außerdem mit einem Kit von Applied Biosystems ⁽²⁾, TaqMan Universal PCR Master Mix (Part.Nr.4304437), welcher AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AMPErase UNG, dNTPs (Nucleotidtriphosphate), dUNPs und optimierte Puffer enthält, durchgeführt.

Zudem wurden die Pre-Developed Assay Reagents, Human IL8 (20x) (Applied Biosystems ⁽²⁾, Art.Nr.4327042F, 4 x 125µl), 18s Ribosomal RNA (20x) (Applied Biosystems ⁽²⁾, Art.Nr.4310875, 2 x 500µl) eingesetzt. Dabei diente IL8 als Marker für die Entzündungsaktivität bzw. 18s als Housekeeping-Gen.

Alle Untersuchungen mittels quantitativer Real-Time-PCR wurden mit Molecular Biology Grade Water (1 Liter, Eppendorf ⁽⁷⁾, Art.Nr.0032006.159) durchgeführt.

2.1.5. Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR benötigten wir dieselben Primer wie für die quantitative Real-Time-PCR. Zusätzlich wurden eine TaqDNA Polymerase (Roche ⁽²⁷⁾, Art.Nr.1146173), 10xBuffer + Mg (Roche ⁽²⁷⁾, Art.Nr.1271318) und ein dNTP-Mix (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Art.Nr.R0192) eingesetzt. Wir benutzten Eppendorf Cups (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) und für die PCR einen Thermocycler der Firma Landgraf (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Varius V).

2.1.6. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein Agarose-Gel verwendet, das, je nach nachzuweisendem Produkt bzw. dessen Anzahl an Basenpaaren, eine Konzentration zwischen 1% und 3% besaß. Bei PCR-Produkten die aus 100 bis 250 Basenpaaren bestehen, nutzten wir Agarose-Gele mit einer Konzentration von 3%, bei PCR-

Produkten mit mehr als 1000 Basenpaaren dagegen Agarose-Gel-Konzentrationen von 1%. Da die meisten PCR-Produkte unserer Experimente zwischen 50 und 150 Basenpaaren enthielten, wurde eine Agarose (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, Art.Nr.A2790) eingesetzt, die für die von uns verwendeten Peptide und deren Anzahl an Basenpaaren geeignet war. Diese konnte DNA Fragmente zwischen 50 und 1000 Basenpaaren separieren. Für die Gelelektrophorese kam ein TBE-Puffer (BioRad ⁽⁴⁾, 10x Tris/Boric Acid/EDTA (TBE), 1L, Art.Nr.161-0733) zum Einsatz der zuvor noch verdünnt werden musste. Die Gelelektrophorese wurde in einer Gelelektrophoresekammer (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, Typ SHU13) und einer Stromquelle (BioRad ⁽⁴⁾, Modell 200/2.0 Power Supply) durchgeführt. Die Abdichtung der Gelkammer bei der Herstellung des Gels erfolgte mithilfe von Tesaband (Tesa ⁽³¹⁾, Extra Power Gewebeklebeband). Die cDNA wurde mit Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, 10ml, Art.Nr.E1510) im Gel markiert. Des Weiteren wurde die cDNA für die Verlaufskontrolle der Elektrophorese mit einem Farbstoff (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, 6x Loading Dye Solution, Art.Nr.R0611) in Eppendorf Cups (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) angefärbt. Um die Größe des PCR-Produktes abschätzen zu können, diente uns als Referenz ein GeneRuler (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Art.Nr.SM0241). Dieser enthielt Fragmente von 80, 100, 200 usw. Basenpaaren. Die Auswertung des Gels geschah unter UV-Licht (MWG Biotech ⁽²²⁾) und wurde mit Kamera und Drucker (Biophotonics Corp. ⁽⁵⁾, Gelprint 1000i) dokumentiert.

2.2. Methoden

2.2.1. M. Crohn und Colitis ulcerosa Patientenproben

Wie bereits erwähnt bezogen wir die cDNA der Patientenbiopsien aus Stuttgart. Die Proben wurden im Robert Bosch Klinikum durch die Arbeitsgruppe um Dr. Schmid zu Beginn mit einem Skalpell Größe 11 (Dr. Junghans medical ⁽⁶⁾, Art.Nr.8902481) in möglichst kleine Teile zerlegt und anschließend in ein 2ml Eppendorf Cup gegeben, mit 600 µl RLT und 1% 2-Mercaptoethanol versetzt und mittels Ultraschallsonde (B.Braun ⁽³⁾, LabSonicU Art.Nr.853972/3) weiter zerkleinert. Aus dem erhaltenen Lysat wurde dann, wie im Kapitel 2.2.5. beschrieben, mittels Quiagen Kit die RNA isoliert. Bereits in Stuttgart untersuchte man die Proben histopathologisch, um das Ausmaß der Entzündung zu bestimmen.

2.2.2. RNA-Isolierung

Zu Beginn musste das Medium aus der Zellkulturflasche (Cellstar Tissue Culture Flasks, 75 cm², 250 ml, Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Cat.658170) oder dem 6 Well Plate (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Art.Nr.657160) entfernt und dann der Zellrasen mit 10 ml PBS, welches danach wiederum abgesaugt wurde, gewaschen werden. Nach Vorlegen von 5 ml PBS wurden die Zellen mit einem Cell Scraper (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Cat.541070) in die Lösung geschabt. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass vom Flaschenende zum Flaschenhals und nicht wieder zurück gearbeitet wird. Das so gewonnene Zell/PBS-Gemisch gaben wir nachfolgend in ein Testtube (Cellstar PP-Testtubes, Röhrchen 50 ml, Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Cat.Nr.227261) und zentrifugierten es für 3 Minuten bei 1200 U/min. Danach wurde der Überstand abgesaugt.

Die folgenden Arbeitsschritte zur RNA-Isolierung wurden mit dem RNeasy Mini Kit (50)(Quiagen ⁽²⁵⁾, Cat. 74104) der Firma Quiagen durchgeführt. Auf die Zellen wurde jetzt 600 µl RLT Buffer/ β-Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 50ml, ZA 1573506-541) gegeben. Mit einer Pipette sollte solange gemischt werden, bis eine homogene zähflüssige Lösung entsteht. Diese Lösung wurde nun auf die Shredder-Säule (QIAshredder (50), Quiagen, Cat. 79654) pipettiert und bei 14000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Den Einsatz des Shredders verwarfen wir versetzten das Gemisch danach mit 600 µl 70% Ethanol absolut (Riedel-de Haen ⁽²⁶⁾, 32205). 700 µl dieser Probe gaben wir nun auf die RNase Mini Column und zentrifugierten diese bei 8000 U/min für 15 Sekunden. Die im Collection Tube befindliche Flüssigkeit musste entfernt werden. Die

RNA befand sich vorerst im Einsatz der RNeasy Mini Column. Nach dem Zentrifugieren konnte die Flüssigkeit im Collection Tube deshalb vorerst immer verworfen werden.

Im Anschluss gaben wir den Rest des Ethanol-Gemisches auf die Säule und wiederholten den vorangegangenen Arbeitsschritt. Dann wurden 700 µl RW1 Buffer in die Säule pipettiert und wieder für 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Im nächsten Schritt mischten wir 10 µl DNase und 70 µl RDD Buffer aus dem RNase Free DNase Set (50, Quiagen ⁽²⁵⁾, Cat. 79254) und pipettierten das Gemisch auf die Säule. Nach einer Wirkzeit von 15 Minuten bei 20-30°C. wurde die Säule auf ein neues 2ml Collection Tube gesetzt, 500 µl RPE Buffer hinzupipettiert und nochmals für 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Der letzte Arbeitsgang musste wiederholt und das Gemisch für weitere 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert werden. Um alle Pufferreste zu entfernen, zentrifugierten wir ein weiteres Mal für 1 Minute auf einem neuen Collection Tube bei 14000 U/min. Der Säuleneinsatz wurde nachfolgend auf ein neues Cup (Sarstedt ⁽²⁸⁾, 500 Reagiergefäße, 1,5ml, No./REF 72.690) gegeben und mit 25 µl RNase Free Water versehen. Um die RNA aus dem Einsatz zu waschen, zentrifugierten wir wiederum für 1 Minute bei 8000 U/min mit 25µl RNase Free Water. Dieses Procedere sollte man wiederholen. Bei zu erwartender geringer RNA-Konzentration sollte nur mit 2x 25µl Wasser gewaschen werden. Sollten höhere Mengen an RNA zu erwarten sein, kann das Volumen an RNase Free Water erhöht werden. Die gewonnene RNA sollte bei -20°C gelagert werden.

2.2.3. cDNA-Synthese

Zu Beginn wurde die genaue RNA-Konzentration des Isolates im Photometer (Amersham Biosciences ⁽¹⁾, Pharmacia, GeneQuant, Art.Nr. 80-210198) bestimmt. Für den Einsatz des Photometers (Amersham Biosciences ⁽¹⁾, Pharmacia, GeneQuant, Art.Nr. 80-210198) wurde zunächst mit 80µl RNase Free Water (Quiagen ⁽²⁵⁾, RNeasy Mini Kit) in der 10mm³ Micro-Quarzküvette (Hellma ⁽¹²⁾, Art.Nr.105.202-QS) der Referenzstandard eingestellt. Danach pipettierten wir 8µl der gewonnenen RNA und 72µl RNase Free Water (Quiagen ⁽²⁵⁾, RNeasy Mini Kit) in die 10mm³ Micro-Quarzküvette der Firma Hellma ⁽¹²⁾ (Best.Nr. 105.202-QS) und maßen die Extinktion bei 260nm. Die genaue RNA Konzentration ergab sich aus dem Produkt der zuvor bestimmten Extinktion bei 260nm und dem Faktor 0,4. Aus der errechneten Konzentration konnte das Volumen errechnet werden, welches 2 µg RNA enthält.

Für jede cDNA-Synthese setzten wir 1µg RNA und einen Kit der Firma MBI Fermentas (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (#K 1622)) ein.

Alle folgenden Arbeitsschritte außerhalb des Thermocyclers wurden auf Eis durchgeführt.

Das zuvor bestimmte Volumen mit 1 µg RNA wurde in ein Eppendorf Cup (Sarstedt ⁽²⁸⁾, 500 Reagiergefäße, 500µl, No./REF 72.690 oder Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) gegeben und mit deionisiertem Wasser kombiniert. Das so vorläufig erhaltene Volumen aus RNA/Wasser betrug 11µl. Im nächsten Schritt wurde 1µl Random Hexamer Primer hinzugefügt und das Gemisch nach kurzem Durchmischen im Thermocycler (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Varius V) für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 4µl Reaction Buffer, 1µl RNase-Inhibitor und 2µl dNTP-Mix im anschließenden Schritt verblieb das Cup für 15 Minuten bei 25 °C im Thermocycler. Im letzten Arbeitsgang wurde das Cup nach Addition von 1µl M-MuL Reverse Transcriptase (200U/µl) 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Synthese erfolgte nun für 60 Minuten bei 42°C. Durch Aufheizen auf 70°C für 10 Minuten wird die Reaktion beendet. Die bei der Transkription gewonnene cDNA wird dann 1 zu 3125 mit Wasser (Water, Molecular Biology Grade, 1l, Eppendorf ⁽⁷⁾, Order.No. 0032006.159) verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4. Quantitative Real-Time-PCR

Die zuvor synthetisierte cDNA wurde in 5µl Volumina in die entsprechenden Wells pipettiert. Es empfiehlt sich erst ein Pipettierschema zu erstellen, um Irrtümern beim Pipettieren vorzubeugen bzw. die spätere Auswertung zu erleichtern.

Da die Probes lichtempfindlich reagieren, wurde vorher, um das Pipettieren zu beschleunigen, ein Mastermix zusammengestellt. Dieser wurde in ein Eppendorf Cup (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, farblos, Art.Nr.0030 120.094) gegeben und bestand aus folgenden Einzelkomponenten: 12,5µl TaqMan Universal Mastermix, 2,5µl Forward-Primer, 2,5µl Reverse-Primer, 1µl Probe und 1,5µl Wasser. Je nach benötigter Menge wurde ein Vielfaches der Einzelkomponenten pipettiert.

Der entstandene Mastermix wurde in Volumina zu 20µl auf die entsprechende cDNA gegeben.

Um gute Ergebnisse zu erhalten, nahmen wir am Thermocycler folgende Einstellungen vor. Initial wurde das Gemisch für 2 Minuten auf 50°C aufgeheizt. Dies war erforderlich, um eine optimale AmpErase UNG Enzym Aktivität zu gewährleisten.

Danach wurde für 10 Minuten eine Temperatur von 95°C benötigt, um die AmpliTaq Gold Polymerase zu aktivieren. Die dann ablaufenden 40 Zyklen wechselten zwischen 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C.

Bei der PCR wird ein definiertes Stück cDNA, das durch zwei Primer begrenzt ist, in immer wieder aufeinander folgenden Reaktionen *in vitro* vermehrt. Die Quantifizierung der synthetisierten PCR-Produkte in der quantitativen Real-Time-PCR erfolgt durch kontinuierliche Erfassung laserinduzierter Fluoreszenzsignale. Diese Signale werden von in der Reaktion enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffen emittiert. Die PCR-Produktmenge ist dabei direkt proportional zur Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals. Es wird davon ausgegangen, dass mit dem Überschreiten des Fluoreszenzschwellenwertes, Threshold genannt, in jeder gemessenen Probe die gleiche Kopienzahl der zu analysierenden DNA-Sequenz enthalten ist. Als Ct-Wert, auch Threshold Cycle bezeichnet, wird der PCR-Zyklus spezifiziert, bei dem der Schwellenwert überschritten wird. Dies ist die Zykluszahl, bis zu der die linearen Verhältnisse des exponentiellen Wachstums gelten. Die TaqPolymerase synthetisiert im idealisierten Fall den cDNA-Strang nach der Formel: Anzahl der cDNA-Stränge nach n Zyklen = 2^n . Dieser wird von den zu untersuchenden Genen bestimmt.

In einem vorgeschalteten Lauf wurde mit definierten cDNA-Verdünnungsreihen in Schritten über mindestens 5 Zehnerpotenzen, die Konzentration bestimmt, in der sich die endogene Kontrolle (18s) und das zu bestimmende Gen linear zueinander verhalten. Dies war nötig, um zu gewährleisten, dass sich die eingesetzten Gene in verschiedenen Konzentrationen gleich verhalten. Es wurde dann für weitere Messungen, wie zuvor beschrieben, die Konzentration gewählt, welche gleiches Verhalten für die Genexpression erwarten ließ.

Die gewonnenen Daten wurden nun mittels Microsoft Excel ausgewertet.

Der CT Wert eines Genes wurde nun von den sogenannten Housekeeping Genen (18s oder GAPDH) subtrahiert. Die erhaltenen Differenzen wurden nun nochmals von einem Normwert (gesunder Patient, nicht stimulierte Zelle) subtrahiert und das Ergebnis als Potenz zur Basis 2 gestellt. Die berechnete Zahl gab die Erhöhung bzw. Verringerung der Genexpression wieder.

2.2.5. Konventionelle PCR

Zu Beginn wurden alle Reagenzien zentrifugiert (Eppendorf ⁽⁷⁾, Centrifuge 5417R, Art.Nr.5407 000.317) und anschließend auf Eis gelagert. In ein 500µl Eppendorf Cup (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) wurden jetzt 5µl 10xPuffer+Mg²⁺, 1µl dNTP-Mix, je 0,5µl Reverse- und Forward-Primer, die 2,4µl TaqPolymerase und zuletzt 2µl cDNA pipettiert. Auf dieses Gemisch gaben wir nun noch 38,6 µl steriles destilliertes Wasser, um ein Endvolumen von 50µl zu erhalten. Der Inhalt des Eppendorf Cups wurde nochmals gemischt (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Reax 1DR) und zentrifugiert. Auf den fertigen Lösungsansatz der PCR wurde im nächsten Schritt noch 1 Tropfen Mineral Öl (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, Mineral Oil, Art.Nr.M5904) gegeben, um das Gemisch vor Verdunstung zu schützen. Im letzten Arbeitsgang wurde das Eppendorf Cup in den Thermocycler (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Varius V) gestellt und die PCR gestartet.

2.2.6. Gelelektrophorese

Die nachfolgende Methodik der Gelelektrophorese beschreibt die Arbeitsschritte zur Herstellung eines 3%igen Agarose-Gels. Alle anders konzentrierten Agarose-Gele wurden auf die gleiche Weise hergestellt bzw. es wurde bei der Gelelektrophorese gleichartig verfahren.

Zu Beginn wogen wir 1,5g Agarose für ein 3%iges Agarose-Gel mit der Waage (Mettler ⁽²¹⁾, Typ AE163) ab. Die 1,5g Agarose ergeben sich aus der Endmasse der Gellösung von 50ml bzw. 50g. Die Agarose wurde nachfolgend in 50ml TBE-Puffer in einem Erlenmyerkolben gelöst und in der Mikrowelle (Whirlpool ⁽³²⁾, VIP 20) bei 900 Watt für 2-3 Minuten belassen. In dieser Zeit bereiteten wir die Gelkammer vor. D.h. die offenen Seitenflächen wurden mit Tesaband (Tesa ⁽³¹⁾, Extra Power Gewebeband) verschlossen und der die Taschen bildende Kamm eingesetzt. Die Elektrophoresekammer (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, Typ SHU13) wurde jetzt mit TBE-Puffer (BioRad ⁽⁴⁾, 10x Tris/Boric Acid/EDTA (TBE), 1L, Art.Nr.161-0733) gefüllt, so dass später das gesamte Gel von TBE-Puffer bedeckt war. Für den folgenden Arbeitsgang sollten zum Schutz der Gesundheit Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Da Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, 10ml, Art.Nr.E1510) hochgiftig ist, müssen Nitril-Handschuhe (Haddenham Healthcare, SafeEx, Art.Nr.371714) getragen werden. Die nun stark erhitzte Agarose/TBE-Puffer-Lösung wurde jetzt unter fließendem Wasser leicht abgekühlt, 1µl Ethidiumbromid hinzugefügt und unter leichtem Schwenken kurz durchmischt. Die Agarose/TBE-Puffer/Ethidiumbromid-Lösung gossen wir nun, ohne

Blasen zu verursachen, vorsichtig in die Gelkammer. Nach ca. 60 Minuten war das Gel milchig geworden und damit einsatzbereit. Die Seitenteile (Tesaband) wurden, wie auch der Kamm, entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Die cDNA musste vor dem Einsetzen in die Gelkammer noch mit einer Lösung (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, 6x Loading Dye, Art.Nr.R0611) gefärbt werden.

Dies war notwendig, um den Stand der Elektrophorese ohne UV-Licht beurteilen zu können. Dazu wurden 13µl cDNA und 2µl Farbstoff in ein Eppendorf Cup (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) gegeben, durchgemischt und in eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert. In eine ausgewählte Tasche des Gels setzten wir nun den Referenzmarker (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, GeneRuler, Art.Nr.SM0241) ein und nach Anschluss an die Stromquelle (BioRad ⁽⁴⁾, Modell 200/2.0 Power Supply) konnte die Elektrophorese gestartet werden.

Nach 1 bis 2 Stunden kontrollierten und dokumentierten wir anschließend das Ergebnis der Elektrophorese bzw. der PCR unter UV-Licht (MWG Biotech ⁽²²⁾), mit Kamera (Biophotonics Corp. ⁽⁵⁾, Gelprint 1000i) und Drucker (Sony Corp.). Anhand des Referenzmarkers und der bekannten Anzahl an Basenpaaren des PCR-Produktes, konnte jetzt eine Aussage über das Ergebnis der PCR getroffen werden.

2.2.7. Statistische Testverfahren

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 T-Test verwendet. Die Signifikanz wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Als signifikant galten p-Werte $< 0,05$ mit jeweils entsprechendem 95%-Konfidenzintervall. Alle gemessenen Daten bzw. erhobenen Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

Nachdem in unserer ersten Studie die Expression von IL8, PAR2, PSTI und T8 in vivo bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen M. Crohn und Colitis ulcerosa untersucht wurde, stellte sich die Frage nach den Veränderungen PAR2 beeinflussender Faktoren, wie z.B. den membranständigen Serin Proteasen (TTSP). Deshalb wurden Schleimhautproben einer Kontrollgruppe mit gesundem Darm (grüner Balken) mit solchen von an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa Erkrankten verglichen. Nach der Gewinnung der Epithelzellen erfolgte die Isolierung der RNA und die Messung der o.g. Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR.

