

**Bedeutung intestinaler Myofibroblasten für epitheliale
Wundheilungsprozesse des Darms und deren Modulation
durch Cyclooxygenase-Inhibitoren**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Katja Felgenhauer

geboren am 17.12.1971 in Laatzen

2002

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Müller betreut und unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. M. Göke im Zentrum für Innere Medizin in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie (Leiter: Prof. Dr. med. Michael P. Manns) der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit von Juli 1999 bis Juni 2002 angefertigt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Müller

Korreferent: PD Dr. med. M. Göke

Tag der Promotion: 24. Juni 2002

In Dankbarkeit

meinen Eltern

gewidmet

Zusammenfassung

Nach Mukosaverletzung des Darms mit der Folge von Epithelzellverlusten, z.B. durch Erosionen, Ulzerationen, bei chronischen entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch bei Infektionen durch enteropathogene Mikroorganismen, ist eine schnelle Wiederherstellung der Epithelkontinuität essentiell. Hierbei sind zwei Wundheilungsprozesse von wichtiger Bedeutung: die Migration und die Proliferation. Beide Prozesse werden über eine Vielzahl von Einzelfaktoren (z.B. Fettsäuren, Polyamine, Zytokine, Trefoilpeptide und Wachstumsfaktoren) reguliert. Der Einfluss von direkt dem Epithel benachbarten Myofibroblasten auf die Regulation der Migration und Proliferation ist jedoch noch unzureichend charakterisiert und ist im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht worden.

Es wurde ein *in vitro* Modell verwendet, bei dem intestinale Epithelzellen (Caco-2-Zellen) mit konditioniertem Medium primärer intestinaler subepithelialer Myofibroblasten inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass Myofibroblasten sowohl die Proliferation als auch die Restitution intestinaler Epithelzellen stimulieren. Diese Effekte werden über den durch Myofibroblasten parakrin sezernierten Hepatozytenwachstumsfaktor HGF vermittelt. In Zytokin-Regulations-Untersuchungen konnte evaluiert werden, dass unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , TNF- α und IFN- γ sowohl die HGF- RNA- als auch die HGF- Proteinkonzentration in primären intestinalen subepithelialen Myofibroblasten gesteigert wird. Demgegenüber senkten die antiinflammatorische Zytokine IL-4 und TGF- β 1 die mRNA-Expression. Die durch proinflammatorische Zytokine bedingte Steigerung der HGF-Konzentration bewirkte konsekutiv eine weiter verstärkte Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen. Diese Myofibroblasten-induzierten Effekte sind durch ERK1/2 und PI₃- Kinasen vermittelt, da in Gegenwart etablierter ERK1/2 und PI₃-Kinase-Inhibitoren diese Effekte erheblich reduziert wurden.

Die Steigerung der HGF-Expression im entzündeten Darm ist ein wichtiger Mechanismus zur Förderung von Wundheilungsprozessen. In dieser Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass Myofibroblasten durch Hochregulation der HGF-Expression nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in der Lage sind, proinflammatorische Signale in proregeneratorische Signale umzuleiten.

Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) zeigen neben ihren analgetischen, antiphlogistischen und antipyretischen Eigenschaften auch Effekte auf epitheliale

Schutzfunktionen (Steigerung der epithelialen Permeabilität, verminderte Epithelproliferation). Der Einfluss von NSAR auf die Myofibroblasten-vermittelte Wundheilungsförderung wurde bislang nicht untersucht und war ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit.

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Acetylsalicylsäure, Diclofenac und der COX-2-selektive Inhibitor Celecoxib gleichermaßen die Wundheilungsförderung von intestinalen Epithelzellen senken, wenn diese gleichzeitig mit Zytokin-konditionierten Myofibroblasten-Überständen behandelt werden. In diesem Modell sind die Effekte von 5-Aminosalicylsäure auf die Restitution schwächer ausgeprägt. Die restitutions- und proliferationsinhibierenden Effekte der NSAR sind gekoppelt mit einer Reduktion der Prostaglandin (PG)_{E2}- und 6-keto-PGF_{1α}- sowie HGF-Konzentration in Myofibroblasten Kultur-Überständen. Bei Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine zeigten NSAR keine signifikante Beeinflussung der Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass klassische NSAR, im Gegensatz zu 5-ASA, in einem *in vivo*-Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen den Krankheitsverlauf verschlechtern.