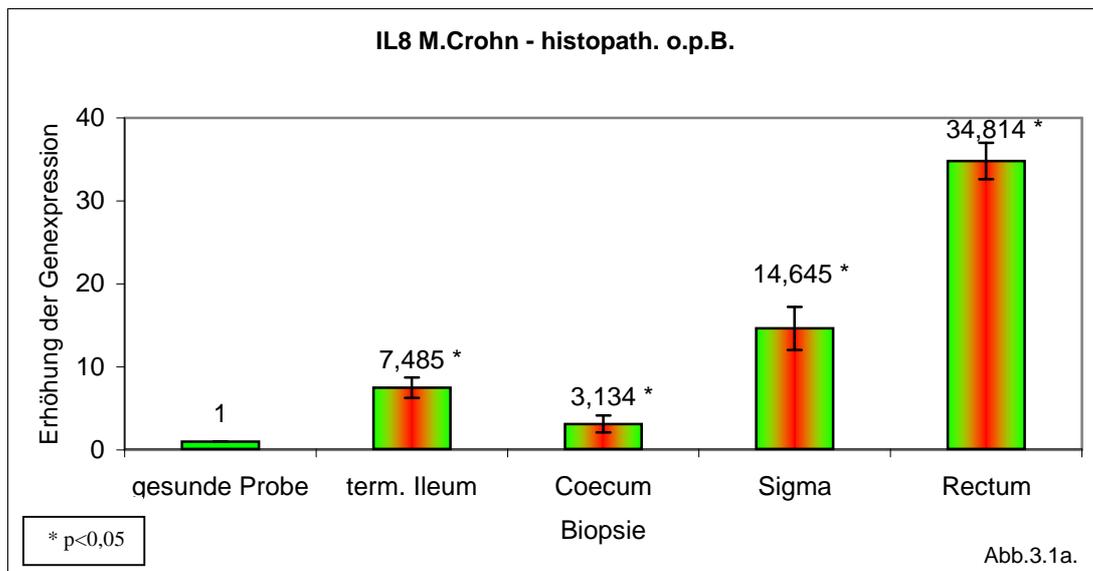
Die Gewebeproben von den Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa wurden weiter, entsprechend dem histopathologischen Befund, differenziert. Proben die histopathologisch eine Entzündung zeigten, wurden in den folgenden Diagrammen mit rotem Balken, Proben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die histopathologisch einen Normalbefund aufwiesen, wurden mit einem rot-grünen Balken dargestellt.

In den nachfolgenden Diagrammen werden die Expression von IL8, PAR2, PSTI, T8, TMPRSS2, TMPRSS4, MTSP-1 und Hepsin in den Schleimhautproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa gezeigt. Dabei stammen die Diagramme und Daten für IL8, PAR2, PSTI und T8 aus der vorherigen Arbeit „Regulation der PAR2 Genexpression durch entzündliche Stimuli im Intestinum“.

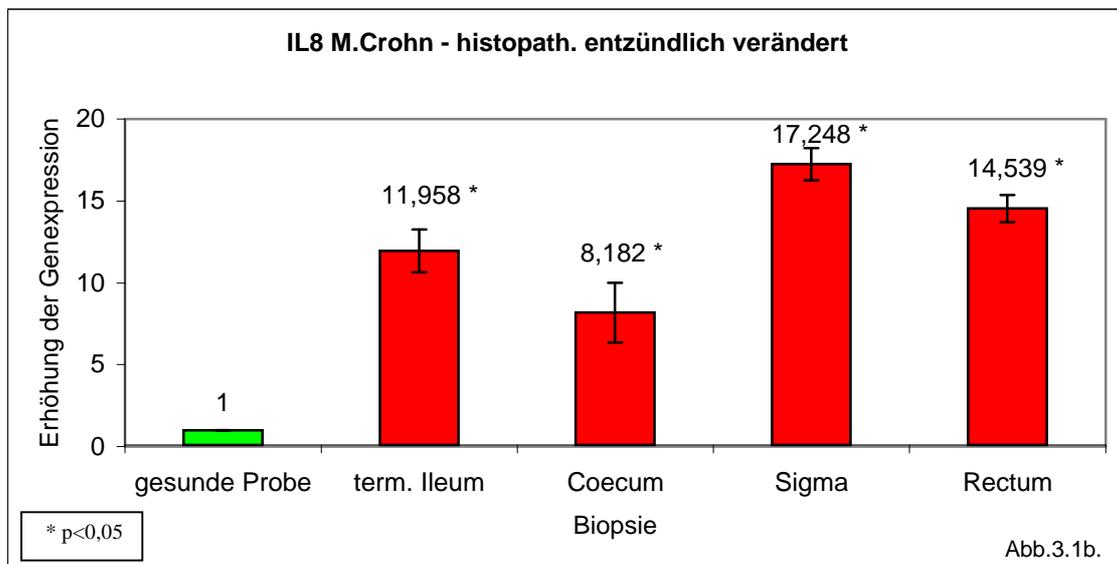
In den Grafiken werden die Balken, welche statistisch signifikante ($p < 0,05$) Ergebnisse darstellen mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Außerdem sind in jedem Diagramm die Standardabweichungen wiedergegeben.

3.1. Gewebeproben von M. Crohn Patienten

Die statistisch signifikante Steigerung der IL8 Expression ($p < 0,05$) ließ sich bei den entzündeten Proben (Abb.3.1b.) im terminalen Ileum (12fach), im Caecum (8fach) und im Sigma (17fach) nachweisen. Bei den nicht entzündeten Proben (Abb.3.1a.) war IL8 gesteigert, lag jedoch unter der Expression der entzündeten Proben (terminales Ileum 7,5fach, Caecum 3,1fach, Sigma 14,6fach). Auffällig war eine veränderte IL8 Expression im Rectum, die bei den nicht entzündlichen Proben (Abb.3.1a.) 34,8fach und bei den entzündeten Proben (Abb.3.1b.) 14,5fach gesteigert war.



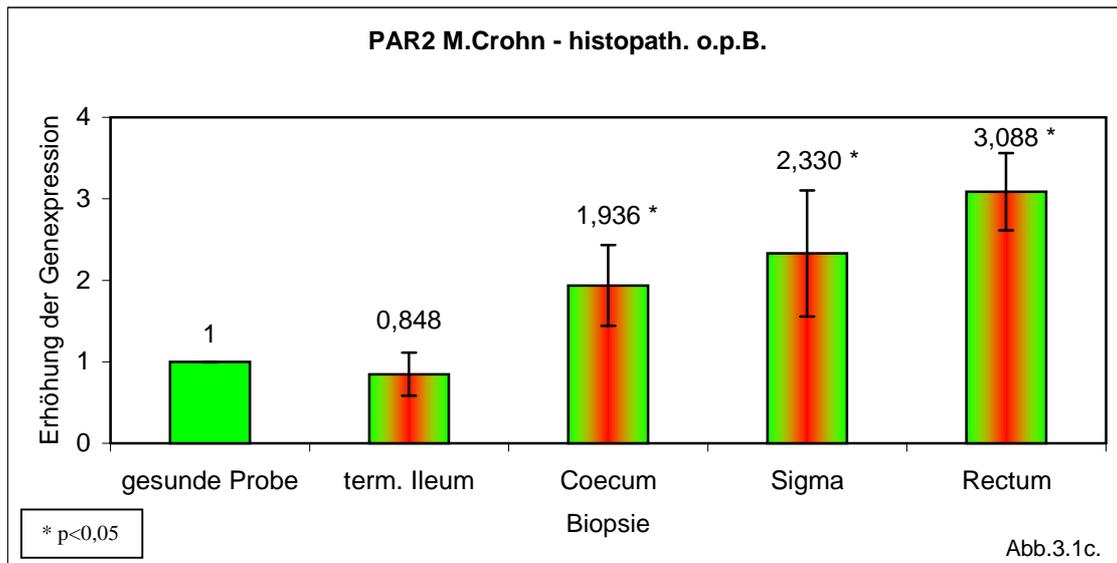
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: term. Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



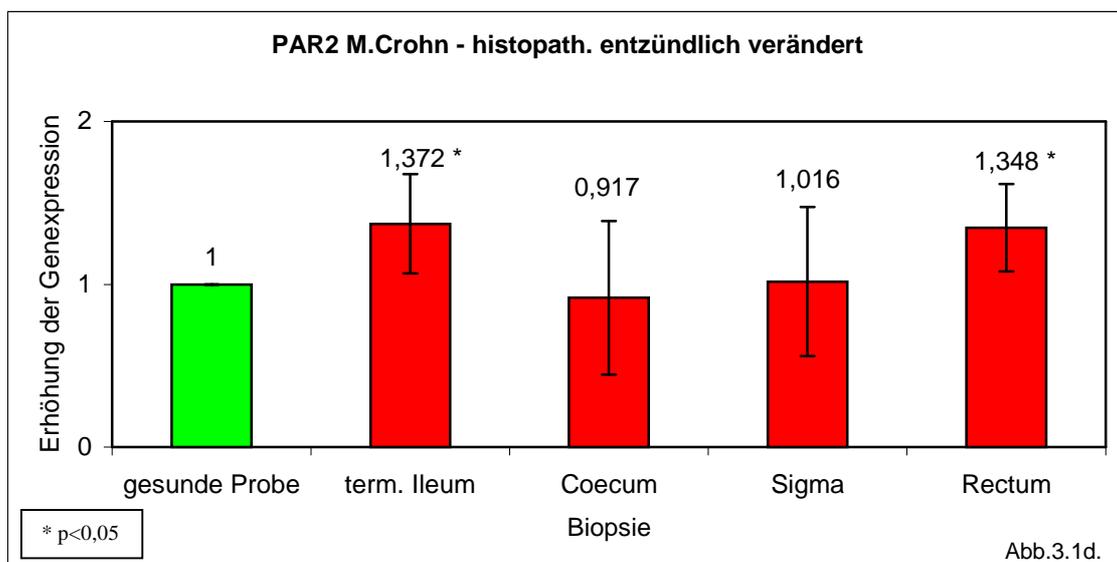
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Im Vergleich von entzündlich veränderten M. Crohn-Proben (Abb.3.1d.) und nicht entzündlich veränderten (Abb.3.1c.) zeigte sich eine gering verringerte PAR2 Expression (0,8fach) im Bereich des terminalen Ileums bei den nicht entzündeten Proben, während bei den entzündeten Proben kaum eine Veränderung der PAR2 Aktivität vorlag (0,9- bis 1,3fach). Bei den restlichen nicht entzündeten Proben ließ sich eine Steigerung der PAR2 Aktivität bis auf das 3,1fache nachweisen.



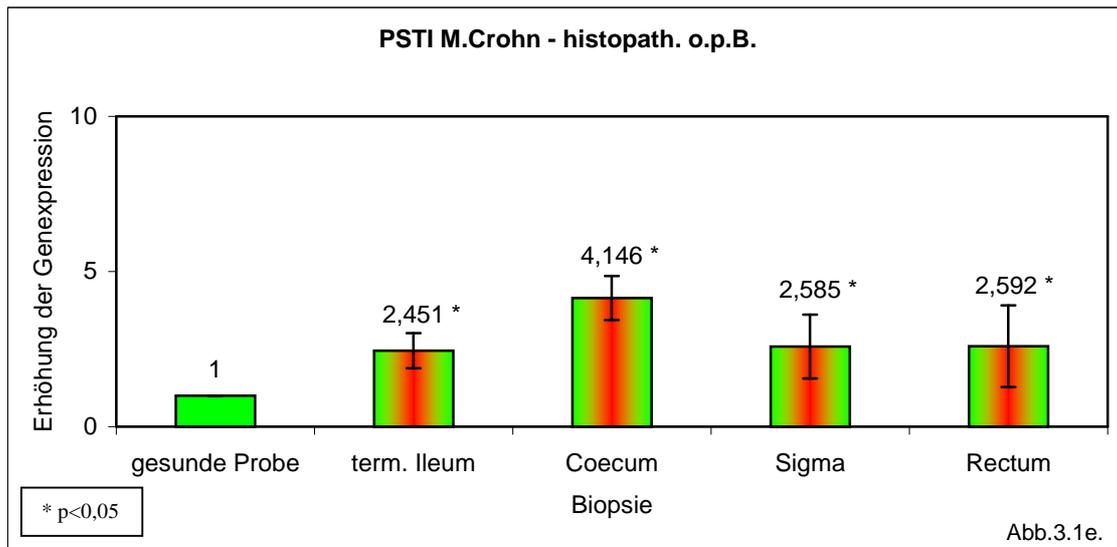
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



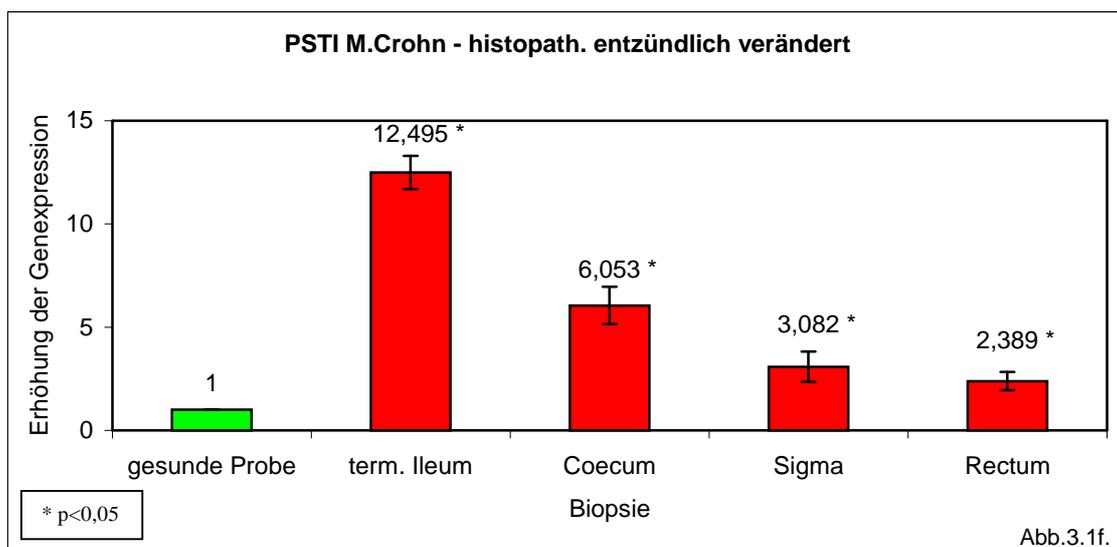
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coesum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Die entzündlich veränderten Patienten-Proben (Abb.3.1f.) zeigten eine Steigerung der PSTI Expression im terminalen Ileum (12,5fach), Caecum (6fach) und Sigma (3fach) und im Rectum (2fach). Bei den M. Crohn Patienten-Proben, bei denen sich histologisch keine Entzündungsaktivität nachweisen ließ (Abb.3.1e.), war die Genexpression deutlich geringer erhöht (terminales Ileum (2fach), Caecum (4fach), Sigma (2,6fach), Rectum (2,5fach)), als bei den entzündlich veränderten Proben.



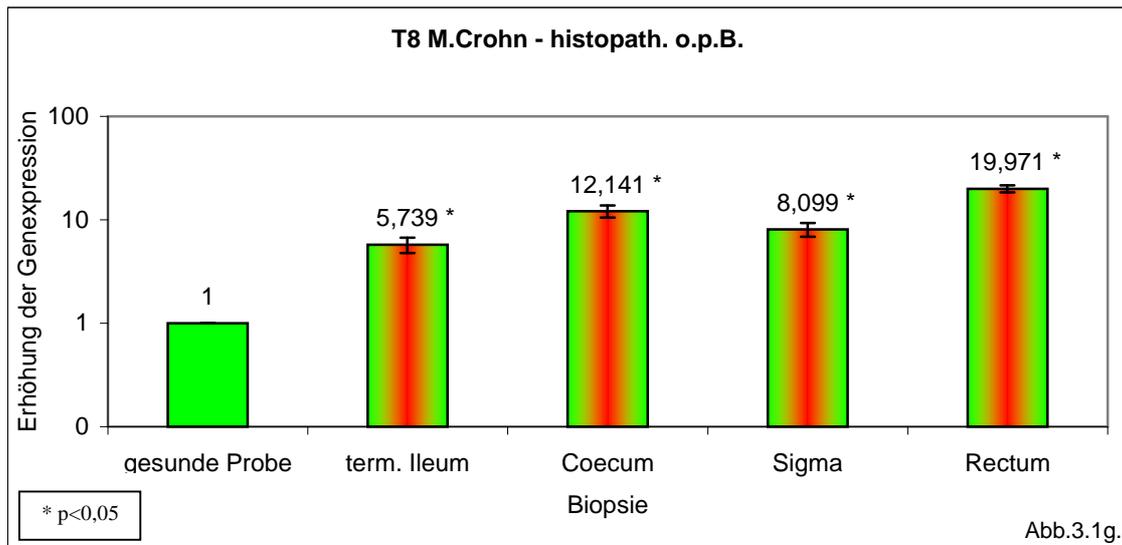
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



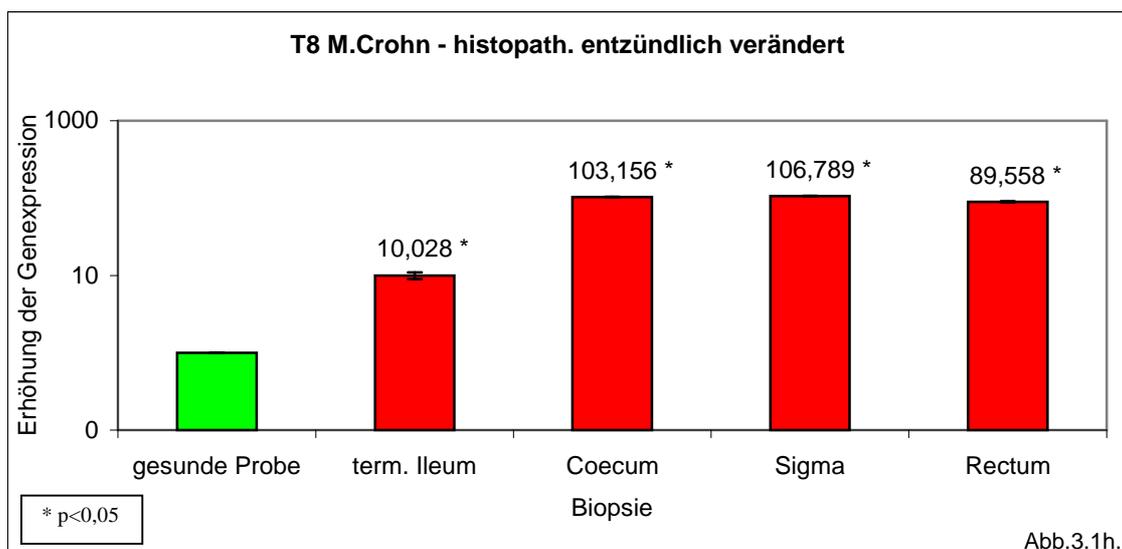
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Die Genexpression von T8 war bei den akut entzündeten Proben (Abb.3.1h.) in Bezug zur gesunden Kontrollgruppe im term. Ileum (10fach), im Coecum (103fach), im Sigma (106fach) und im Rectum (90fach) deutlich gesteigert. Bei den nicht entzündlich veränderten Patienten Proben (Abb.3.1g.) fiel die Steigerung der Genexpression im term. Ileum (5fach), im Coecum (12fach), im Sigma (8fach) und im Rectum (20fach) insgesamt geringer, jedoch dennoch erhöht aus.



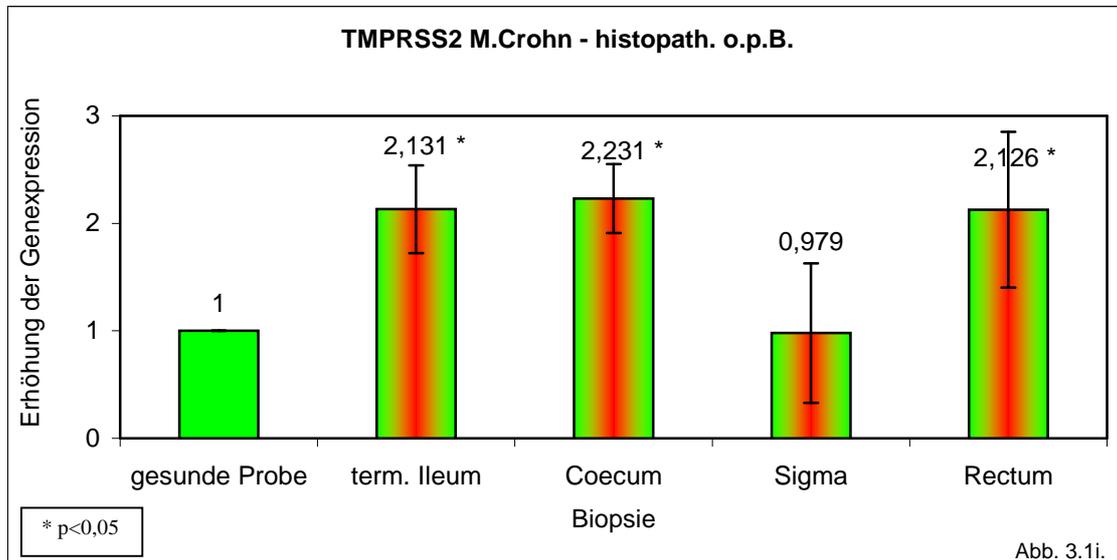
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



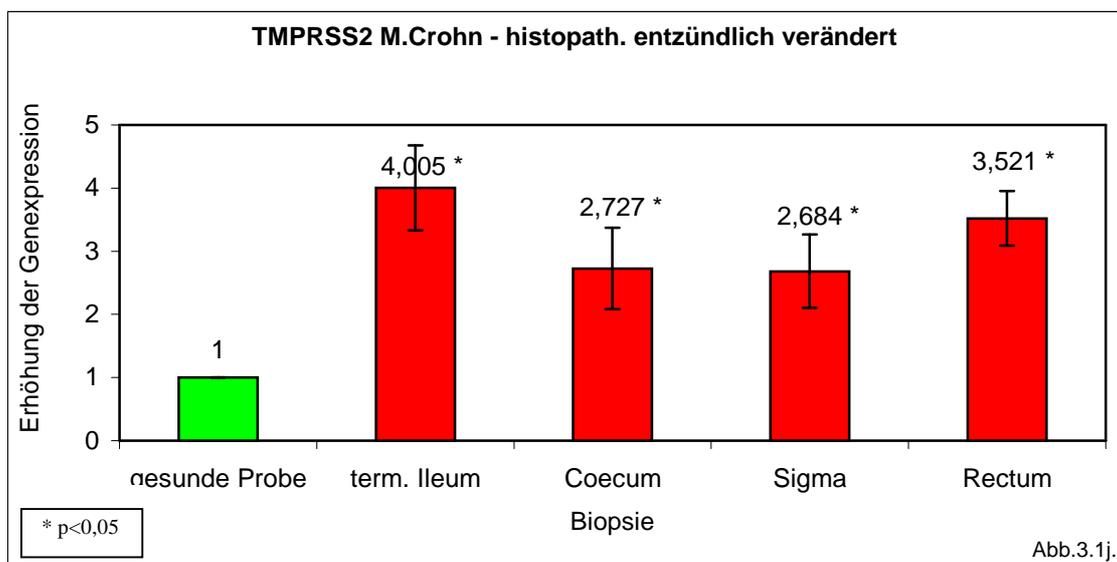
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Die Genexpression von TMPRSS2 war im Vergleich zu den gesunden Probanden bei den entzündlich veränderten Patientenproben (Abb.3.1i.) im terminalen Ileum (4fach), Coecum (2,7fach), Sigma (2,7fach) und Rectum (3,5fach) statistisch signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Bei den nicht entzündlich veränderten Proben (Abb.3.1j.) zeigte sich eine bis auf das Sigma in allen Darmabschnitten 2fach gesteigerte Genexpression.



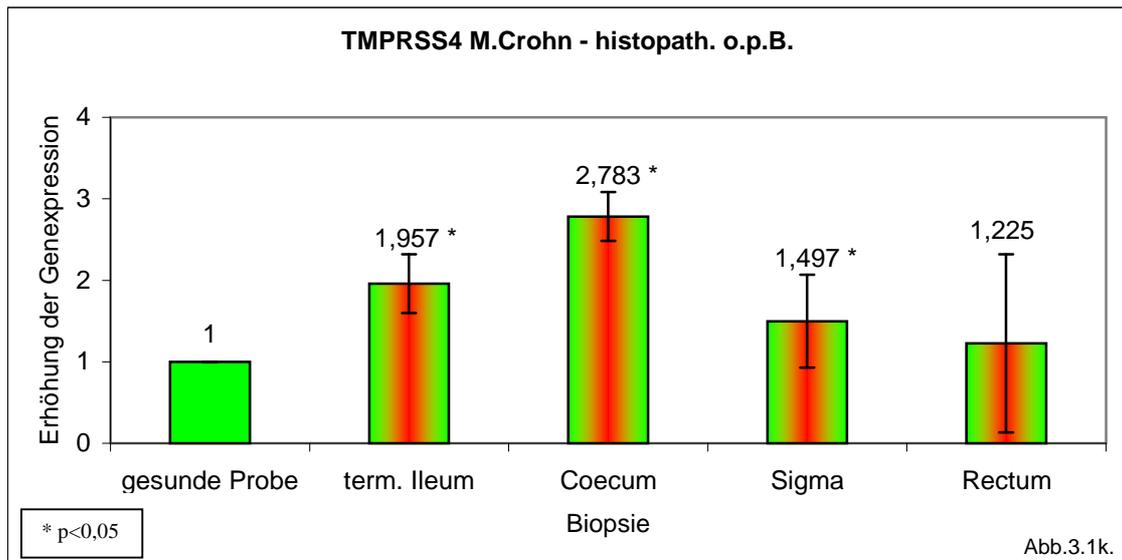
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



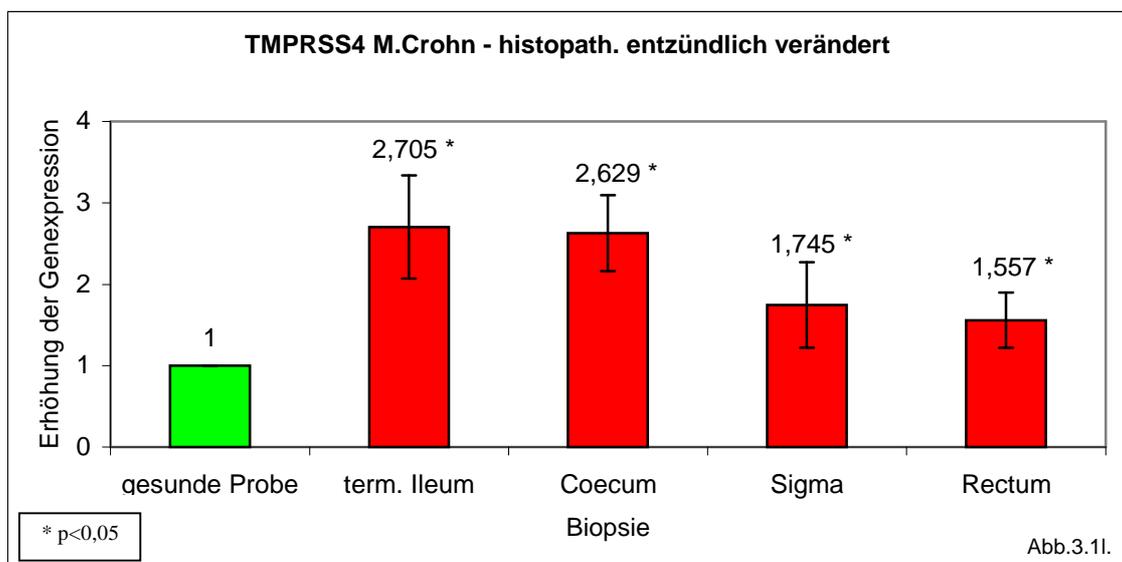
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Die Genexpression von TMPRSS4 war in allen gemessenen Darmabschnitten erhöht. Bei den entzündlich veränderten Proben (Abb.3.11.) war die TMPRSS4 Genexpression im terminalen Ileum (2,7fach), Coecum (2,6fach), Sigma (1,7fach) und im Rectum (1,6fach) gesteigert. Bei den nicht entzündeten Proben (Abb.3.1k.) war die TMPRSS4 Expression im terminalen Ileum (2fach), Coecum (2,7fach), Sigma (1,5fach) angestiegen und im Rectum (1,2fach) kaum verändert.



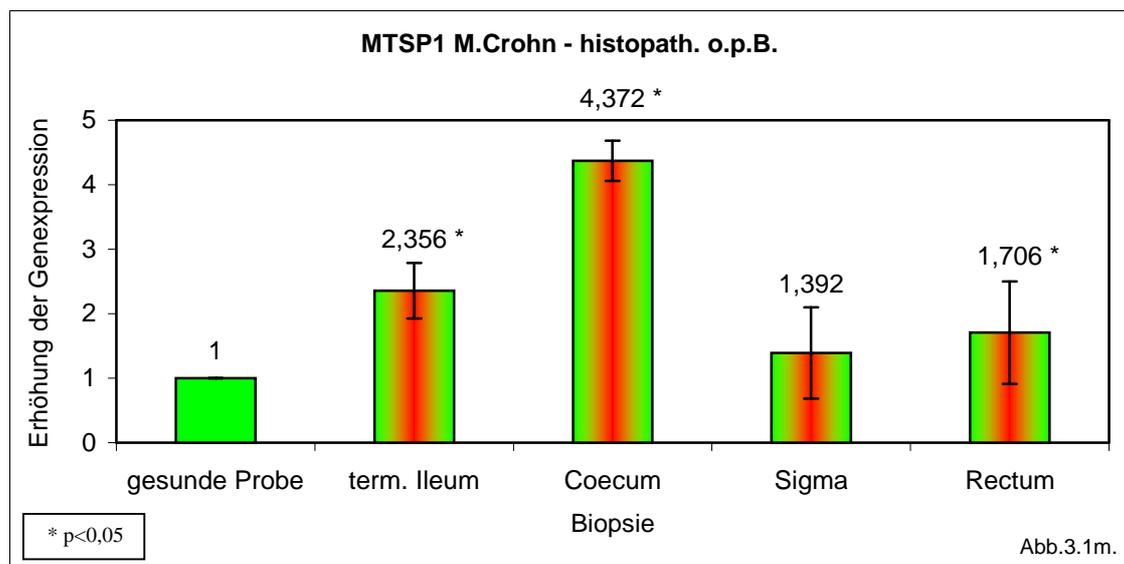
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



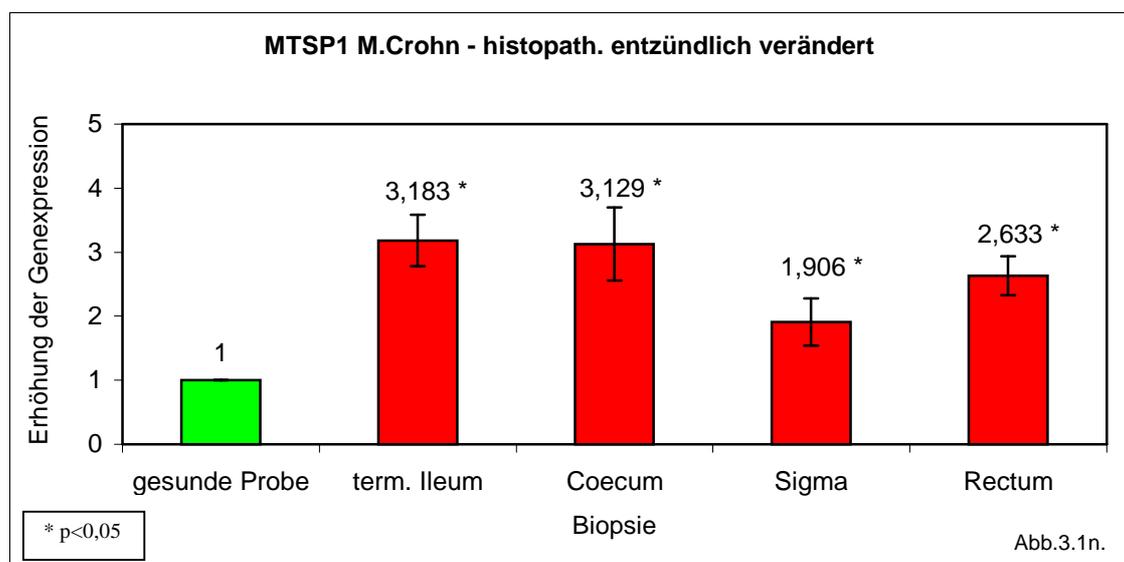
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Bei den entzündlich, wie auch den nicht entzündlich veränderten Proben war in allen Darmabschnitten eine statistisch signifikante Steigerung ($p < 0,05$) der MTSP-1 Genexpression nachweisbar. Bei den entzündlich veränderten Proben (Abb.3.1n.) war ein Maximum der Expression im terminalen Ileum (3fach) und im Coecum (3fach) sowie eine gesteigerte Expression im Sigma (1,9fach) und Rectum (2,6fach) messbar. Bei den nicht entzündlichen veränderten Proben (Abb.3.1m.) war die Genexpression maximal im Coecum (4fach) jedoch auch im terminalen Ileum (2,3fach) und im Rectum (1,7fach) gesteigert.



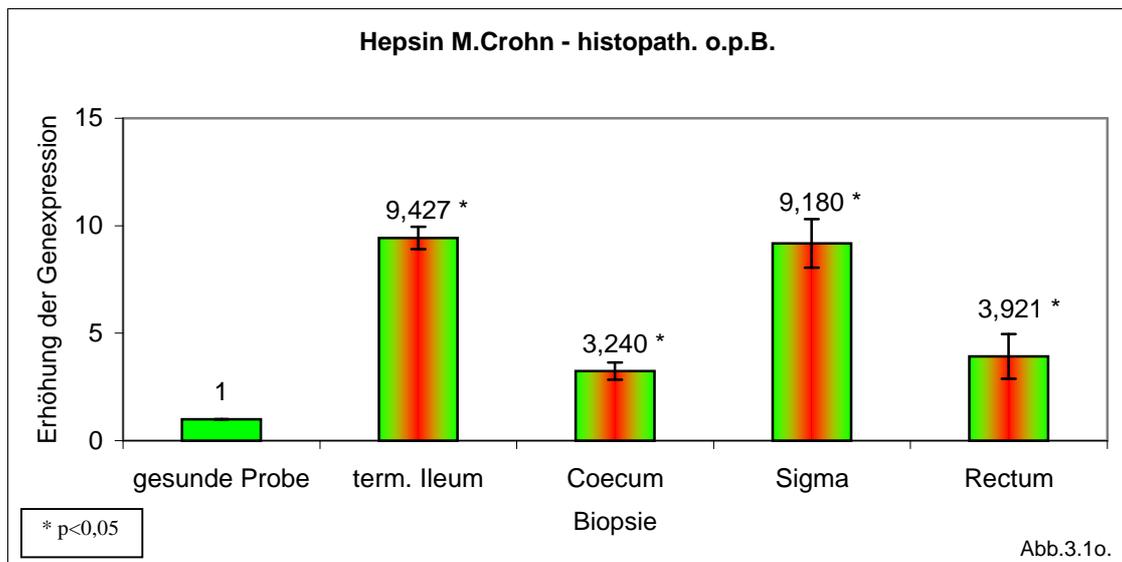
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



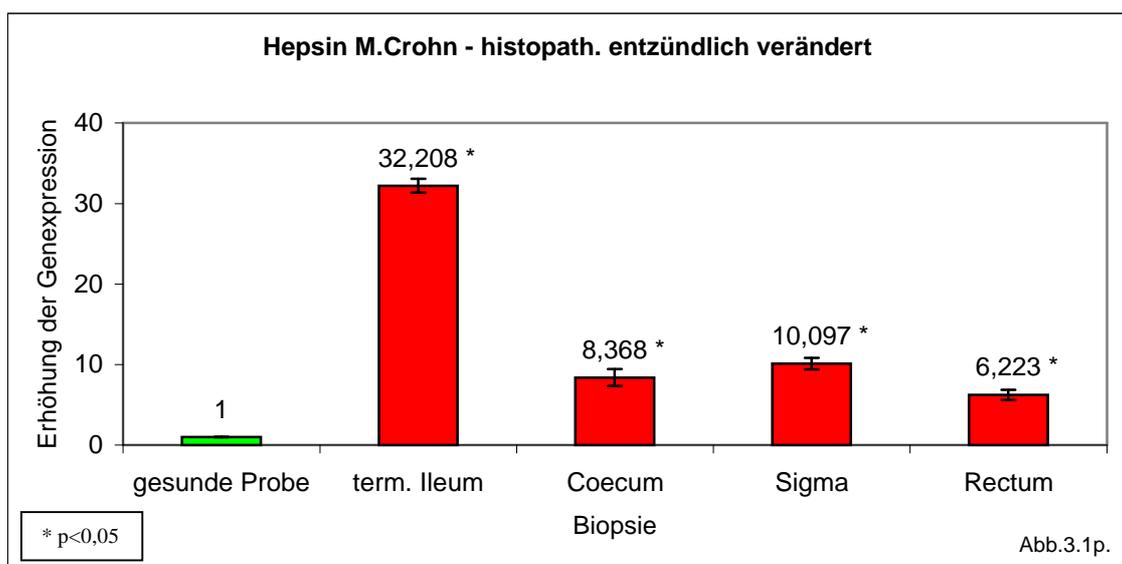
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn

Die Genexpression von Hepsin war bei Patienten mit M. Crohn in beiden Patientenkollektiven (entzündlich/ nicht entzündlich verändert) statistisch signifikant gesteigert ($p < 0,05$). Bei den Patienten im akuten Entzündungsschub (Abb.3.1p.) war die Genexpression von Hepsin im terminalen Ileum auf ein Maximum mit 32fachem Anstieg, im Coecum (8fach), Sigma (10fach) und Rectum (6fach) erhöht. Dem gegenüber konnte bei den nicht entzündlich veränderten Proben (Abb.3.1o.) eine geringere Steigerung der Genexpression (terminales Ileum: 9fach, Coecum: 3fach, Sigma: 9fach, Rectum: 4fach) gefunden werden.



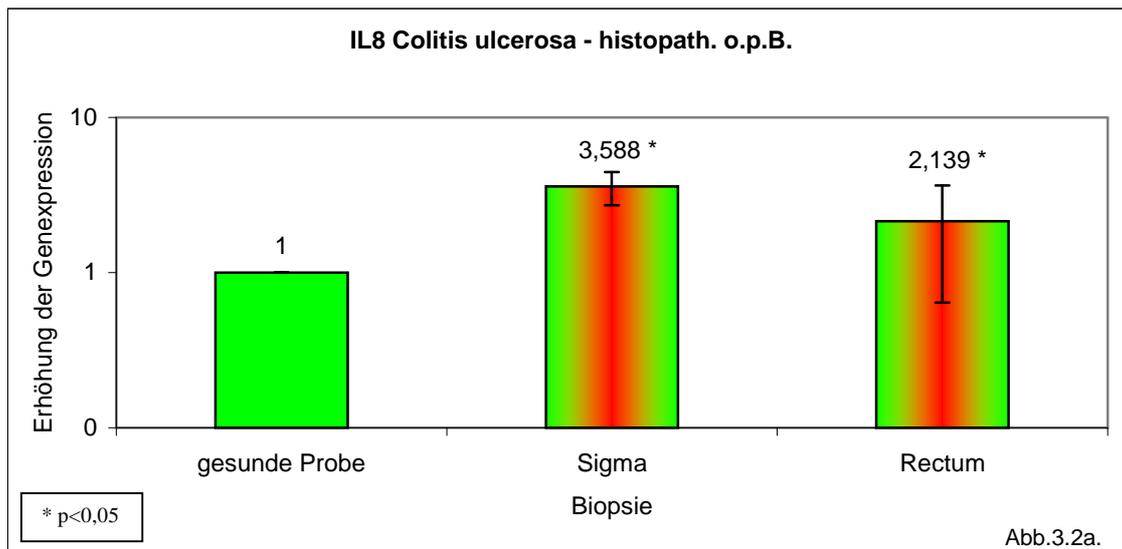
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



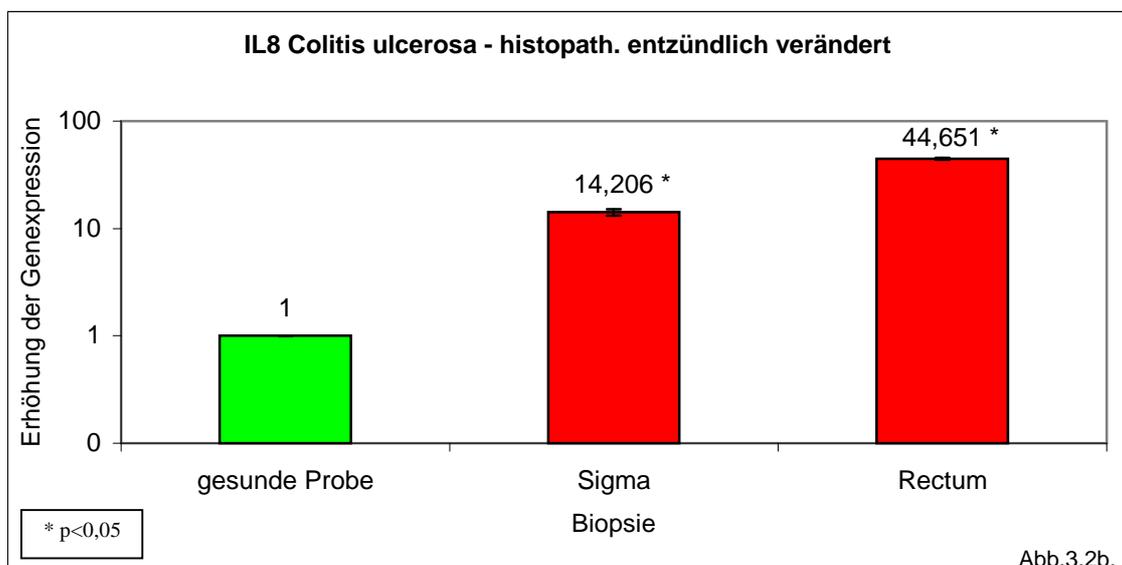
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

3.2. Gewebeproben von Colitis ulcerosa Patienten

Für die IL8 Expression in den entzündeten Colitis-Proben (Abb.3.2b.) ließ sich in Sigma bzw. Rectum eine Induktion der Genexpression mit 14- bzw. 44facher Erhöhung nachweisen. In den nicht entzündeten Colitis-Proben (Abb.3.2a.) konnte eine 3,6fache Steigerung im Sigma und eine 2,1fache Steigerung im Rectum gezeigt werden.