Schlagnvorte: Wundheilung, HGF, Myofibroblasten

Summary

The epithelium of the intestinal mucosa is a barrier for a variety of noxious agents. Rapid resealing of epithelial continuity is essential after various forms of mucosal injury, including erosions and ulcerations, actions of toxic agents, infections, graft versus host disease, ischemia, or radiation. Restitution and proliferation are key mechanisms for epithelial wound healing in the intestinal tract. During the restitution phase, viable intestinal epithelial cells migrate from the wound edge into the denuded area within minutes to hours. Later, cell proliferation enables replacement of lost cell populations and contributes to wound closure. Both, restitution and proliferation of intestinal epithelial cells, are regulated by a variety of factors (fatty acids, polyamines cytokines trefoilpeptides and growth factors). The influence of primary human intestinal myofibroblasts (HISMF) on epithelial wound healing has not been characterized yet and should be analysed in this thesis.

Conditioned media from HISMF cultures effect an increase of the epithelial Caco-2 cell restitution and proliferation compared to supernatants from unstimulated HISMF. These effects are mediated by the myofibroblast-derived Hepatocyte Growth Factor (HGF). Stimulation of colon myofibroblasts with the proinflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-1 α substantially increase HGF mRNA expression as well as HGF protein concentration in HISMF supernatants. In contrast, addition of TGF- β and IL-4 decrease HGF expression. Cytokine-stimulated HGF expression/secretion by HISMF is associated with enhanced intestinal epithelial wound healing. To determine the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3 (PI3)-kinase for HISMF-mediated effects on epithelial cells, specific inhibitors are used. In parallel HGF-mediated stimulatory effects of HISMF on intestinal epithelial restitution and proliferation are further increased through PI3-kinase and ERK signaling pathways.

The increase of HGF Expression is important for wound healing in the inflammed intestine. By increasing HGF expression, myofibroblasts are able to change proinflammatory signals into proregenerative signals.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) including diclofenac, aspirin and the Cox-2-selective inhibitor celecoxib are effective anti-inflammatory drugs.

Since information about effects of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on intestinal epithelial repair mechanisms is incomplete it was another aim of this thesis to assess

the effects of cyclooxygenase (Cox) inhibitors on colon myofibroblast stimulated restitution and proliferation of intestinal epithelial cells.

Diclofenac, ASS and celecoxib inhibit HISMf stimulated Caco-2 cell restitution and proliferation in a dose-dependent manner. This is especially evident when myofibroblasts are preincubated with IL-1 α or TNF- α . Moreover, diclofenac, ASS, and celecoxib decrease protein concentrations of HGF, PGE₂ and 6-keto-PGF_{1 α} in CMF conditioned media. Of note, 5-ASA has no significant effect on restitution whereas it diminishes HISMf stimulated Caco-2 cell proliferation. Compared to diclofenac, ASS and celecoxib, inhibitory 5-ASA effects on HGF, PGE₂ and 6-keto-PGF_{1 α} in HISMf culture supernatants are substantially less pronounced.

These results suggest that NSAIDs compared to 5-ASA decrease wound healing in inflamed intestine.

Keywords: wound-healing, HGF, myofibroblasts

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	7
1.1 Reparaturmechanismen des intestinalen Mukosaepithels	7
1.2 Regulation von epithelialer Zellproliferation und Mukosarestitution	8
1.3 Zelluläre Interaktionen zwischen intestinalen Fibroblasten und dem Darmepithel	10
1.4 Funktion von Eicosanoiden im Arachidonsäurezyklus und deren Modulation an Wundheilungsprozessen	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Zelllinien und Medien	20
2.1.1.1 Eukaryontische Zelllinien	20
2.1.1.2 Zellkultur-Reagenzien für Caco-2-Zellen und HISMF	20
2.1.2 Desoxyribonukleinsäure (DNA)	21
2.1.2.1 Verwendete Plasmide	21
2.1.3 Chemikalien und Radionuklide	21
2.1.3.1 Chemikalien	21
2.1.3.2 Radionuklide	23
2.1.4 Molekulargewichtsmarker	24
2.1.4.1 DNA-Marker	24
2.1.4.2 Protein-Marker	24
2.1.5 Enzyme	24
2.1.6 Antikörper	24
2.1.7 Zytokine	26
2.1.8 Inhibitoren	26
2.1.9 Arzneistoffe	27
2.1.10 Sonstige Materialien	27
2.1.11 Geräte	28

	Seite
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur	30
2.2.1.1 Kultivierung von Caco-2-Zellen	30
2.2.1.2 Isolation und Kultivierung primärer humaner intestinaler subepithelialer Myofibroblasten (HISMF)	30
2.2.2. Immunhistochemische Charakterisierung von HISMF	33
2.2.2.1 Immunhistochemische Färbung	33
2.2.2.2 Hämalaun-Färbung	34
2.2.3 Protein-Untersuchungen	34
2.2.3.1 HGF-Protein-Untersuchungen im Zellkultur-Überstand	34
2.2.3.2 Eicosanoid-Protein-Untersuchungen im Zellkultur-Überstand	35
2.2.3.3 Gewinnung von Gesamtzell-Extrakten	35
2.2.3.4 Bestimmung von Protein-Konzentrationen	36
2.2.3.4.1 Spektrophotometrische Bestimmung der Protein-Konzentration	36
2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.3.6 Western Blot	37
2.2.4 Ribonukleinsäure (RNA)-Untersuchungen	38
2.2.4.1 Isolation von Gesamt-mRNA aus Zellen	38
2.2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	38
2.2.4.3 Northern Blot	39
2.2.4.3.1 RNA-Gelelektrophorese	39
2.2.4.3.2 Kapillarblot	39
2.2.4.3.3 Isolierung und radioaktive Markierung von DNA-Sonden	40
2.2.4.3.4 Radioaktive Markierung von DNA mit Random-Primern	40
2.2.4.3.5 Hybridisierung	41
2.2.4.4 TaqMan™ PCR: Quantifizierung von COX-2 mRNA-Expr	41
2.2.5 Funktionsuntersuchungen	43
2.2.5.1 Restitutionsassays	43
2.2.5.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels [³ H]-Thymidineinbau in DNA	44
2.2.5.3 Quantifizierung der Apoptose mittels Histon-ELISA	45
2.2.6 Plasmidisolation	46
2.2.6.1 DNA-Minipräparation	46
2.2.6.2 DNA-Maxipräparation	47

2.2.6.3	Restriktionsenzymverdau der Plasmide	47
2.2.7	Statistische Analyse	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Isolation primärer humaner intestinaler subepithelialer Myofibroblasten (HISMF)	49
3.2	Charakterisierung der HISMF	50
3.3	Untersuchungen zur Expression des Wachstumsfaktors HGF	51
3.3.1	Zytokine modulieren die HGF-Protein-Expression in HISMF-Kultur-Überständen	51
3.3.2	HGF mRNA-Expression wird dosisabhängig durch Zytokine moduliert	52
3.4	Untersuchungen zur Beeinflussung der Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen durch Myofibroblasten	55
3.4.1	HISMF steigern die Caco-2-Zellrestitution	55
3.4.1.1	Restitutionsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden durch proinflammatorische Zytokine noch weiter verstärkt	56
3.4.2	HISMF steigern die Caco-2-Zellproliferation	59
3.4.2.1	Proliferationssteigernde Myofibroblasten-Effekte werden durch proinflammatorische Zytokine noch weiter verstärkt	60
3.5	Untersuchungen zum Signalkaskadeweg der proliferations- und restitutionsfördernden Myofibroblasten-Effekte	64
3.5.1	Restitutionsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden über PI ₃ - und MAP-Kinasen vermittelt	64
3.5.2	Proliferationsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden über PI ₃ - und MAP-Kinasen vermittelt	66
3.6	HGF reguliert die ERK/Phospho-ERK und PI ₃ -Kinase-Protein-Expression	68
3.7	Apoptose von Caco-2-Zellen wird durch HISMF nicht beeinflusst	70
3.8	Cyclooxygenase (COX)-Hemmer und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) modulieren epitheliale Wundheilungsfunktionen des Darms	71
3.8.1	NSAR- und 5-ASA-inkubierte Myofibroblasten modulieren die Restitution des Darmepithels	71
3.8.2	NSAR- und 5-ASA-inkubierte Myofibroblasten modulieren die Proliferation des Darmepithels	74