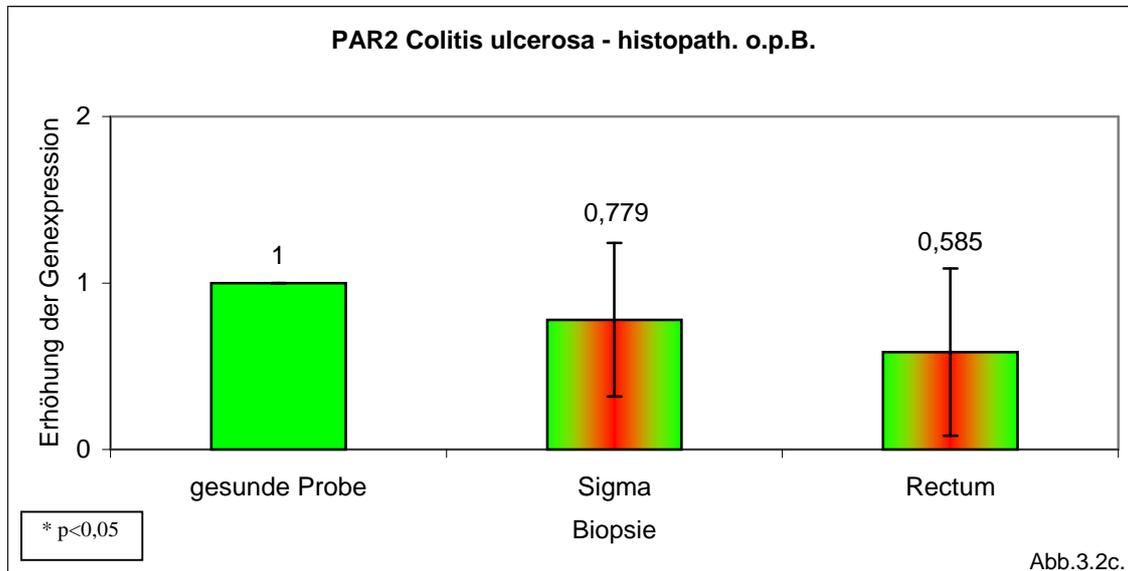
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



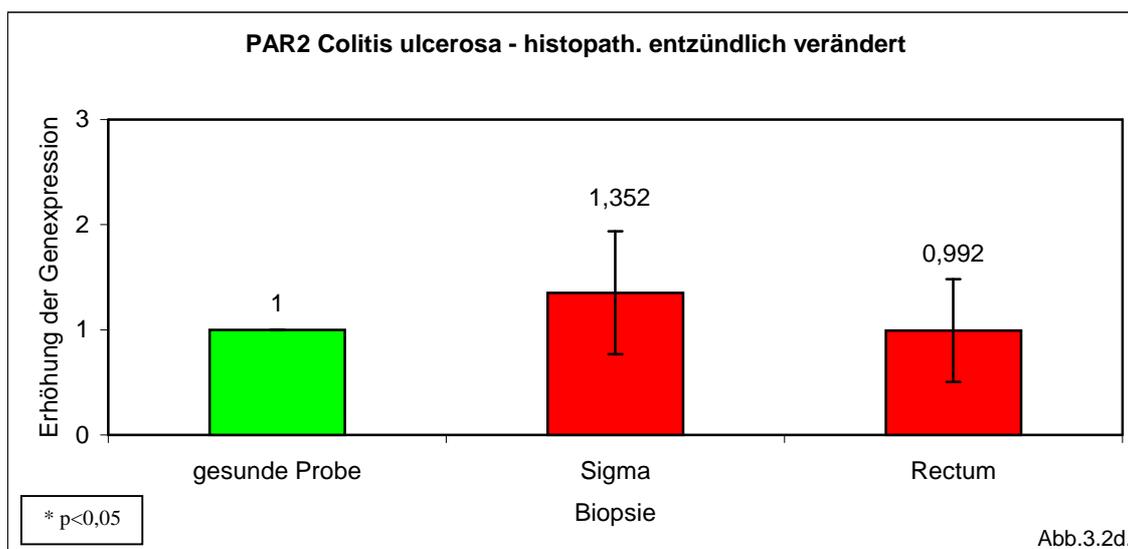
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma (S): 12, Rectum(R): 12
n-gesund: (S):11, (R):10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Bei den entzündlich veränderten Colitis-Proben (Abb.3.2d.) zeigte sich eine geringe statistisch nicht signifikante Suppression von PAR2 im Sigma und Rectum auf das 0,8- bzw. 0,6fache. In den nicht entzündeten Colitis-Proben (Abb.3.2c.) war PAR2 im Sigma auf das 1,3- und im Rectum nicht gesteigert.



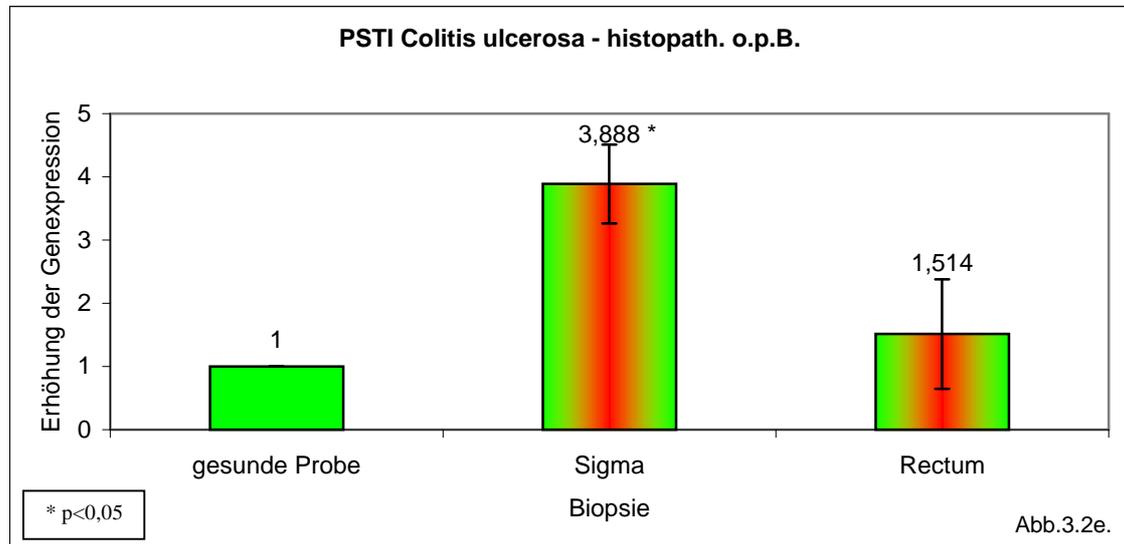
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



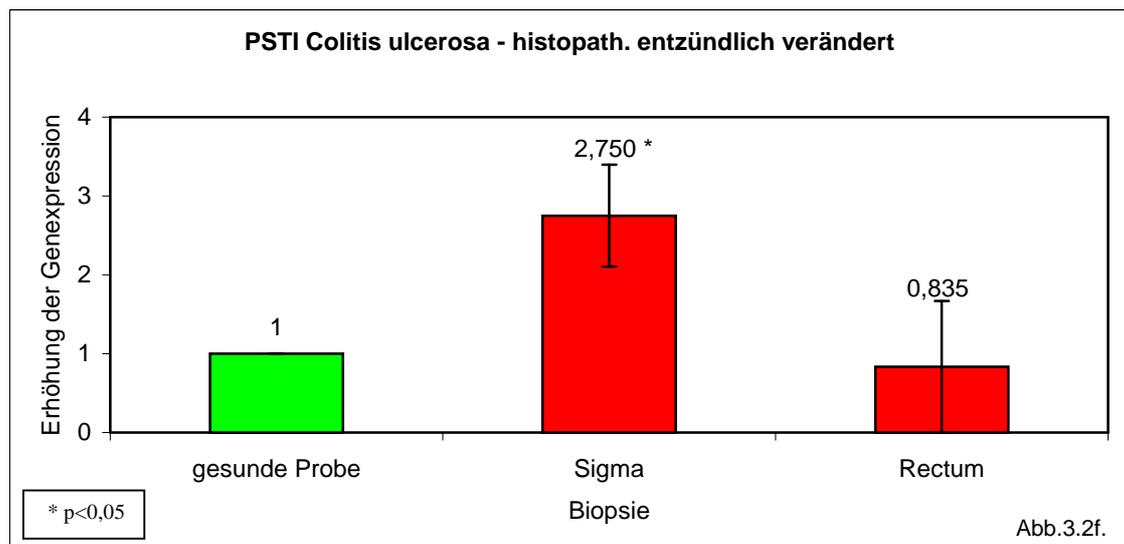
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Bei den histologisch nicht entzündeten Colitis ulcerosa Proben (Abb.3.2e.) war die PSTI Genexpression im Sigma auf das 3,9fache und im Rectum auf das 1,5fache erhöht. Die histologisch nachgewiesen entzündlich veränderten Proben (Abb.3.2f.) zeigten einen Anstieg der PSTI Genexpression im Sigma auf das 2,8fache und im Rectum eine Supression auf das 0,8fache.



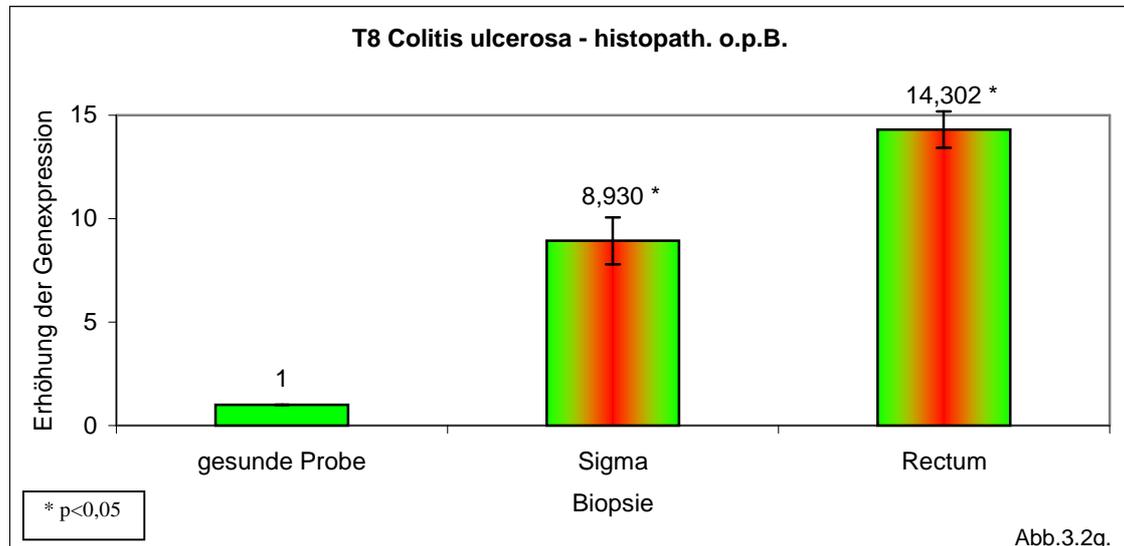
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



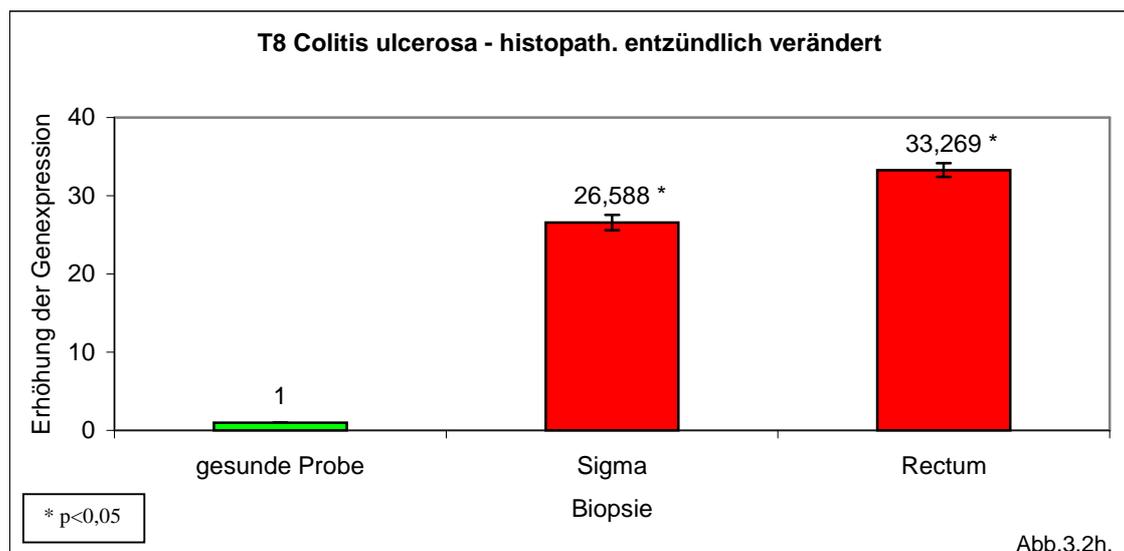
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Für die T8 Expression fand sich bei den nicht entzündeten Colitis ulcerosa Proben (Abb.3.2g.), im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, eine im Sigma 8,9- bzw. im Rectum 14,3fache Induktion und eine deutlicher ausgeprägte Induktion von 26,6- bzw. 33,3fache bei den entzündeten Colitis ulcerosa Proben (Abb.3.2h.).



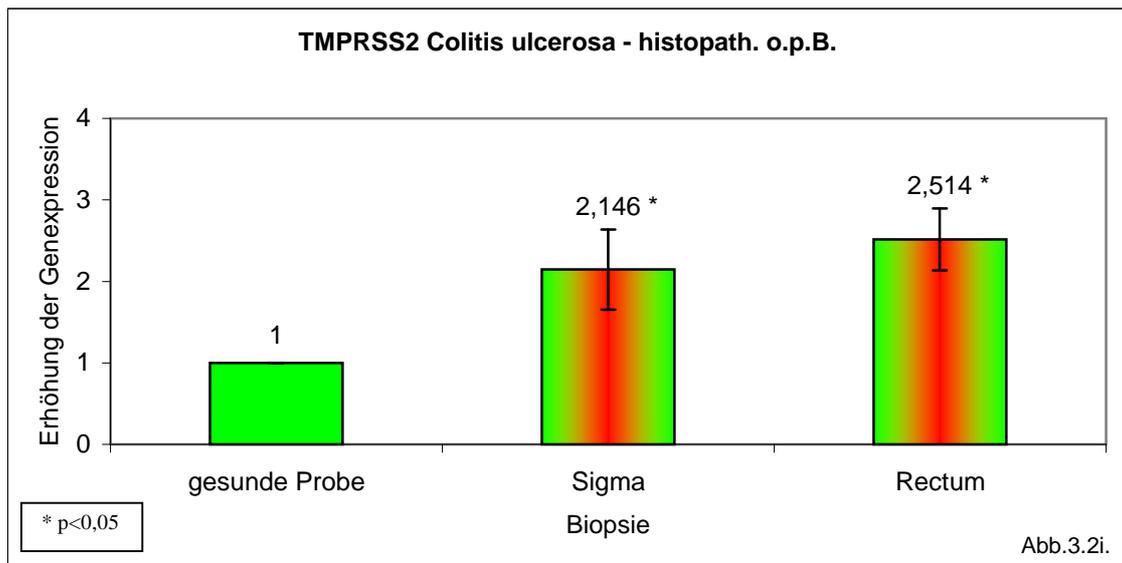
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



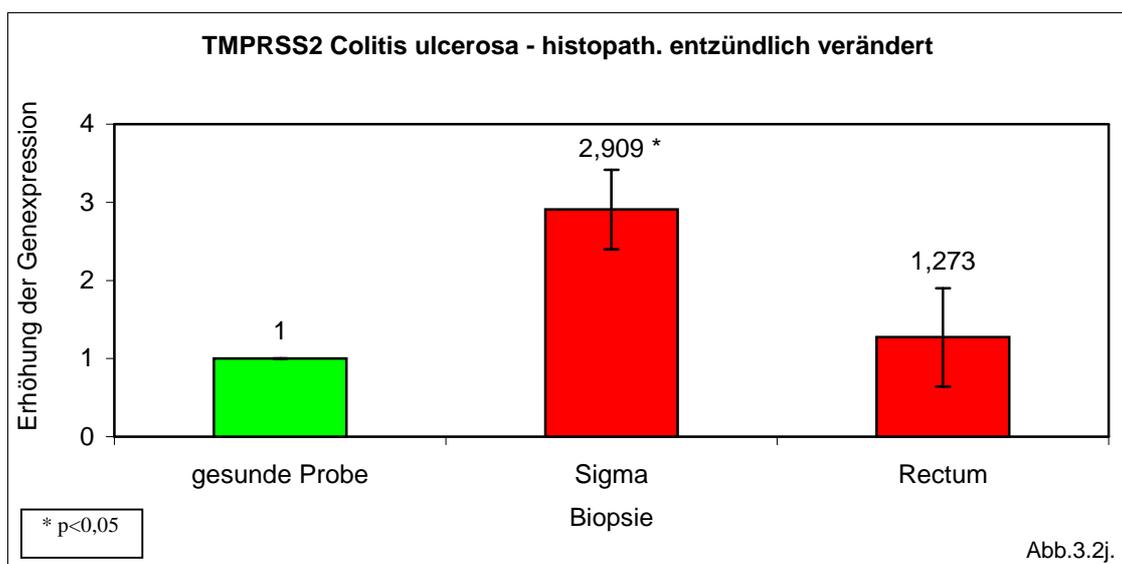
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Die Genexpression von TMPRSS2 war in beiden Colitis ulcerosa Patientenkollektiven im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Dabei betrug die Genexpression bei den akut entzündlich veränderten Proben (Abb.3.2j.) im Sigma (3fach) und im Rectum (1,3fach). Bei den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben (Abb.3.2i.) war eine Steigerung der Expression im Sigma (2fach) und im Rectum (2,5fach) nachweisbar.