3.9	COX-Inhibitoren modulieren in HISMF die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten	76
3.9.1	COX-Inhibitoren reduzieren die PGE ₂ -Konzentration in HISMF-Überständen; in Gegenwart von IL-1 α und TNF- α sind diese Effekte verstärkt	77
3.9.2	COX-Inhibitoren reduzieren die 6-keto-PGF _{1α} -Konzentration in HISMF-Überständen, in Gegenwart von IL-1 α und TNF- α sind diese Effekte verstärkt	78
3.10	COX-Inhibitoren modulieren die HGF-Protein-Konzentration in HISMF-Überständen	79
3.11	Proinflammatorische Zytokine steigern stark; COX-Inhibitoren senken schwach die COX-2 mRNA-Expression in HISMF	80
4.	Diskussion	82
	Bedeutung intestinaler Myofibroblasten für epitheliale Wundheilungsprozesse des Darms	82
	Einfluss von nicht-steroidalen Antiphlogistika auf die gezeigten wundheilungsfördernden Myofibroblasten-Effekte	89
	Ausblick	96
5.	Zusammenfassung	98
6.	Literaturverzeichnis	100
7.	Abkürzungsverzeichnis	115
8.	Danksagung	117
	Anhang	118

1. Einleitung

1.1 Reparaturmechanismen des intestinalen Mukosaepithels

Das intestinale Mukosaepithel dient als Schutz und Barriere vor schädigenden Agenzien und ist durch eine hohe Zellproliferationsrate gekennzeichnet (Göke und Podolsky, 1996). So wird bei den meisten Säugetieren innerhalb von 24-72 h der komplette Bestand an intestinalen Epithelzellen erneuert (Lipkin und Newmark, 1985; Potten et al., 1992). Bei Schädigungen der intestinalen Mukosa, beispielsweise durch Einwirkung von Toxinen, Mikroorganismen oder radioaktiver Bestrahlung, aber auch nach Ischämien oder Ulzerationen, wird ein schnelles Versiegeln der Epithelschicht beobachtet. Zu dieser schnellen Regenerationsleistung tragen im Wesentlichen zwei Prozesse bei: Die Migration und die Zell-Proliferation (Feil et al., 1987; Feil et al., 1989b; Podolsky, 1999; Rutten und Ito, 1983; Waller et al., 1988). Die Migration (Restitution) setzt initial innerhalb weniger Minuten nach Darmmukosa-Verletzung ein und beinhaltet das Einwandern von lebenden Epithelzellen aus der direkten Nachbarschaft in das Wundgebiet (Wilson und Gibson, 1997a). Dieser Prozess, der auch Restitution genannt wird, dient der Wiederherstellung einer intakten Darmmukosa, was eine schnelle Wiederherstellung der Kontinuität des Epithelzellverbandes beinhaltet. Die Proliferation setzt erst etwa 12-16 h nach Mukosaverletzung ein und dauert 1-2 Tage an (Podolsky und Babyatsky, 1995). In dieser Wundheilungsphase zeichnen sich die Epithelzellen durch erhöhte Zellteilung aus, so dass die verlorengegangenen Epithelzellen wieder ersetzt werden und die mukosale Integrität wieder hergestellt wird (Göke und Podolsky, 1996).

Weiterhin wird die Wundheilungsgeschwindigkeit durch die Steuerung des Gleichgewichts von Proliferations- und Apoptoserate der Epithelzellen reguliert (Lu et al., 2001; Sun et al., 1998). Komplettiert wird die Wundheilung durch die Wiederherstellung der sog. Schlussleisten („tight-junction“, „occluding-junction“, „zonula-occludens“), die benachbarte Zellen eines Epithels an ihrer luminalen Seite miteinander verbinden und die Grenze zwischen der apikalen und basolateralen Membran jeder Einzelzelle bilden (Anderson et al., 1995; Balda et al., 1992; Cereijido et al., 1993; Citi, 1993; Gumbiner, 1996; Gumbiner, 1987). Die wiederhergestellte Integrität der Epithelbarriere ist funktionell an einer verminderten trans- bzw. vor allem parazellulären Moleküldurchlässigkeit erkennbar (Katz et al., 1989). Die Wiederherstellung des transepithelialen Membranwiderstandes geht konsekutiv mit einer verminderten Permeabilität einher. Dadurch wird der passive Ein- und Austritt von gelösten hydrophilen Substanzen begrenzt, was somit die Aufnahme antigener und toxischer Substanzen reduziert.

Die epitheliale Barriere ist jedoch keine statische Größe, sondern z.B. durch Veränderung der Durchlässigkeit des Schlussleistensystems, z.B. durch Modulation der tight-junction-Elemente, variierbar (Bentzel et al., 1987; Fromm et al., 1985; Fromm et al., 1990).

1.2 Regulation von epithelialer Zellproliferation und Mukosarestitution

In den letzten Jahren konnten Proliferations- und Restitutionsmodelle sowohl *in vitro* (Ciacci et al., 1993a; Göke et al., 1998b; Rosenberg et al., 1997; Sato und Rifkin, 1989; Weiser, 1973) als auch *in vivo* (Covell und Herring, 1995; Fantidis et al., 2001; Guevara et al., 1999; Navsaria et al., 1994;) etabliert werden. Auf diese Weise wurden zahlreiche Faktoren charakterisiert, die in der Lage sind, die Proliferation und Restitution von Epithelzellen zu regulieren. Erwähnenswerte Faktoren sind in diesem Zusammenhang u.a. das pH-Milieu, kurzkettige Fettsäuren, Polyamine, Trefoilpeptide, Zytoskelett-Komponenten, Rho-Proteine, Extrazelluläre Matrix (ECM), aber auch Cyclooxygenasen (COX), Prostaglandine, verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine (Podolsky und Babyatsky, 1995; Wilson und Gibson, 1997a)

Für den Einfluss des pH-Wertes wurde gezeigt, dass die Proliferation im leicht sauren pH-Bereich gefördert wird (Lupton et al., 1985; Perdakis et al., 1998). Die Restitution wird sowohl bei leicht alkalischen pH-Werten, als auch bei sauren pH-Werten (hier jedoch in geringerem Ausmaß) gefördert (Feil et al., 1989a). Auch für kurzkettige Fettsäuren, die beim anaeroben Abbau von Kohlenhydraten und Proteinen durch die Darmbakterien entstehen, konnten restitutionssteigernde Effekte dokumentiert werden (Wilson und Gibson, 1997b). Nicht eindeutig ist jedoch die Datenlage bezüglich der Effekte von kurzkettigen Fettsäuren auf die epitheliale Proliferation (Wilson und Gibson, 1997b). Wachstumssteigernde, aber auch restitutionssteigernde Effekte konnten für Polyamine belegt werden (Ginty et al., 1989; Luk und Baylin, 1984; McCormack et al., 1998). In anderen Publikationen wurden die Effekte von Eicosanoidmetaboliten beschrieben. So zeigen Blikslager et al., (1997) und Zushi et al., (1996), dass Prostaglandine sowohl die Proliferation als auch die Restitution von Epithelzellen fördern. In diesem Zusammenhang sind auch die Effekte von Cyclooxygenasehemmern erwähnenswert: Durch Inhibition des Enzyms Cyclooxygenase