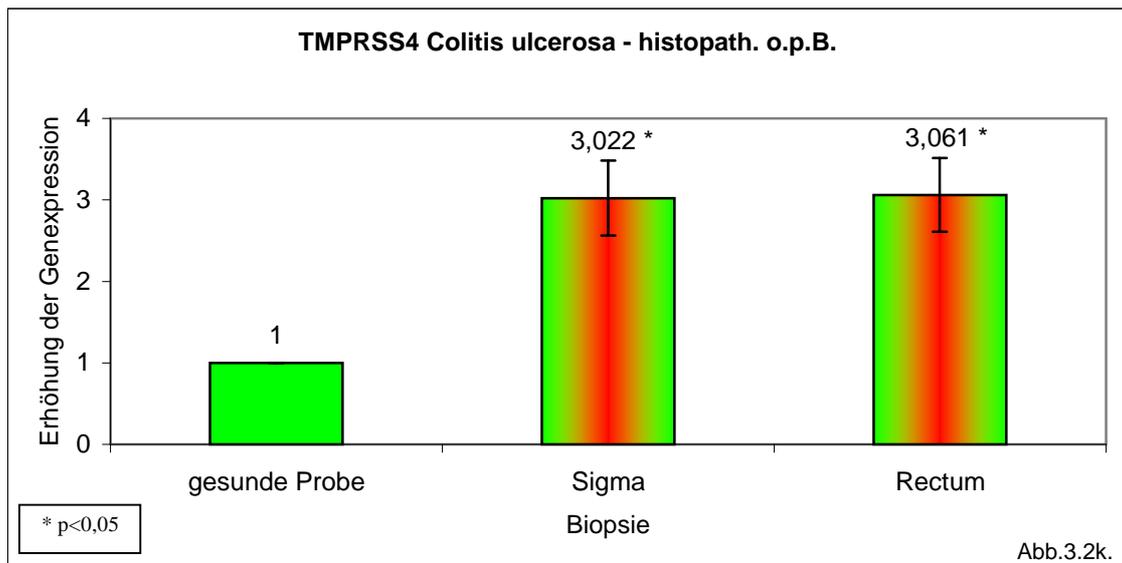
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
 n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



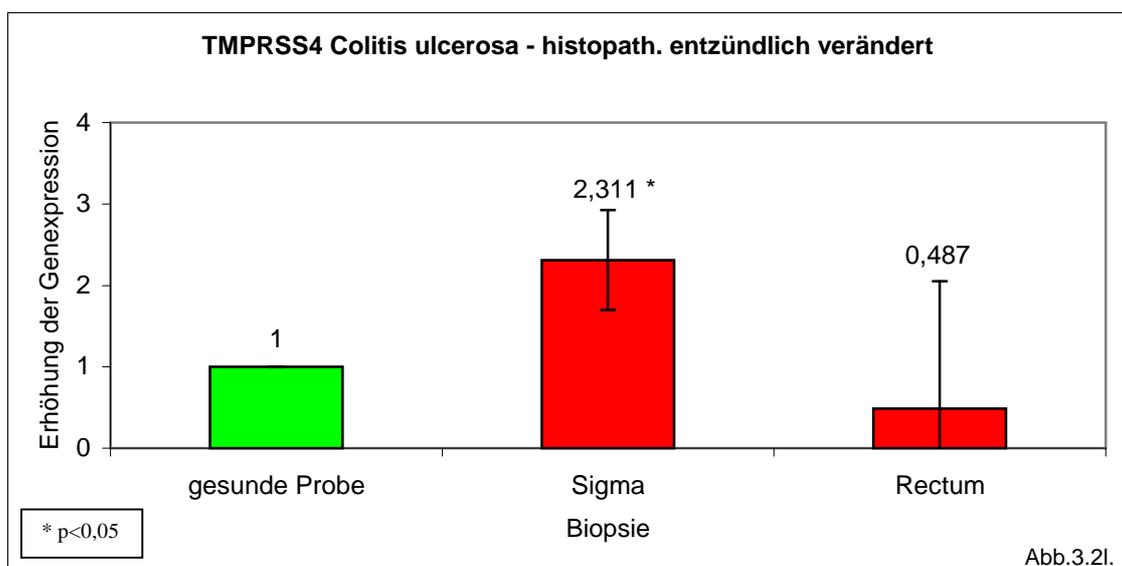
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
 n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Im Vergleich von Proben von Colitis ulcerosa Patienten, die sich im akuten Entzündungsschub (Abb.3.2l.) befinden, zur gesunden Kontrollgruppe war die TMPRSS4 Genexpression im Sigma (2,3fach) gesteigert und im Rectum (0,5fach) gesenkt. Die nicht entzündlich veränderten Colitis ulcerosa Gewebeproben (Abb.3.2k.) wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Steigerung der Genexpression im Sigma (3fach) und im Rectum (3fach) auf.



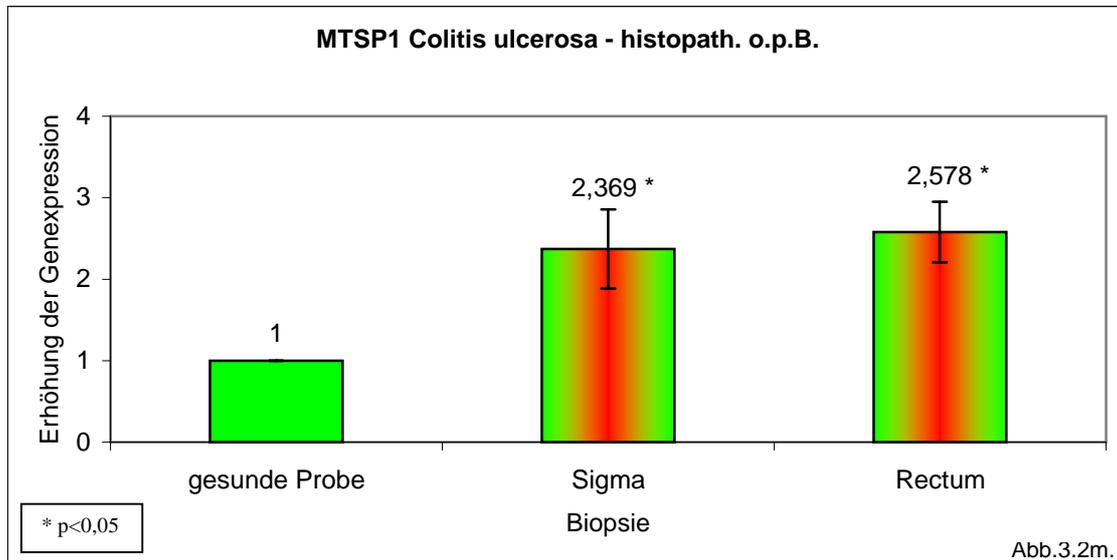
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



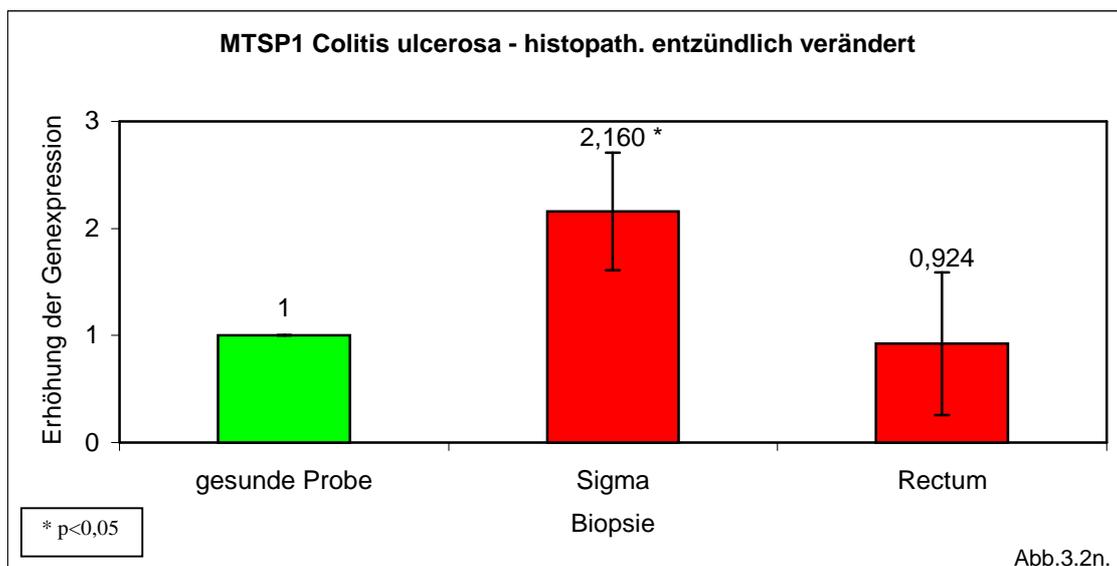
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Die Genexpression von MTSP1 war bei den Patienten mit Colitis ulcerosa, welche keine pathohistologische Entzündungsaktivität zeigten (Abb.3.2.m.), im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe im Sigma (2,4fach) und im Rectum (2,6fach) gesteigert. Die Genexpression bei den akut entzündlich veränderten Proben (Abb.3.2.n.) wies im Sigma eine Steigerung (2,2fach) auf und war im Rectum kaum verändert.



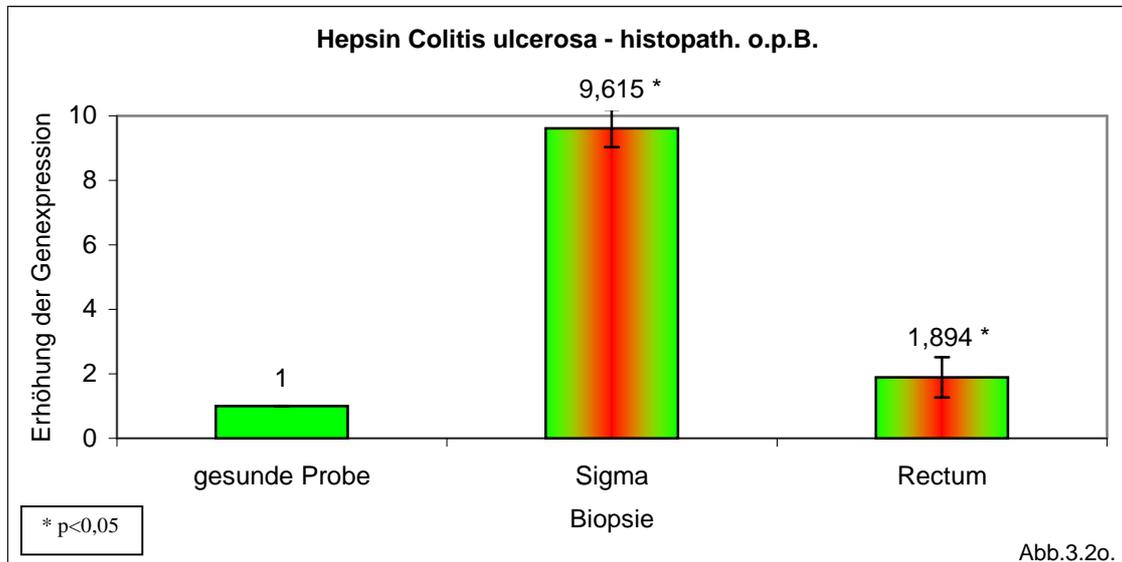
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



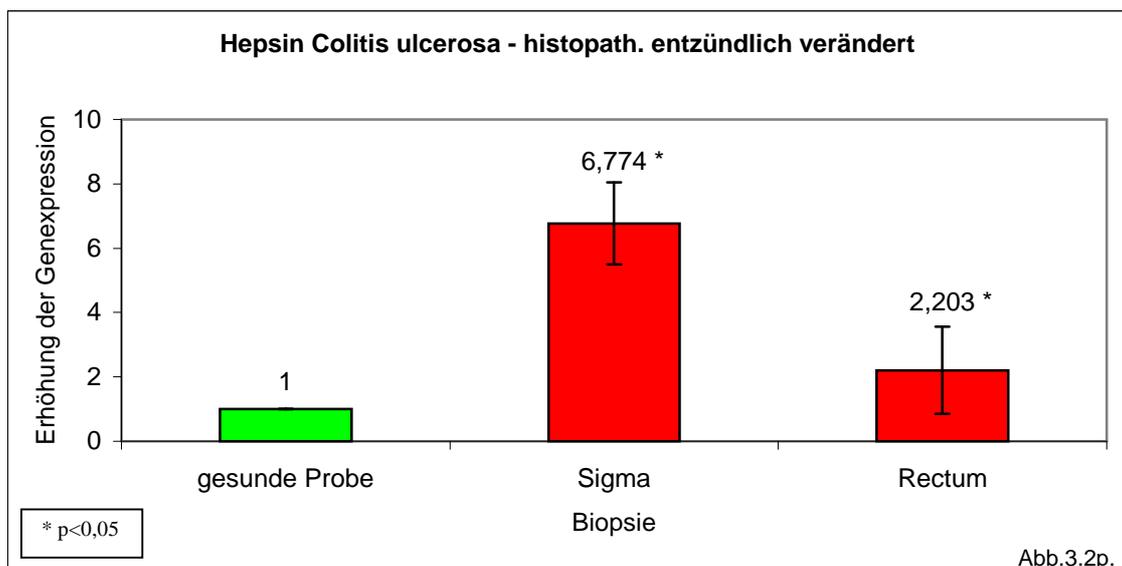
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Die Genexpression von Hepsin war in den entzündlich veränderten Colitis ulcerosa Patienten Proben (Abb.3.2p.), bezogen auf die gesunde Kontrollgruppe, im Sigma (7fach) und im Rectum (2fach) erhöht. Die Genexpression bei den nicht entzündlich veränderten Patientenproben (Abb.3.2o.) war im Sigma (10fach) und im Rectum (2fach) angestiegen.



Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR



Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Gewebeproben

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Biopsieproben:

Genexpression chronisch entzündliche Darmerkrankung	Darmabschnitt	IL8	PAR2	PSTI	T8
M. Crohn nicht entzündet	terminales Ileum	+	0	+	+
	Coecum	+	+	+	++
	Sigma	++	+	+	+
	Rectum	++	+	+	++
M. Crohn entzündet	terminales Ileum	++	0	++	++
	Coecum	+	0	+	+++
	Sigma	++	0	+	+++
	Rectum	++	0	+	++
Colitis ulcerosa nicht entzündet	Sigma	+	0	+	+
	Rectum	+	-	+	++
Colitis ulcerosa entzündet	Sigma	++	0	+	++
	Rectum	++	0	0	++
>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --					

Die Genexpression von IL8 war bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa) in den nicht entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 7fach, Coecum: 3fach, Sigma: 15fach, Rectum: 35fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 4fach, Rectum: 2fach), wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 12fach, Coecum: 8fach, Sigma: 17fach, Rectum: 14fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 14fach, Rectum: 45fach), im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gesteigert.

Bei der Expression von PAR2 zeigte sich bei den nicht entzündlich veränderten Patientenproben mit M. Crohn keine signifikante Veränderung im terminalen Ileum, jedoch ein Anstieg der PAR2 Expression im Coecum (2fach), Sigma (2fach) und Rectum (3fach). Bei den entzündlich veränderten M. Crohn Patientenproben zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der PAR2 Expression zur Kontrollgruppe.

Bei den Proben der Colitis ulcerosa Patienten zeigte sich weder bei den nicht entzündlich (Sigma: 0,8fach, Rectum: 0,6fach) noch bei den entzündlich veränderten (Sigma: 1,4fach, Rectum: 1fach) eine statistisch signifikante Induktion oder Inhibition der PAR2 Expression.

Die Genexpression von PSTI zeigte bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn Patienten Proben (term. Ileum: 2fach, Coecum: 4fach, Sigma:2,6fach, Rectum: 2,6fach) sowie bei den entzündlich veränderten Proben (term. Ileum: 12fach, Coecum: 6fach, Sigma:3fach, Rectum: 2fach) eine deutliche, statistisch signifikante Steigerung ($p < 0,05$). Bei den Proben des Colitis ulcerosa Kollektives zeigte sich nur im Sigma bei den nicht entzündlich veränderten (4fach), wie auch bei den entzündlich veränderten (3fach) ein statistisch signifikanter Anstieg der PSTI Genexpression. Die Expression im Rectum zeigte weder bei den nicht entzündlich veränderten Proben noch bei den entzündlich veränderten Proben einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Genexpression von T8 wies bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in den nicht entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 6fach, Coecum: 12fach, Sigma:8fach, Rectum: 20fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 9fach, Rectum: 14fach) wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 10fach, Coecum: 103fach, Sigma:107fach, Rectum: 90fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 27fach, Rectum: 33fach) eine deutliche Steigerung im Vergleich zur Expression der gesunden Kontrollgruppe auf.

Ergebnisse - Zusammenfassung - Gewebeproben von M. Crohn und Colitis ulcerosa

Genexpression chronisch entzündliche Darmerkrankung	Darmabschnitt	TMPRSS2	TMPRSS4	MTSP-1	Hepsin
M. Crohn nicht entzündet	terminales Ileum	+	+	+	++
	Coecum	+	+	++	++
	Sigma	0	+	0	++
	Rectum	+	0	+	++
M. Crohn entzündet	terminales Ileum	++	+	++	+++
	Coecum	+	+	++	++
	Sigma	+	+	+	+++
	Rectum	++	0	+	++
Colitis ulcerosa nicht entzündet	Sigma	+	++	+	++
	Rectum	+	++	+	+
Colitis ulcerosa entzündet	Sigma	+	+	+	++
	Rectum	+	--	0	+
<p>>10 = +++ (hoch) >3 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --</p>					

Die Genexpression von TMPRSS2 war bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa) in den nicht entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 2fach, Coecum: 2fach, Sigma: 0,9fach, Rectum: 2fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 2fach, Rectum: 2,5fach), wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 4fach, Coecum: 3fach, Sigma: 3fach, Rectum: 3,5fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 3fach, Rectum: 1,3fach), im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gesteigert.

Bei der Expression von TMPRSS4 zeigte bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn sowie Colitis ulcerosa Patientenproben (M. Crohn: term. Ileum: 2fach, Coecum 2,8fach, Sigma: 1,5fach) (Colitis ulcerosa: Sigma: 3fach, Rectum 3fach) eine Steigerung der Genexpression. Die TMPRSS4 Genexpression war im Rectum der nicht entzündlich veränderten M. Crohn Gewebeproben nicht verändert.

Bei den entzündlich veränderten Proben der Patienten mit M. Crohn zeigte sich eine Steigerung der Genexpression (term. Ileum: 2,7fach, Coecum: 2,6fach, Sigma: 1,7fach,

Rectum: 1,6fach). Bei den Colitis ulcerosa Proben war die Genexpression von TMPRSS4 im Sigma: 2fach gesteigert im Rectum auf das 0,5fache reduziert.

Die Genexpression von MTSP-1 zeigte bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn Patienten Proben (term. Ileum: 2,3fach, Coecum: 4,3fach, Sigma:1,4fach, Rectum: 1,7fach) sowie bei den entzündlich veränderten Proben (term. Ileum: 3fach, Coecum: 3fach, Sigma: 2fach, Rectum: 2,6fach) eine deutliche, statistisch signifikante Steigerung ($p < 0,05$). Bei den Proben des Colitis ulcerosa Kollektives zeigte sich im Sigma bei den nicht entzündlich veränderten (2,4fach), wie auch bei den entzündlich veränderten (2fach) ein statistisch signifikanter Anstieg der MTSP-1 Genexpression. Die Expression zeigte im Rectum bei den nicht entzündlich veränderten Proben eine Steigerung (Rectum: 2,6fach) und bei den entzündlich veränderten Proben keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Genexpression von Hepsin wies bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in den nicht entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 9,4fach, Coecum: 3fach, Sigma:9,2fach, Rectum: 4fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 9,6fach, Rectum: 2fach) wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 32fach, Coecum: 8fach, Sigma: 10fach, Rectum: 6fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 7fach, Rectum: 2fach) eine deutliche Steigerung ($p < 0,05$) im Vergleich zur Expression der gesunden Kontrollgruppe auf.

4. Diskussion

Wie in der Einführung bereits erwähnt, gibt es für die Genese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bisher keinen eindeutigen Nachweis. Jedoch können drei ganz klare pathogenetische Konzepte, eine genetische Prädisposition, Störungen der mucosalen Barrierefunktion sowie der intestinalen Flora bzw. Infektionen als Ursache der chronischen Darmerkrankung herausgestellt werden. Studien der letzten Jahre zeigen, dass den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen anders als früher angenommen, eine Störung der angeborenen unspezifischen Immunität zugrunde liegt. Die Charakterisierung der Funktion von NOD2/Card15, des im Jahr 2001 als erstes beschriebenes mit M. Crohn assoziierten Gens, unterstreicht diese Sichtweise. Das Genprodukt von NOD2 fungiert als intrazellulärer Sensor für ein bakterielles Peptidoglycan und wird durch das sowohl in gram positiven als auch gram negativen Bakterien vorhandene Muramyl-dipeptid (MDP) aktiviert (16). Die Stuttgarter Arbeitsgruppe um Stange und Wehkamp sieht die gestörte Bildung von Defensinen, körpereigenen, antimikrobiell wirkenden Peptiden als wesentlichen auslösenden Faktor in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, vor allem aber des M. Crohn an (36). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von β -Defensinen bei Biopsieproben von Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollproben verändert waren. Das β -Defensin hBD-1 war bei beiden Patientengruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe marginal supprimiert, wohingegen die Expression von hBD-2 bei Patienten mit Colitis ulcerosa deutlich gesteigert war. In den Patientenproben des M. Crohn Kollektives konnte dagegen keine Veränderung der Expression des β -Defensines hBD-2 gemessen werden (134). Wehkamp et al. konnten außerdem zeigen, dass bei Patienten mit M. Crohn, vor allem beim Befall des terminalen Ileums, die Spiegel der α -Defensine HD-5 und HD-6 supprimiert sind (135). Wie zuvor erwähnt, wird über die Aktivierung von PAR2 durch *Porphyromonas gingivalis* eine Steigerung der Expression des Defensines hBD-2 in humanen Epithelzellen der Gingiva hervorgerufen (20). Diese Steigerung der Genexpression von Defensinen durch die Aktivierung von PAR2 belegte erneut, dass PAR2 auch in antimikrobielle Prozesse eingebunden ist und neben der bisher gezeigten proinflammatorischen Rolle damit auch eine mögliche antiinflammatorische Wirkung besitzt.

Anderen Daten zeigten wiederum, dass auch Mastzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa einnehmen (94). Es fiel auf, dass in Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa die Anzahl an Mastzellen und deren Mediatoren, wie

Histamin, Serin-Proteasen, Leukotrienen und Prostaglandinen deutlich gesteigert waren. Des Weiteren konnte bei Mäusen mit einem Defizit an Mastzellen keine chemische Colitis induziert werden (3).

Zusammenfassend legen alle Studien nahe, dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zum einen eine Störung der mucosalen Immunabwehr, mit einer überschießenden T-Zell Reaktion und Sekretion proinflammatorischer Cytokine und zum anderen eine veränderte Mikroflora verbunden mit einer Störung der Darmpermeabilität vorliegt (62, 110). Ein Teil der Entzündungskaskade läuft dabei PAR2 vermittelt ab.

Höchstwahrscheinlich sind dies jedoch nicht die einzigen und allein auslösenden Veränderungen, die zu einem chronisch entzündlichen Prozess führen.

In unserer Studie haben wir die Expression von PAR2 und IL-8 sowie die PAR2 regulierenden Gene PSTI, T8, TMPRSS2, TMPRSS4, MTSP-1 und Hepsin in humanen Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Um ein genaueres Verständnis von PAR2 und der Rolle der PAR2 Genexpression sowie PAR2 regulierender Gene zu erhalten, haben wir nachfolgend nochmals innerhalb der M. Crohn und Colitis ulcerosa Patientenkollektive Gewebeproben im akuten Entzündungsschub mit Gewebeproben von Patienten, welche klinisch und histologisch entzündungsfrei waren, miteinander verglichen.

Festzustellen ist, dass die Genexpression von IL-8 in allen Patientenkollektiven in unseren Messungen wirksam gesteigert war, unabhängig davon, ob es sich um Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa handelte, wobei bei Gewebeproben im akuten Entzündungsschub deutlich höhere Anstiege der IL-8 Genexpression gemessen werden konnten, als bei Gewebeproben, die nicht entzündlich verändert waren.

Bei der Expressionsrate von PAR2 fällt auf, dass nur in den nicht entzündlich veränderten Proben von Patienten mit M. Crohn eine stärkere Erhöhung der Genexpression von PAR2 nachweisbar war. Für alle anderen Proben ließ sich kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten von PAR2 finden.

Mit den Erkenntnissen der zuvor erwähnten Studien und den bereits genannten eigenen Ergebnissen konnten wir belegen, dass es auch in vivo beim Menschen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa, zu einem Anstieg der Expression von IL-8 kommt.

Hervorzuheben ist, dass wir nachweisen konnten, dass in Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa, welche klinisch und histologisch als nicht entzündlich veränderte Proben eingeordnet worden sind, trotzdem eine deutlich erhöhte Genexpression von IL-8 vorlag. Dies legt den Verdacht nahe, dass trotz des Fehlens von klinischen und histologischen Entzündungszeichen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden ein veränderter Ablauf der Immunreaktion von intestinalen Epithelzellen bzw. eine dauerhaft erhöhte Abwehrbereitschaft mit möglicherweise dauerhaft gesteigerter Produktion und Sekretion von IL-8 vorliegt. Auch lässt dies vermuten, dass neben dem von uns bestimmten IL-8 die Expressions- und Sekretionsraten weiterer proinflammatorisch wirkender Cytokine und Chemokine in Ruhe bzw. außerhalb eines Entzündungsschubes deutlich erhöht sind.

Eventuell ist gerade das erhöhte Auftreten von proinflammatorischen Cytokinen als Zeichen einer veränderten Immunität zu werten.

Die Veränderung des Expressionsverhaltens mit einer erhöhten Ruheexpression von proinflammatorischen Cytokinen kann wahrscheinlich als Ausdruck einer fehlenden Normalisierung gewertet werden.

Möglicherweise sind in den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben neben IL-8 und anderen proinflammatorisch wirkenden Cytokinen auch Cytokine mit antiinflammatorischer Wirkung exprimiert, wobei bei diesen Patienten das Verhältnis zugunsten der antiinflammatorisch wirkenden Cytokine verschoben sein könnte.

Um diese Hypothesen zu bestätigen, müssen aber weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um zu klären, ob und ggf. wann eine immunologische Restitutio ad integrum auftritt. Dies könnte an das Vorhandensein weiterer pro- bzw. antiinflammatorisch wirkender Cytokine, Chemokine oder anderer Moleküle geknüpft sein.

Die gesteigerte Expression von PAR2, die wir nur in den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben der Patienten mit M. Crohn nachweisen konnten, könnte ein weiterer Hinweis für eine antiinflammatorische Komponente der Wirkung von PAR2 sein.

Dass PAR2 eine wichtige Rolle in antiinflammatorischen Prozessen einnehmen kann, wurde in zwei in vivo Tiermodellen belegt. Im ersten Tiermodell, in dem bei Mäusen mittels TNBS (2, 4, 6 – trinitrobenzene sulfonic acid) eine experimentelle Colitis induziert wurde, führte die Aktivierung von PAR2 durch das PAR2-aktivierende Peptid SLIGRL zu einer dosisabhängigen Reduktion der makroskopischen und mikroskopischen Entzündungszeichen der Colitis (40).

Im zweiten Tiermodell wurde bei Ratten die Schleimsekretion des Magens nach Gabe von Indomethacin (9mg/kg KG) in Verbindung mit der Aktivierung von PAR2 durch das intravenös verabreichte PAR2-aktivierende Peptid SLIGRL untersucht (54). Außerdem wurde der Einfluss der PAR2 Aktivierung auf die Folgen von Magenschleimhautschädigungen durch ein Ethanol/HCl Gemisch (60% Ethanol/150mM HCl) und Indomethacin (25mg/kg KG) näher beleuchtet. Zusätzlich analysierte die Arbeitsgruppe in einer zweiten Versuchsreihe die Rolle von afferenten Neuronen auf die Schleimsekretion nach Capsaicinblockade (insgesamt 125mg/kg KG) (54).

Es zeigte sich, dass durch die Gabe von Indomethacin und gleichzeitiger Aktivierung von PAR2 die Schleimsekretion im Magen der Ratte nicht unterbunden werden konnte.

Im zweiten Experiment wurde durch die Aktivierung von PAR2 durch das PAR2-aktivierende Peptid SLIGRL eine dosisabhängige (0,02, 0,2 und 0,5µmol/kg KG SLIGRL) Reduktion der Magenschleimhautschädigungen, unabhängig von der eingesetzten Noxe, hervorgerufen. Die protektiven Effekte der PAR2 Aktivierung waren nach Blockade afferenter Neurone mittels Capsaicin nicht mehr nachweisbar.

Bis auf die erhöhte PAR2 Expression in den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben von M. Crohn Patienten waren in unseren Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von PAR2 im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erkennbar.

Da es keine Daten für die PAR2 Expression in vivo bei humanen chronischen Darmerkrankungen gibt, stehen uns keine Studienergebnisse als Vergleich oder Bezug zur Verfügung.

Sicher ist, dass es vor der Entnahme der Gewebeproben eine interzelluläre Beziehung zwischen den von uns untersuchten intestinalen Epithelzellen und Zellen des Immunsystems sowie zwischen den intestinalen Epithelzellen und Bestandteilen der intraluminalen Flüssigkeit wie Nahrungsbestandteilen und der Flora des Darmes gegeben hat.

Deshalb ist die scheinbar unveränderte Genexpression von PAR2 eine mögliche Folge der Interaktion der intestinalen Epithelzellen mit allen Zellen, die in einer biopsierten Darmschleimhaut gefunden werden können.

Möglicherweise ist aber auch das Fehlen einer Veränderung der PAR2 Expression nur ein Zeichen dafür, dass die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa, nicht durch die Mehr- oder Mindereexpression eines einzelnen Rezeptors zu erklären ist. Das Vorhandensein von verstärkt exprimierten proinflammatorisch wirksamen Cytokinen, wie IL-8, zeigt vielmehr, dass die Auslösung

und das Unterhalten sowie die Modulation einer Entzündung, wie z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen, einen äußerst komplexen Prozess darstellt, der höchstwahrscheinlich multifaktorieller Genese ist.

Eine genetische Prädisposition sowie eine gestörte Immunität können Ursachen für die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung sein.

Wir konnten ebenfalls eine Überexpression für TMPRSS2 bei den M. Crohn Proben in den entzündlich veränderten (terminales Ileum: 4fach, Coecum: 3fach, Sigma: 3fach, Rectum: 4fach) sowie geringer oder unverändert bei den nicht entzündlichen Proben (terminales Ileum: 2fach, Coecum: 2fach, Sigma: 1fach, Rectum: 2fach) nachweisen. Auch bei den Colitis ulcerosa Proben war die Genexpression von TMPRSS2 bei den nicht entzündlich veränderten Proben (Sigma: 2fach, Rectum: 2,5fach), wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (Sigma: 3fach, Rectum: 1,3fach) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gesteigert. Dabei ist zu bemerken, dass TMPRSS2 vor allem in den M. Crohn Proben in beiden Patientenkollektiven (entzündlich/ nicht entzündlich verändert) erhöht ist, wobei die stärkere Expression bei den Proben im akuten Schub vor allem im terminalen Ileum zu finden war. Bei den Colitis ulcerosa Proben war TMPRSS2 vor allem bei den nicht entzündlich veränderten Proben sowie bei den entzündlich veränderten Proben im Sigma erhöht. TMPRSS2 wird unter anderem im Gastrointestinaltrakt (Dickdarm, Dünndarm, Pancreas, Speicheldrüsen) sowie in vielen anderen Geweben (Niere, Lunge, Mamma, Prostata) exprimiert (90, 126) und ist nachgewiesenermaßen in pulmonale Infektionen involviert. Die Aktivierung von Viren und deren verstärkte Gewebsausbreitung ist über TMPRSS2 möglich. Dabei läuft z.B. die proteolytische Aktivierung des humanen Metapneumovirus, einem Atemwegsvirus sowie des 1918 Influenza Virus Hämagglutinins TMPRSS2 vermittelt ab (14, 17). Ebenfalls konnte für TMPRSS2 eine Beziehung zu entzündlichen Veränderungen der Prostata hergestellt werden. Diese Entzündungen laufen nachgewiesenermaßen PAR2 vermittelt ab (8, 137). Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa spielt dies wahrscheinlich eine Rolle. Dabei kann, wie auch über MTSP-1 vermittelt, die TMPRSS2 vermittelte PAR2 Aktivierung den Entzündungsprozess proinflammatorisch beeinflussen. Über TMPRSS2 wird eine virale Atemwegserkrankung durch die Aktivierung und proteolytische Störung der Zell-Zell-Adhäsion gefördert. Diese Barrierestörung könnte möglicherweise auch TMPRSS2 vermittelt durch andere Mikroorganismen im Darm hervorgerufen werden. Auch ist so ein Klärungsansatz für eine infektiöse Genese der chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen und den Nachweis von Mycobacterien (10, 23, 38) in den mesenterialen Lymphknoten von M. Crohn Patienten gegeben.

Da vor allem Patienten mit Colitis ulcerosa eine erhöhte Neigung zur Entwicklung von kolorektalen Karzinomen zeigen, spielt die deutlich gesteigerte Genexpression von TMPRSS2 in Karzinomen eine wichtige Rolle (1, 17, 66). Ein Einsatz von TMPRSS2 als Tumormarker bei der Diagnostik, dem Staging sowie als Therapieansatz ist dabei bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen denkbar.

TMPRSS4 war bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn sowie Colitis ulcerosa Patientenproben (M. Crohn: terminales Ileum: 2fach, Coecum 2,8fach, Sigma: 1,5fach) (Colitis ulcerosa: Sigma: 3fach, Rectum 3fach) deutlich gesteigert exprimiert. Bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn Gewebeproben konnten wir im Rectum keine Veränderung des Expressionsmusters aufzeigen. Die entzündlich veränderten Proben der Patienten mit M. Crohn zeigten in allen gemessenen Darmabschnitten eine gesteigerte Genexpression (terminales Ileum: 2,7fach, Coecum: 2,6fach, Sigma: 1,7fach, Rectum: 1,6fach). Bei den Colitis ulcerosa Proben war die Genexpression von TMPRSS4 im Sigma 2fach gesteigert im Rectum jedoch auf das 0,5fache reduziert.

Eine Arbeitsgruppe um Chaipan konnte, genau wie für TMPRSS2, auch für TMPRSS4 eine Aktivierung des 1918 Influenza Virus und damit eine TMPRSS4 vermittelte Induktion sowie Ausbreitung der viralen Infektion im Lungengewebe nachweisen (14).

Dies könnte möglicherweise auch für TMPRSS4 eine Mitwirkung bei der Entstehung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen über eine Störung der Darmwandbarriere bedeuten. Auffällig ist außerdem, dass die Protease in colorektalen Karzinomen sowie anderen Tumoren überexprimiert ist (133) bzw. bei Prostatakarzinomen ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Expressionsmuster von TMPRSS4 und dem Tumorwachstum, der Invasivität und der Metastasierung aufgezeigt werden konnte (18). Dies legt nahe, dass TMPRSS4, wie auch MTSP-1 und TMPRSS2 bei der Tumorentstehung der colorektalen Karzinome bei Colitis ulcerosa Patienten wichtig sein könnte.

Die Expression von MTSP-1 war bei den M. Crohn Gewebeproben vor allem im terminalen Ileum sowohl bei den akut entzündlich veränderten, als auch bei den nicht entzündeten Proben deutlich erhöht. Jedoch waren in der Höhe des Anstieges Unterschiede zu erkennen. Die Proben von M. Crohn Patienten im akuten Schub wiesen eine deutlich höhere Expression von MTSP-1 im Coecum (3fach) und im terminalen Ileum (3fach) auf, dem bei M. Crohn am häufigsten erkrankten Darmabschnitt. Bei den

nicht akut entzündeten M. Crohn Proben war die Expression im Coecum sogar noch stärker induziert (4fach).

Bei den Proben des Colitis ulcerosa Kollektives konnten wir im Sigma bei den nicht entzündlich veränderten (2,4fach), wie auch bei den entzündlich veränderten (2fach) einen statistisch signifikanten Anstieg der MTSP-1 Genexpression aufzeigen. Im Rectum war die Expression bei den nicht entzündlich veränderten Proben 2,6fach, bei den entzündlich veränderten Proben nicht statistisch signifikant gesteigert.

Es war auffällig, dass die gesteigerte Expressionsrate von MTSP-1 in fast allen gemessenen Darmabschnitten gefunden werden konnte. MTSP-1 wird vielfältig in den unterschiedlichsten Geweben und Zellen (Haut, Gastrointestinaltrakt, Bronchialsystem, Urogenitaltrakt, zentrales Nervensystem, Immunsystem, Thymus, Endothel, Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten) exprimiert (114). Dabei nimmt es essentielle Funktionen in Wachstum sowie Immunabwehr wahr, was z.B. durch den frühen Tod von Versuchstieren im Tiermodell bewiesen wurde. Ein Fehlen von MTSP-1 führte dort zu einer gestörten Schleimhautbarriere sowie zu einer erhöhten Apoptoserate von unreifen Leukozyten (68). Demgegenüber könnte eine Überexpression zu einer verminderten Apoptoserate, damit einem erhöhten Vorhandensein von unreifen Leukozyten und darüber zu einer verstärkten unspezifischen Entzündungsreaktion führen. Außerdem könnte die Überexpression ebenso wie der Mangel von MTSP-1 in einer Störung der Darmwandpermeabilität münden und damit eine mögliche Pforte für Mikroorganismen darstellen. Dies wurde bereits durch eine weitere Studie positiv belegt, bei der Expressionsveränderungen von MTSP-1 zu einer Störung der Zell-Zell Adhäsion bzw. zur Aktivierung von PAR2 und darüber zu Gewebsinvasion und Infektion führen (18). Seitz et al. zeigten bei Untersuchungen an arteriosklerotischen Läsionen im Endothel, dass es nach Aktivierung von MTSP-1 PAR2 vermittelt zu einem Anstieg von Entzündungsmediatoren kam (88). Eine weitere Studie zeigte, dass es nach der experimentellen Verletzung von bronchialen Epithelzellen zu einer MTSP-1 Überexpression und MTSP-1 vermittelt zu einer Entzündung kam. Dabei wurden MTSP-1 proinflammatorische Funktionen zugesprochen (120). Die proinflammatorische Wirkung wird weiter durch den Nachweis einer erhöhten MTSP-1 Expression in frühen Leishmanien Infektionen erhärtet, bei der MTSP-1 eine Assoziation in der Pathogenese dieser Infektion zugeschrieben wurde (76). Unsere Studien belegen für MTSP-1 bei den von uns untersuchten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle bei der Auslösung sowie der Unterhaltung der

Entzündungsreaktion. Dies kann einerseits in der Aktivierung von PAR2 andererseits in der MTSP-1 vermittelten Störung der Zell-Zell Adhäsion und damit einer veränderten Darmwandpermeabilität begründet sein.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die verstärkte Expression von MTSP-1 in vielen Tumoren. Dies sind zum Beispiel Mamma-, Nieren-, Colon-, Leber-, Lungen-, Ovarial- und Prostatakarzinome sowie Mesotheliome. Dabei scheinen die erhöhten Expressionsraten von MTSP-1 und seiner Inhibitoren eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung zahlreicher Karzinome zu spielen (8, 17, 117, 118, 124). Eine These geht dabei von einer MTSP-1 vermittelten Karzinomenstehung aus. Dies läuft unter anderem über eine Aktivierung der Vorstufen Urokinase-Plasminogen Aktivator sowie den Hepatocyte-growth Faktor (pro-HGF) ab (17). Frühere Studien belegten für Urokinase-Plasminogen Aktivator sowie den Hepatocyte-growth Faktor (pro-HGF) einen Zusammenhang mit invasivem Wachstum (124). In einem Mausmodell konnte das invasive Wachstum direkt am Beispiel von epidermalem Gewebe über die Steigerung der MTSP-1 Expression nachgewiesen werden (17). Dabei wird MTSP-1 in der Zukunft als möglicher Tumormarker eine Rolle spielen. Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn sowie Colitis ulcerosa ist die Tumorentstehung vor allem bei der Colitis ulcerosa wichtig. Möglicherweise ist MTSP-1 bei diesem Krankheitsbild ebenfalls an der Karzinomenstehung mitbeteiligt und könnte auch hier zukünftig als Tumormarker in der Diagnostik eingesetzt werden. Aber nicht nur bei der Krankheitserkennung, sondern auch in der Therapie könnte eine selektive Blockade von MTSP-1 von Bedeutung sein (8, 17, 117, 118, 124).

Wir konnten zeigen, dass im M. Crohn Patientenkollektiv im akuten Entzündungsschub Hepsin in allen gemessenen Darmabschnitten (terminales Ileum: 32fach, Coecum: 8fach, Sigma: 10fach, Rectum: 6fach) sowie geringer bei den nicht entzündeten Proben (terminales Ileum: 9fach, Coecum: 3fach, Sigma: 9fach, Rectum: 4fach) überexprimiert war. Auch bei den Proben des Colitis ulcerosa Patientenkollektives war die Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei den nicht entzündlich veränderten (Sigma: 9,6fach, Rectum: 2fach) wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (Sigma: 7fach, Rectum: 2fach) deutlich erhöht. Auch für Hepsin wurden Einflüsse auf Infektionen beschrieben. So konnte zwischen einem Bestandteil des humanen Hepatitis B Virus (HBx) und Hepsin in vivo wie auch in vitro Interaktionen aufgezeigt werden. Hepsin wurde dabei eine virusabhängige Modulation der Proliferation sowie der Inhibierung der Apoptose von Leberzellen zugeschrieben (148). Eine weitere Studie beschrieb für Hepsin proinflammatorische Funktionen nach der Verletzung von

bronchialen Epithelzellen (120). Hepsin kann eine Rolle bei der Entstehung sowie dem Unterhalt des Entzündungsprozesses bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zugeschrieben werden.