konnte sowohl die Proliferation (Erickson et al., 1999; Sheng et al., 1997) als auch die Restitution von Epithelzellen gehemmt werden (Horie-Sakata et al., 1998). Auch die Gruppe der Trefoil-Peptide, die in Mukus-produzierenden Zellen exprimiert und auf die gastrointestinale Mukosaoberfläche sezerniert werden, zeigen restitutionsfördernde Effekte auf intestinale Epithelzellen (Dignass et al., 1994a; Marchbank et al., 1998). Eine überaus wichtige Rolle in der Modulation von Proliferation und Restitution spielen bestimmte Wachstumsfaktoren. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Peptiden mit niedrigem Molekulargewicht (< 25 kD), die von verschiedenen Zellpopulationen in der intestinalen Mukosa luminal gebildet werden und luminal, intraepithelial sowie subepithelial nachweisbar sind. Zu diesen Peptidwachstumsfaktoren gehören die Transforming Growth Faktor-Familie (TGF α/β), Insulin-like Growth Faktor-Familie (IGF-I und -II), Fibroblast Growth Faktor-Familie (FGF), Glucagon-like-Peptide-2 (GLP) und der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF). So fördert TGF- α sowohl die Proliferation als auch die Restitution (Acra et al., 1998; Coffey et al., 1995; Xian et al., 2002), während TGF- β zwar die Restitution fördert (Ciacci et al., 1993a; Dignass und Podolsky, 1993), die Proliferation jedoch hemmt (Barnard et al., 1989; Barnard et al., 1995; Kurokawa et al., 1987). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass HGF, aber auch Mitglieder der Fibroblast Growth Faktor-Familie und Insulin-like Growth Faktor-Familie die Proliferation und Migration *in vitro* und *in vivo* stimulieren (Dignass et al., 1994a; Dignass et al., 1994b; Fukamachi et al., 1994; Göke et al., 1998b; Housley et al., 1994; Park et al., 1992). Auch für FGF-1, FGF-2 und KGF-1 (syn. FGF-7) sowie für IGF I, IGF II, und GLP-2 konnten proliferationsfördernde Effekte nachgewiesen werden (Booth und Potten, 1995; Chen et al., 1999; Ghatei et al., 2001; Guo et al., 1992; Jasleen et al., 2000; Ohneda et al., 1997; Wheeler und Challacombe, 1997).

Activin A gehört zu der TGF- β -Familie und gilt als proliferationshemmender Wachstumsfaktor (Sonoyama et al., 2000; Richards et al., 1999). In interstitiellen Eierstockzellen zeigte Activin A jedoch proliferationsfördernde Effekte (Duleba et al., 2001). Darüber hinaus wurde in transgenen Mäusen, bei denen Activin in Keratinozyten der Epidermis überexprimiert ist, für Activin fibrosefördernde- und granulationsfördernde Wirkungen nachgewiesen (Beer et al., 2000; Hubner et al., 1999). Dies deutet auf eine Beteiligung von Activin an Wundheilungsprozessen hin.

Die große Gruppe der Zytokine hat nicht nur entscheidende Funktionen bei der Initiierung und der Kontrolle von Entzündungsreaktionen. Vielmehr sind sie auch wichtige Mediatoren in der zellulären Interaktion. In letzter Zeit wurden neue Erkenntnisse über die Einflussnahme von Zytokinen auf die Regulation der Proliferation und Restitution von Epithelzellen

gewonnen. Für das pleiotrop wirkende Interferon ($\text{IFN-}\gamma$) konnten u.a. auch anti-proliferative Eigenschaften nachgewiesen werden. Es konnte dokumentiert werden, dass $\text{IFN-}\gamma$ die Proliferation von Darmepithelzellen hemmt (Emami et al., 1990; Ruemmele et al., 1998), die Restitution jedoch fördert (Dignass und Podolsky, 1993; Rosenberg et al., 1991). Interleukin (IL)-1, welches in zwei Formen ($\text{IL-1}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$) auftritt, ist ein pleiotroper pro-inflammatorischer Faktor mit sowohl lokaler als auch systemischer Wirkung. Hinsichtlich Proliferations- und Restitutionsbeeinflussung zeigte $\text{IL-1}\beta$ auf beide Prozesse stimulierende Eigenschaften (Panja et al., 1998; Varilek et al., 1994). Der Tumor Nekrose-Faktor ($\text{TNF-}\alpha$) zeigt neben seinen tumortoxischen Eigenschaften auch proliferationsmodulierende Eigenschaften. Es konnte festgestellt werden, dass $\text{TNF-}\alpha$ in niedrigen Konzentrationen die Proliferation von Darmepithelzellen steigert, während er in höheren Konzentrationen eher proliferationshemmende Wirkung zeigt (Kaiser und Polk, 1997). Im Gegensatz dazu wurde auf die Restitution durch $\text{TNF-}\alpha$ keine wesentlichen Effekte beobachtet (Dignass und Podolsky, 1993). IL-2 , das wegen seiner Wirkung auf T- und B-Zellen ein zentrales Regulatormolekül bei der Immunantwort darstellt, zeigt zeitabhängige Effekte auf die Proliferation. So wurden proliferationssteigernde Effekte in den ersten 24 h beobachtet, während nach 48 h nach Stimulation mit IL-2 proliferationsinhibierende Effekte dokumentiert wurden (Ciacci et al., 1993b; Hirokawa et al., 1997; Shigematsu et al., 1998). Darüber hinaus konnten an verwundeten Epithelzellen auch restitutionsfördernde Effekte von IL-2 dokumentiert werden (Dignass et al.; 1996).