Hepsin wurde in humanen Tumoren (Prostatatumoren, Ovarialzellkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hepatomen) nachgewiesen (113). Frühere Studien proklamierten für Hepsin eine bedeutende Rolle in der Tumorentstehung (141). In neueren Studien wurde Hepsin zusätzlich eine tumorprogressive sowie metastasierende Wirkung zugeschrieben, wobei eine Inaktivierung von Hepsin durch Antikörper in einem Maus-Modell zur Inhibierung der Tumorinvasivität führte (141). Da Hepsin sowohl beim Wachstum als auch bei der Embryogenese eine Rolle zu spielen scheint (131), stellt die veränderte Expression von Hepsin möglicherweise eine Prädisposition für die Entstehung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung sowie für die Tumorentwicklung bei der Colitis ulcerosa dar.

Zusammenfassend können wir für die gemessenen membranständigen Serinproteasen erstmals ein statistisch signifikantes, deutlich erhöhtes Expressionsmuster bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa nachweisen. Einzig für TMPRSS2 im Sigma sowie TMPRSS4 im Rectum bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn Proben sowie für TMPRSS2, TMPRSS4 und MTSP-1 im Rectum bei den entzündlich veränderten Colitis ulcerosa Proben war das Ergebnis statistisch nicht signifikant.

Die statistisch signifikant erhöhte Expression der gemessenen membranständigen Serinproteasen bestätigt unsere These, dass die membranständigen Serinproteasen zum Teil PAR2 vermittelt in die Auslösung bzw. Unterhaltung und Modulation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingebunden sind. Dies kann einerseits über eine Störung der Zell-Zell-Adhäsion, andererseits über die proteolytische Aktivierung von bestimmten Mikroorganismen verursacht sein. Ein Teil der Entzündungskaskade läuft dabei PAR2 vermittelt ab. Für die Genese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bedeutet dies, wie frühere Studien schon proklamierten, eine TTSP abhängige Störung der Schleimhautbarriere sowie der mucosalen Immunabwehr (62, 68, 110).

Auch ist eine TTSP vermittelte Tumorgenese von colorectalen Karzinomen bei der Colitis ulcerosa denkbar. Da aber auch bei den Proben des M. Crohn Patientenkollektives die TTSP's erhöht exprimiert waren, müssen neben den TTSP's und PAR2 noch andere Veränderungen bei der Tumorentstehung bei der Colitis ulcerosa eine Rolle spielen. Diese gilt es in Zukunft zu ergründen.

Diskussion

Mit diesem Wissen könnte in der Folgezeit möglicherweise ein diagnostischer Ansatz über TTSP's als Tumormarker sowie ein therapeutischer Ansatz über die selektive Blockade der Proteasen gegeben sein. Es gibt derzeit jedoch keine Daten, die das Expressionsverhalten der membranständigen Proteasen bei Tumoren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen näher beleuchten. Deshalb sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig, um die Genese sowie Therapie dieser Erkrankungen und aller auftretenden Komplikationen besser verstehen zu können.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Afar D.E., Vivanco I., Hubert R.S., Kuo J., Chen E., Saffran D.C., Raitano A.B., Jakobovits A. (2000) – “Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia“ – *Cancer Res.* 61, 1686-1692
- (2) Al-Ani, B., Saifeddine, M., Hollenberg, M.D. (1999) – “Proteinase-activated receptor 2: role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation” – *Br. J. Pharmacol.* 128, 1105-1113
- (3) Araki, Y., Andoh, A., Fujiyama, Y., Bamba, T. (2000) – “Development of dextran sulphate sodium-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient *Ws/Ws* rats” – *Clin. Exp. Immunol.* 119, 264-269
- (4) Böhm, S.K., Grady, E.F., Bunnett, N.W. (1997) – “Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors” – *J. Biol. Chem.* 322, 1-18
- (5) Böhm, S.K., Khitin, L.M., Grady, E.F., Aponte, G., Payan, D.G., Bunnett, N.W. (1996) – “Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor 2” – *J. Biol. Chem.* 271, 22003-22016
- (6) Böhm, S.K., Kong, W., Bromme, D., Smeekens, S.P., Anderson, D.C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N.A., Coughlin S.R., Payan, D.G., Bunnett N.W. (1996) – “Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor 2” – *Biochem. J.* 314, 1009-1016
- (7) Bonen D.K., Cho J.H. (2003) – “The genetics of inflammatory bowel disease” – *Gastroenterology* 124, 521-536
- (8) Bugge T.H., Antalis T.M., Wu Q. (2009) – “Type II Transmembrane Serine Proteases” – *J. Biol. Chem.* 284, 23177-23181
- (9) Burke D.A., Axon A.T.R. (1987) – “Ulcerative colitis and *Escherichia coli* with adhesive properties.” *J. Clin. Pathol.* 40, 782–786

- (10) Burnham W.R. (1978) – “Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease” – *Lancet* 2, 693–696
- (11) Calkins B.M., Mendeloff A.I. (1986) – “Epidemiology of inflammatory bowel disease” – *Epidemiol. Rev.* 8, 60–91
- (12) Camerer, E., Huang, W., Coughlin, S.R. (1997) – “Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5255-5260
- (13) Cenac, N., Coelho, A.M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W., Garcia-Villar, R., Bueno, L., Vergnolle, N. (2002) – “Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor 2” – *Am. J. Pathol.* 161, 1903-1915
- (14) Chaipan C., Kobasa D., Bertram S., Glowacka I., Theodoros S.I., Tsegaye S., Takeda M., Bugge T.H., Kim S., Park Y.W., Marzi A., Pohlmann S. (2009) – “Proteolytic Activation of the 1918 Influenza Virus Hemagglutinin” – *J. Virol.*, 83, 3200–3211
- (15) Chen W.T. (1996) – “Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix” – *Enzyme Protein* 49, 59–71
- (16) Cho J.H. (2008) “Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic Considerations” – *World J Gastroenterol.*, 14(3), 338-347
- (17) Choi S.Y., Bertram S., Glowacka I., Park Y-W., Pohlmann S. (2008) – “Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections” – *Trends in Molecular Medicine* 15, 303-312

- (18) Choi S.Y., Shin H.C., Kim S.Y., Park Y.W. (2008) – “Role of TMPRSS4 during cancer progression” – *Drug News Perspect.* 21, 417-423
- (19) Chow, J.M., Moffatt, J.D., Cocks, T.M. (2000) – “Effect of protease-activated receptor (PAR)-1, -2 and -4-activating peptides, thrombin and trypsin in rat isolated airways” – *Br. J. Pharmacol.* 131, 1584-1591
- (20) Chung, W.O., Hansen, S.R., Rao, D., Dale, B.A. (2004) – “Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression” – *J. Immunol.* 173, 5165-5170
- (21) Cicala, C., Morello, S., Santagada, V., Caliendo, G., Sorrentino, L., Cirino, G. (2001) – “Pharmacological dissection of vascular effects caused by activation of protease-activated receptors 1 and 2 in anesthetized rats” – *FASEB J.* 15, 1433-1435
- (22) Cocks, T.M., Moffatt, J.D. (2001) – “Protease-activated receptor 2 (PAR2) in the airways” – *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 183-191
- (23) Cohary O., Harth G., Horowitz M., Eggena M., Landers C., Sutton C., Targan S.R., Braun J. (1999) – “Identification of a novel micobacterial histone H1 homologue (HupB) is an antigenic target of pANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn’s disease” – *Infect. Immun.* 67:6510–6517
- (24) Connolly, A.J., Ishihara, H., Kahn, M.L., Farese, R.V. Jr., Coughlin S.R. (1996) – “Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor” – *Nature* 381, 516-519
- (25) Corrao G., Tragnone A., Caprilli R., Trallori G., Papi C., Andrei A., Di-Paolo M., Riegler G., Rigo G.P., Feran O., Mansi C., Ingrosso M., Valpiani D.(1998) – “Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case control study. Cooperative investigators of the Italian group for the study of the colon and rectum (GISC)” – *Int. J. Epidemiol.* 27, 397–404

- (26) Corvera, C.U., Dery, O., McConalogue, K., Böhm, S.K., Khitin, L.M., Caughey, G.H., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W. (1997) – “Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2” – *J. Clin. Invest.* 100, 1383-1393
- (27) Corvera, C.U., Dery, O., McConalogue, K., Gamp, P., Thoma, M., Al-Ani, B., Caughey, G.H., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W. (1999) – “Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2” – *J. Physiol.* 517, 741-756
- (28) Coughlin S.R., Cramer, E. (2003) – “PARTicipation in inflammation” – *J. Clin. Invest.* 111, 25-27
- (29) Coughlin, S.R., (1994) – “Protease-activated receptors start a family” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9200-9202
- (30) D` Andrea, M.R., Derian, C.K., Leturcq, D., Baker, S.M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A.L., Santulli, R.J., Brass, L.F., Andrade-Gordon, P. (1998) – “Characterization of protease-activated receptor 2 immunoreactivity in normal human tissues” – *J. Histochem. Cytochem.* 46, 157-164
- (31) D`Andrea, M.R., Rogahn, C.J., Andrade-Gordon, P. (2000) – “Localization of protease-activated receptors – 1 and -2 in human mast cells; indications for an amplified mast cell degranulation cascade” – *Biotech. Histochem.* 75, 85-90
- (32) Dano K., Romer J., Nielsen B.S., Bjorn S., Pyke C., Rygaard, Lund L.R. (1999) – “Cancer invasion and tissue remodeling – cooperation of protease systems and cell types” – *APMIS* 107, 120–127
- (33) de Vries T.J., van Muijen G.N., Ruiter D.J. (1996) – “The plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis” – *Pathol. Res. Pract.* 192, 718–733

- (34) DeFea, K.A., Zalefsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D., Bunnett, N.W. (2000) – „Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2” – *J. Cell. Biol.* 148, 1267-1281
- (35) Dery, O., Thoma, M.S., Wong, H., Grady, E.F., Bunnett, N.W. (1999) – “Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor” – *J. Biol. Chem.* 274, 18524-18535
- (36) Eckmann, L., (2005) – “Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections” – *Curr. Opin. Gastroenterol* 21, 147-151
- (37) Eggermont E., Molla A.M., Tytgat G., Rutgeerts L. (1971) – “Distribution of enterokinase activity in the human intestine” *Acta Gastroenterol. Belg.* 34: 655-62
- (38) El Zataari F.A., Naser S.A., Hulten K., Burch C., Graham D.Y. (1999) – “Characterisation of Mycobacterium paratuberculosis p36 antigen and its seroreactivities in Crohn’s disease” – *Curr. Microbiol.* 39, 115–119
- (39) Ferrell, W.R., Lockhart, J.C., Kelso, E.B., Dunning, L., Plevin, R., Meek, S.E., Smith, A.J.H., Hunter, G.D., Mclean, J.S., McGarry, F., Ramage, R., Jiang, L., Kanke, T., Kawagoe, J. (2003) – “Essential role for proteinase - activated receptor 2 in arthritis” – *J. Clin. Invest.* 111, 35-41
- (40) Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Distrutti, E., Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Morelli, A., Cirino, G. (2001) – “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, 13936-13941

- (41) Gijsbers K., Van Assche G., Joossens S., Struyf S., Proost P., Rutgeerts P., Geboes K., Van Damme J (2004) – “CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue” – *Eur. J. Immunol.* 34, 1992-2000
- (42) Hamilton, J.R., Moffatt, J.D., Tatoulis, J., Cocks, T.M. (2002) – “Enzymatic activation of endothelial protease-activated receptors is dependent on artery diameter in human and porcine isolated coronary arteries” – *Br. J. Pharmacol.* 136, 492-501
- (43) Harper P.H., Lee E.C.G., Kettlewell M.G.W., Bennett M.K., Jewell D.P. (1985) – “Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis.” – *Gut* 26, 279–284
- (44) Hillert J., Kall T., Vrethem M., Fredrikson S., Ohlson M., Olerup O. (1994) – “The HLA-Dw2 haplotype segregates closely with multiple sclerosis in multiplex families.” – *J. Neuroimmunol.* 50, 95–100
- (45) Holzinger A., Maier E.M., Buck C., Mayerhofer P.U., Kappler M., Haworth J.C. (2002) – “Mutations in the proenteropeptidase gene are the molecular cause of congenital enteropeptidase deficiency” – *Am. J. Hum. Genet.* 70: 20-25
- (46) Hooper J.D., Clements J.A., Quigley J.P., Antalis T.M. (2001) – “Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes.” – *J. Biol. Chem.* 276, 857–860
- (47) Hooper J.D., Scarman A.L., Clarke B.E., Normyle J.F., Antalis T.M. (2000) – “Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes” – *Eur. J. Biochem.* 267: 6931-6937
- (48) Howells, G.L., Macey, M.G., Chinni, C. (1997) – “Proteinase-activated receptor – 2: expression by human neutrophils” – *J. Cell. Sci.* 110, 881-887

- (49) Ishihara, H., Connolly, A.J., Kahn, M.L., Zeng, Y.W., Timmons, C., Tram, T., Coughlin, S.R. (1997) – “Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans” – *Nature* 386, 502-506
- (50) Johnsen M., Lund L.R., Romer J., Almholt K., Dano K. (1998) – “Cancer invasion and tissue remodeling: Common themes in proteolytic matrix degradation” – *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 667–671
- (51) Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H., Coughlin, S.R. (1999) – “Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin” – *J. Clin. Invest.* 103, 879-887
- (52) Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V. Jr., Tam, C., Coughlin S.R. (1998) – “A dual thrombin receptor system for platelet activation” – *Nature* 394, 690-694
- (53) Karlinger K., Györke T., Makö E., Mester A., Tarján Z. (2000) – “The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease” – *Eur. J. Radiol.* 35,;154-167
- (54) Kawabata, A., Kinoshita, M., Nishikawa, H., Kuroda, R., Nishida, M., Araki, H., Arizono, N., Oda, Y., Kakehi, K. (2001) – “The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection” – *J. Clin. Invest.* 107, 1443-1450
- (55) Kazama Y., Hamamoto T., Foster D.C., Kisiel W. (1995) – “Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation” – *J. Biol. Chem.* 270, 66-72
- (56) Kim, J.A., Choi, S.C., Yun, K.J., Kim, D.K., Han, M.K., Seo, G.S., Yeom, J.J., Kim, T.H., Nah, Y.H., Lee, Y.M. (2003) – “Expression of protease – activated receptor 2 in ulcerative colitis” – *Inflamm. Bowel Diseases* 9, 224-229

- (57) King, C., Brennan, S., Thompson, P.J., Stewart, G.A. (1998) – “Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium” – *J. Immunol.* 161, 3645-3651
- (58) Kitamoto Y., Yuan X., Wu Q., McCourt D.W., Sadler J.E. (1994) – “Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 7588-7592
- (59) Kohn E.C., Liotta L.A. (1995) – “Molecular insights into cancer invasion: Strategies for prevention and intervention” – *Cancer Res.* 55: 1856–1862
- (60) Koletzko S., Sherman P., Corey M., Griffiths A., Smith C. (1989) – “Role of infant feeding practices in development of Crohn’s disease in childhood” – *Br. Med. J.* 298:1617–1628
- (61) Kong, W., McConalogue, K., Khitin, L.M. Hollenberg, M.D., Payan, D.G., Böhm, S.K., Bunnett, N.W. (1997) – “Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8884-8889
- (62) Kreisel, W. (2006) – “Pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases” – *Schweiz Rundsch Med Prax.* 95, 1965-1973
- (63) Lang J.C., Schuller D.E.(2001) – “Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck” – *Br. J. Cancer* 84, 237-243
- (64) Lerner, D.J., Chen, M., Tram, T., Coughlin, S.R. (1996) – “Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function” – *J. Biol. Chem.* 271, 13943-13947

- (65) Leytus S.P., Loeb K.R., Hagen F.S., Kurachi K., Davie E.W. (1988) – “A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells” – *Biochemistry* 27, 1067-1074
- (66) Lin B., Ferguson C., White J.T., Wang S., Vessella R., True L.D. (1999) – “Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2” – *Cancer Res.* 59, 4180-4184
- (67) Lindner, J.R., Kahn, M.L., Coughlin, S.R., Sambrano, G.R., Schauble, E., Bernstein, D., Foy, D., Hafezi-Moghadam, A., Ley, K. (2000) – “Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice” – *J. Immunol.* 165, 6504-6510
- (68) List K., Haudenschild C.C., Szabo R., Chen W., Wahl S.M., Swaim W. (2002) – “Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis” – *Oncogene* 21, 3765-3779
- (69) Lourbakos, A., Potemba, J., Travis, J. (2001) – “Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on humoral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion” – *Infect. Immun.* 69, 5121-5130
- (70) Miao J., Mu D., Ergel B., Singavarapu R., Duan Z., Powers S., Oliva E., Orsulic S. (2008) – “Hepsin colocalizes with desmosomes and induces progression of ovarian cancer in a mouse model” – *Int. J. Cancer* 123, 2041-2047
- (71) Miike, S., McWilliams, A.S., Kita, H. (2001) – “Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor – 2” – *J. Immunol.* 167, 6615-6622
- (72) Miriza, H., Yatsula, V., Bahou, W.F. J. (1996) – “The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells” – *J. Clin. Invest.* 97, 1705-1714

- (73) Mishkin S. (1997) – “Dairy sensitivity, lactose malabsorption and elimination diets in inflammatory bowel disease.” – *Am. J. Clin. Nutr.* 65:564–567
- (74) Mizoguchi A., Mizoguchi E., Chiba C., Bhan A.K. (1996) – “Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice” – *J. Exp. Med.* 184, 707–715
- (75) Molino, M., Barnathan E.S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J.A., Schechter, N., Woolkalis, M., Brass, L.F. (1997) – “Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2” – *J. Biol. Chem.* 272, 11168-11175
- (76) Moll H., Müller C., Gillitzer R., Fuchs H., Röllinghoff M., Simon M.M., Kramer M.D., (1991) – “Expression of T-Cell-Associated Serine Proteinase 1 during Murine *Leishmania major* Infection Correlates with Susceptibility to Disease“ – *Infection and Immunity* 12, 4701-4705
- (77) Montgomery S.M., Morris D.L., Pounder R.E., Wakefield A.J. (1999) – “Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease” – *Gastroenterology* 116, 796–803
- (78) Netzel-Arnett S., Hooper J.D., Szabo R., Madison E.L., Quigley J.P., Bugge T.H. (2003) – “Membrane anchored serine proteases: A rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer” – *Cancer Metastasis Rev.* 22, 237-258
- (79) Newman B., Siminovitch K.A. (2005) – “Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease” – *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21, 401-407
- (80) Niclou, S., Suidan, H.S., Brown-Luedi, M., Monard, D. (1994) – “Expression of the thrombin receptor mRNA in rat brain” – *Cell. Mol. Biol.* 40, 421-428

- (81) Niv Y., Abiksis G., Fraser G.M. (1999) – “Epidemiology of Crohn’s disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements” – *Am. J. Gastroenterol.* 1994, 2961–2965
- (82) Nystedt, S., Emilsson, K., Larson, A.K., Strombeck, B., Sundelin, J. (1995) – “Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2” – *Eur. J. Biochem.* 232, 84-89
- (83) Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., Sundelin, J. (1994) – “Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9208-9212
- (84) Nystedt, S., Larsson, A.K., Aberg H., Sundelin, J. (1995) – “The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression” – *J. Biol. Chem.* 270, 5950 –5955
- (85) O’Brien, P.J., Prevost, N., Molino, M., Hollinger, M.K., Woolkalis, M.J., Woulfe, D.S., Brass, L.F. (2000) – “Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1” – *J. Biol. Chem.* 275, 13502-13509
- (86) Orchard T., Jewell P.D. (1997) – “Review article: pathophysiology of the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease and arthritis: similarities and dissimilarities in clinical findings” – *Aliment Pharmacol. Ther.* 11, 10–16
- (87) Ossovskaya, V. Bunnett, N.W. (2004) – “Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease” – *Physiol. Rev.* 84, 579-621
- (88) Owen C.A. (2008) – “Leukocyte cell surface proteinases: Regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization” – *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40, 1246-1272

- (89) Paetzel, M., Dalbey, R.E., Straynadka, N.C.J. (2000) – “The structure and mechanism of bacterial type-1 signal peptidases – a novel antibiotic target” – *J. Pharmacol. Therap.* 87, 27-49
- (90) Paoloni-Giacobino A., Chen H., Peitsch M.C., Rossier C., Antonarakis S.E. (1997) – “Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA, and SRCR domains and maps to 21q22.3” – *Genomics* 44, 309-320
- (91) Pardy D.S., Tremaine W.J., Sandborn W.J., Loftus E.V. Jr., Poland G.A., Meton L.J. (1999) – “Perinatal exposure to measles virus is not associated with the development of inflammatory bowel disease” – *Inflamm. Bowel Dis.* 5:104–106
- (92) Podolsky D.K. (2002) – “Inflammatory Bowel Disease” – *N. Engl. J. Med.* 8, 347-358
- (93) Rabbani S.A., Mazar A.P. – “The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis” – *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 393–415
- (94) Raithel, M., Winterkamp, S., Pacurar, A. (2001) – “Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease” – *Scand. J. Gastroenterol* 36, 174-179
- (95) Rasmussen, U.B., Vouret-Craviari, V., Jallat, S., Schlesinger, Y., Pages, G., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Pouyssegur, J., Van Obberghen-Schilling, E. (1991) – “cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization” – *FEBS Lett.* 288, 123-128
- (96) Robin, J., Kharbanda, R., McLean, P., Campbell, R., Vallance, P. (2003) – “Protease-activated receptor 2-mediated vasodilatation in humans in vivo: role of nitric oxide and prostanoids” – *Circulation* 107, 954-959

- (97) Roostermann, D., Schmidlin, F., Bunnett, N.W. (2003) – “The third intracellular loop and carboxyl tail of neurokinin 1 and 3 receptors determine interactions with beta-arrestins” – *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, 1319-1329
- (98) Russel M.G., Stockbrugger R.W. (1996) – ”Epidemiology of inflammatory bowel disease, an update” – *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 417–427
- (99) Rutgeerts L., Eggermont E. (1976) – “Human enterokinase” – *Tijdschr. Gastroenterol* 19, 231-246
- (100) Saxon A., Shanahan F., Lander C., Gonz T., Targan S.R. (1999) – “A distinct subset of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease” – *J. Allergy. Clin. Immunol.* 86, 202–210
- (101) Schmidlin, F., Amadesi, S., Dabbagh, K., Lewis, D.E., Knott, P., Bunnett, N.W., Gater, P.R., Geppetti, P., Bertrand, C., Stevens, M.E. (2002) – “Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway” – *J. Immun.* 169, 5315-5321
- (102) Scott H.S., Kudoh J., Wattenhofer M., Shibuya K., Berry A., Chrast R. (2001) – “Insertion of betasatellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness” – *Nat. Genet.* 27, 59-63
- (103) Shivananda S., Lennard-Jones J., Logan R. (1996) – “EC-IBD Study Group. Incidence of inflammatory disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease” – *Gut* 39, 690–697
- (104) Shpacivitch, V. M., Brzoska, T., Buddenkotte, J., Stroh, C., Sommerhoff, C.P., Ansel, J.C., Schulze-Osthoff, K., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Steinhoff, M. (2002) – „Agonist of Proteinase-Activated Receptor 2 induce Cytokine Release and Activation of nuclear Transcription Factor κ B in human dermal microvascular endothelial Cells“ – *J. Invest. Dermatol.* 118, 380-385

- (105) Smith, R., Ransjö, M., Tatarczuch, L., Song, S.J., Pagel, C.N., Morrison, J.R., Pike, R.N., Mackie, E.J. (2004) – “Activation of protease-activated receptor-2 leads to inhibition of osteoclast differentiation” – *J. Bone Miner. Res.* 19, 507-516
- (106) Sonnenberg A., McCarty D.J., Jacobsen S.J. (1991) – “Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States” *Gastroenterology* 91, 143–149
- (107) Stallmach A., Giese T., Schmidt C., Ludwig B., Mueller-Molaian I., Meuer S.C. (2004) – “Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease” – *Int. J. Colorectal Dis.* 19, 308-315
- (108) Steinhoff, M., Corvera, C.U., Thoma, M.S., Kong, W., McAlpine, B.E., Caughey, G.H., Ansel, J.C., Bunnett, N.W. (1999) – “Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase” – *Exp. Dermatol.* 8, 282-294
- (109) Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognette, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E. Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., Bunnett N.W. (2000) – “Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism” – *Nat. Med.* 6, 151-158
- (110) Strober, W., Fuss, I., Mannon, P. (2007) – “The fundamental basis of inflammatory bowel disease” – *J. Clin. Invest.* 117, 514-521
- (111) Sun, G., Stacey, M.A., Schmidt, M., Mori, L., Mattoli, S. (2001) – “Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells” – *J. Immunol.* 167, 1014-1021
- (112) Swain, M.G.; Ajuebor, M.N., (2002) – “Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract” – *Immunology* 105, 137-143

- (113) Szabo R, Bugge T.H. (2008) – “Type II transmembrane serine proteases in development and disease.” – *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1297–1316
- (114) Szabo R., Wu Q., Dickson R.B., Netzel-Arnett S., Antalis T.M., Bugge T.H. (2003) – “Type II transmembrane serine proteases“ – *Thromb. Haemost.* 90, 185–93
- (115) Szilágyi A. (1998) – “Altered colonic environment, a possible predisposition to colorectal cancer and colonic inflammatory bowel disease: rationale of dietary manipulation with emphasis on disaccharides.” – *Can. J. Gastroenterol.* 12, 133–146
- (116) Takahashi M., Sano T., Yamaoka K., Kamimura T., Umemoto N., Nishitani H. (2001) – “Localization of human airway trypsin-like protease in the airway: an immunohistochemical study” – *Histochem. Cell. Biol.* 115, 181-187
- (117) Takeuchi T., Harris J.L., Huang W., Yan K.W., Coughlin S.R., Craik C.S. (2000) – “Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates” – *J. Biol. Chem.* 275, 26333-26342
- (118) Takeuchi T., Shuman M.A., Craik C.S. (1999) – “Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 11054-11061
- (119) Takeuchi, T., Harris, J.L., Huang, W., Yan, W.K., Coughlin, S.R., Craik, C.S. (2000) – “Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates” – *J. Biol. Chem.* 275, 26333-26342
- (120) Tanaka H., Fukushima T., Yorita K., Kawagushi M., Kataoka H. (2009) – “Tissue injury alters the site of expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in bronchial epithelial cells“ – *Human Cell* 22, 11-17

- (121) Targan S.R. (1998) – “The search for pathogenic antigens in ulcerative colitis” – *Gastroenterology* 114, 1099–1100
- (122) Torres-Rosado A., O’Shea K.S., Tsuji A., Chou S.H., Kurachi K. (1993) – “Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 7181-7185
- (123) Uehara, A., Muramoto, K., Takada, H., Sugawara, S. (2003) – “Neutrophil serine proteases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2” – *J. Immun.* 170, 5690-5696
- (124) Uhlend, K. (2006) – “Matriptase and its putative role in cancer” – *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2968–2978
- (125) Underwood L.J., Shigemasa K., Tanimoto H., Beard J.B., Schneider E.N., Wang Y. (2000) – “Ovarian tumor cells express a novel multidomain cell surface serine protease” – *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 337-350
- (126) Vaarala M.H., Porvari K.S., Kellokumpu S., Kyllonen A.P., Vihko P.T. (2001) – “Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues” – *J. Pathol.* 193, 134-140
- (127) Velasco G., Cal S., Quesada V., Sanchez L.M., Lopez-Otin C. (2002) – “Matriptase-2, a membranebound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins” – *J. Biol. Chem.* 277, 37637-37646
- (128) Vergnolle, N. (1999) – “Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo” – *J. Immunol.* 163, 5064-5069
- (129) Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Sharkey, K.A., Wallace, J.L. (1999) – “Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw” – *Br. J. Pharmacol.* 127, 1083-1090

- (130) Vergnolle, N., Wallace, J.L., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D. (2001) – „Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain” – Trends pharmacol. Sci. 22, 146-152
- (131) Vu T.K., Liu R.W., Haaksma C.J., Tomasek J.J., Howard E.W. (1997) – “Identification and cloning of the membrane-associated serine protease, hepsin, from mouse preimplantation embryos” – J. Biol. Chem. 272, 31315-31320
- (132) Vu, T.K., Hung, T.D., Wheaton, V.I., Coughlin, S.R. (1991) – “Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation” – Cell 64, 1057-1068
- (133) Wallrapp C., Hahnel S., Muller-Pillasch F., Burghardt B., Iwamura T., Ruthenburger M. (2000) – “A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer” – Cancer Res.60, 2602-2606
- (134) Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Müller, O., Herrlinger, K. R., Fellermann, K., Schröder, J. M., Stange, E. F. (2003) – “Inducible and constitutive β -Defensins are differentially expressed in crohn’s disease and ulcerative colitis” – Inflamm. Bowel Disease 9, 215-223
- (135) Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F. (2004) – “NOD2 (CARD15) mutations in Crohn’s disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression” – Gut 53, 1658-1664
- (136) Whorwell P.J., Holdstock G., Whorwell G.M., Wright R. (1979) – “Bottle feeding, early gastroenteritis and inflammation bowel disease” – Br. Med. J. 1:382
- (137) Wilson S., Greer B., Hooper J., Zijlstra A., Walker B., Quigley J., Hawthorne S. (2005) – “The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells” – Biochem. J. 15, 967-972

- (138) Wu F., Yan W., Pan J., Morser J., Wu Q. (2002) – “Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes” – *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905
- (139) Wu Q., Yu D., Post J., Halks-Miller M., Sadler J.E., Morser J. (1998) – “Generation and characterization of mice deficient in hepsin, a hepatic transmembrane serine protease” – *J. Clin. Invest.* 101, 321-326
- (140) Xu, W.F., Andersen, H., Whitmore, T.E., Presnell, S.R., Yee, D.P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E.W., Foster, D.C. (1998) – “Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6642-6646
- (141) Xuan J.A., Schneider D., Toy P., Lin R. Newton A., Zhu Y., Finster S., Vogel D., Mintzer B., Dinter H., Light D., Parry R., Polokoff M., Whitlow M., Wu Q., Parry G. (2006) – “Antibodies neutralizing hepsin protease activity do not impact cell growth but inhibit invasion of prostate and ovarian tumor cell culture” – *Cancer Res.* 66, 3611-3619
- (142) Yamaguchi N., Okui A., Yamada T., Nakazato H., Mitsui S. (2002) – “Spinesin/TMPRSS5, a novel transmembrane serine protease, cloned from human spinal cord.” – *J. Biol. Chem.* 277, 6806-6812
- (143) Yamaoka K., Masuda K., Ogawa H., Takagi K., Umemoto N., Yasuoka S. (1998) – “Cloning and characterization of the cDNA for human airway trypsin-like protease” – *J. Biol. Chem.* 273, 11895-11901
- (144) Yan W., Sheng N., Seto M., Morser J., Wu Q. (1999) – “Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart” – *J. Biol. Chem.* 274, 14926-14935
- (145) Yan W., Wu F., Morser J., Wu Q. (2000) – “Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 8525-8529

- (146) Yoshinaga S., Nakahori Y., Yasuoka S. (1998) – “Fibrinogenolytic activity of a novel trypsin-like enzyme found in human airway” – J. Med. Invest. 45, 77-86
- (147) Yu I.S., Chen H.J., Lee Y.S., Huang P.H., Lin S.R., Tsai T.W. (2000) – “Mice deficient in hepsin, a serine protease, exhibit normal embryogenesis and unchanged hepatocyte regeneration ability” – Thromb. Haemost. 84, 865-870
- (148) Zhang J.L., Zhao W.G., Wu K.L., Wang K., Zhang C.F., Gu C.F., Li Y., Zhu Y., Wu J.G. (2005) – “Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin” – Arch. Virol. 150, 721–741

6. Herstellerverzeichnis

- 1) Amersham Biosciences Munzinger Str. 9, 79111 Freiburg, Deutschland
- 2) Applied Biosystems Frankfurter Str.129 B, 64293 Darmstadt, Deutschland
- 3) B.Braun Carl-Braun-Straße 1, 34212 Melsungen, Deutschland
- 4) BioRad Heidemannstr. 164, 80939 München, Deutschland
- 5) Biophotonics Corp. Schlossgasse 4, CH-9320 Arbon, Schweiz
- 6) Dr. Junghans medical Käthe-Kollwitz Str. 34, 04651 Bad Lausick, Deutschland
- 7) Eppendorf Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
- 8) Fresenius Else-Kröner-Straße 1, 61352 Bad Homburg, Deutschland
- 9) Gibco Invitrogen Corp. Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland
- 10) Greiner Bio One Maybachstrasse 2, 72636 Frickenhausen, Deutschland
- 11) Heidolph Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, Deutschland
- 12) Hellma Klosterrunsstr. 5,79379 Müllheim, Deutschland
- 13) Heraeus instruments Münsterstr. 330, 40470 Düsseldorf, Deutschland
- 14) ICN Biomedicals Thüringer Str. 15, 37269 Eschwege, Deutschland
- 15) Integra Biosciences Ruhberg 4, 35463 Fernwald, Deutschland
- 16) Kobe Rosenstraße 16, 35037 Marburg, Deutschland
- 17) Landgraf Laborgeräte Magdeburger Str. 3, 30855 Langenhagen, Deutschland
- 18) Liebherr Memminger Str. 77, 88416 Ochsenhausen, Deutschland
- 19) MBI Fermentas Opelstr. 9, 68789 St. Leon-Rot, Deutschland
- 20) Merck Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Deutschland

Herstellerverzeichnis

- | | | |
|-----|------------------|--|
| 21) | Mettler | Ockerweg 3, 35353 Giessen, Deutschland |
| 22) | MWG Biotech | Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland |
| 23) | PAA Lab. GmbH | Unterm Bornrain 2, 35091 Cölbe, Deutschland |
| 24) | PAN Biotech GmbH | Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach, Deutschland |
| 25) | Quiagen | QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland |
| 26) | Riedel-de Haen | Wunstorfer Strasse 40, 30926 Seelze, Deutschland |
| 27) | Roche | Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim,
Deutschland |
| 28) | Sarstedt | Rommelsdorfer Straße, 51582 Nümbrecht,
Deutschland |
| 29) | Sigma Aldrich | Riedstrasse 2, 89555 Steinheim, Deutschland |
| 30) | Systec | Sandusweg 11, 35435 Wettenberg, Deutschland |
| 31) | Tesa | Quickbornstr. 24, 20253 Hamburg, Deutschland |
| 32) | Whirlpool | Gottlob-Bauknecht Str. 1, 73602 Schorndorf,
Deutschland |

7. Zusammenfassung

Die Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa gehören zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Diese Erkrankungen stehen wegen ihres langen, schweren und teilweise mit multiplen Komplikationen einhergehenden Verlaufes seit langem im Fokus der Wissenschaft. Sie sind durch eine diskontinuierliche, segmentale, im ganzen Gastrointestinaltrakt alle Wandschichten betreffende Entzündung (M. Crohn) bzw. eine kontinuierliche, die oberflächlichen Schleimhautschichten mit einbeziehende Entzündung (Colitis ulcerosa) charakterisiert. Die Hauptlokalisation für Läsionen bei M. Crohn liegt im terminalen Ileum bzw. proximalen Colon, die der Colitis ulcerosa befindet sich immer im Rectum und dehnt sich nachfolgend nach proximal aus. Die Hauptkomplikationen des M. Crohn liegen in Stenosen des Darmes, Fistelungen und Abszessen, bei der Colitis ulcerosa in Blutungen und einem im Vergleich zum M. Crohn weit erhöhten Entartungsrisiko begründet. Obwohl die Krankheitsbilder schon lange bekannt sind, konnte ihre genaue Ursache noch nicht eindeutig bestimmt werden. Viele Studien befassten sich mit der Pathogenese der beiden Erkrankungen. Unter anderem werden geographische, ethnische bzw. genetische Faktoren sowie bestimmte Verhaltensweisen, Infektionen, genetische Veränderungen, das Alter der Probanden sowie deren Geschlecht, virale bzw. bakterielle Infektionen sowie autoimmune Reaktionen als Faktoren diskutiert. Es häufen sich die Hinweise, dass virale bzw. bakterielle Infektionen, eine gestörte Schleimhautbarriere sowie autoimmune Entzündungsreaktionen für die Auslösung und Unterhaltung dieser Entzündungen ursächlich sind. Auf immunohistochemischer Ebene konnte z.B. eine verstärkte Expression des Protease-aktivierten Rezeptor 2 (PAR2) und von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) aufgezeigt werden. PAR2 ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, dessen Expression vor allem im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen wurde. PAR2 kann durch eine proteolytische Spaltung, z.B. durch Trypsin, Chymotrypsin, aber auch durch membranständige Serin-Proteasen (TTSP) aktiviert werden. Bis heute ist jedoch die Funktion von PAR2 in Physiologie und Pathophysiologie des Gastrointestinaltraktes noch immer unzureichend verstanden. Um ein besseres Verständnis der Funktion von PAR2 in Bezug auf Entzündungsreaktionen zu erhalten, war die Fragestellung dieser Arbeit, das Expressionsmuster der den Rezeptor beeinflussenden Faktoren zu evaluieren. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel die Gruppe der membranständigen Serin-Proteasen. Neben der Aktivierung von PAR2 übernehmen die membranständigen Serin-Proteasen wichtige Aufgaben in

diversen physiologischen wie auch pathophysiologischen Zellfunktionen. Unter anderem sind sie in Aufgaben bei der Zellentwicklung, der Gerinnung, der Komplementaktivierung, der Wundheilung, der Verdauung, der Zell-Zell-Interaktion, aber auch bei Entzündungsreaktionen sowie bei Tumorwachstum und Metastasierung eingebunden. Bis heute gibt es in der Literatur keine Studien, die das Expressionsmuster der membranständigen Serin-Proteasen bei Entzündungen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen widerspiegeln. Aus diesem Grund haben wir bei vier Vertretern der membranständigen Serin-Proteasen das Expressionsmuster bei Gewebsbiopsieproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa näher untersucht. Unsere Ergebnisse weisen für die gemessenen membranständigen Serin-Proteasen (TMPRSS2, TMPRSS4, MTSP-1 und Hepsin) erstmals ein statistisch signifikantes, deutlich erhöhtes Expressionsmuster bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa nach. Die statistisch signifikant erhöhte Expression der gemessenen membranständigen Serin-Proteasen liefert weitere Hinweise, dass die membranständigen Serin-Proteasen, zum Teil PAR2 vermittelt, in die Auslösung bzw. Unterhaltung und Modulation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingebunden sind. Für die Genese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen könnte dies, wie frühere Studien schon proklamierten, eine Serin-Protease abhängige Störung der Schleimhautbarriere sowie der mucosalen Immunabwehr bedeuten. Auch ist eine über membranständige Serin-Proteasen vermittelte Tumorgenese von colorectalen Karzinomen bei der Colitis ulcerosa denkbar. Mit diesem Wissen könnte in Zukunft möglicherweise ein diagnostischer Ansatz über die membranständigen Serin-Proteasen als Tumormarker sowie ein therapeutischer Ansatz über die selektive Blockade der Proteasen gegeben sein. Es gibt derzeit jedoch keine Daten, die das Expressionsverhalten der membranständigen Serin-Proteasen bei Tumoren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen näher beleuchten. Deshalb sind in der Zukunft weitere Untersuchungen notwendig, um die Genese sowie Therapie dieser Erkrankungen und aller auftretenden Komplikationen besser verstehen zu können.

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Austermann, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanfy, Christiansen, Coca, Czubayko, Daut, Dibbets, Eilers, Feuser, Flores de Jakoby, Fruhstorfer, Gente, Geus, Gloerfeld, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Höffken, Hofmann, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Klenk, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lammel, Lang, Lorenz, Lotzmann, Maier, Maisch, Mengel, Moll, Momeni, Mutters, Neff, Oertel, Pancherz, Pieper, Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seitz, Seyberth, Slenczka, Stachniss, Stoll, 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 Tage und auch viele Nächte 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 an meine Freunde Lars und Marcus.

Nicht zuletzt gehört mein Dank meiner Frau Anita, meinem Sohn Max, meiner ganzen Familie und meinen Freunden Matthias und Danny, die mich während des gesamten Medizin- sowie Zahnmedizinstudiums und darüber hinaus in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.