1.3. Zelluläre Interaktionen zwischen intestinalen Fibroblasten und dem Darmepithel

Im Gegensatz zu Kenntnissen der Effekte der oben beschriebenen Einzelfaktoren auf die Proliferation und Restitution von Epithelzellen liegen bislang nur wenig Daten hinsichtlich der Effekte von Zellen aus der Lamina propria vor. In direkter Nachbarschaft zu Epithelzellen befinden sich unterhalb der Basalmembran Neurone bzw. Nervenendigungen, B- und T-Lymphozyten, Granulozyten, Mastzellen sowie Fibroblasten (Donnellan und Beal, 1966; Kaye et al., 1968). Zu der sehr heterogenen Population der Fibroblasten gehören u.a. auch Myofibroblasten, die im Gastrointestinaltrakt im Bereich der Krypten lokalisiert sind (Powell et al., 1999b; Powell et al., 1999a). Unabhängig von ihrer Lokalisation weisen

Myofibroblasten erstaunliche Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Morphologie, Funktion und ihres biochemischen Repertoires auf (Powell et al., 1999b). Intestinale Myofibroblasten lassen sich in zwei Gruppen einteilen: in die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) und in die subepithelialen intestinalen Myofibroblasten (Valentich et al., 1997). Gemeinsames Merkmal von Myofibroblasten ist die Expression von smooth muscle Actin, das ihnen dadurch Eigenschaften von Muskelzellen verleiht (Gabbiani, 1996).

Die früher nur als Strukturbildner bekannten Fibroblasten, die durch Produktion von Matrixmolekülen wie Collagen, Glycosamin, Glykanen und Fibronectin zur Bildung einer kompletten Basalmembran beitragen (Hahn et al., 1987; Simo et al., 1992a; Weiser et al., 1990), sind nach neueren Untersuchungen auch an mesenchymal-epithelialen Wirkungen beteiligt (Simon-Assmann et al., 1995). Für Myofibroblasten wurde gezeigt, dass sie untereinander durch gap-junctions verbunden sind (Joyce et al., 1987; Sanders, 1996; Valentich et al., 1997). Für ICC konnte zudem gezeigt werden, dass sie auch gap-junctions zu Muskelzellen und Nervenzellen besitzen (Thunberg, 1982). Es wird vermutet, dass sie für die Bildung von „slow waves“ verantwortlich sind und somit Schrittmacherfunktionen für die Motilität des Darms übernehmen. Diese These unterstützend, wurden Ähnlichkeiten der ICC mit kardialen Schrittmacherzellen gefunden (Fausone Pellegrini et al., 1977). Aktivierte Myofibroblasten exprimieren darüber hinaus Adhäsions-Moleküle, wie z.B. das interzelluläre Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1), das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül (VCAM) und das neurale Zell-Adhäsionsmolekül (NCAM) (Hellerbrand et al., 1996; Knittel et al., 1996; Marra et al., 1995; Pang et al., 1994; Racine-Samson et al., 1997). Durch Anlagerung von Lymphozyten, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten an Myofibroblasten sind diese auch an immunologischen Prozessen beteiligt (Burns et al., 1996; Crowston et al., 1997; Fiocchi, 1997; Hogaboam et al., 1998; Roberts et al., 1997; Strong et al., 1998). Ferner konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten die Morphogenese, Organogenese und die Differenzierung von Epithelzellen durch Sekretion löslicher Entzündungsfaktoren fördern (Haffen et al., 1987; Kedinger et al., 1987). So scheint z.B. die Differenzierung des intestinalen Epithels durch TGF- β 1 vermittelt zu sein (Halttunen et al., 1996; Simo et al., 1992b; Stallmach et al., 1989). Bekannt ist auch, dass Myofibroblasten die Sekretion von Epithelzellen beeinflussen. So konnte in Ussing-Kammer Experimenten die Chloridsekretion von T-84-Zellen nach Stimulation mit Bradykinin, Serotonin und Histamin in Gegenwart intestinaler Myofibroblasten gesteigert werden (Berschneider und Powell, 1992). Des Weiteren konnte belegt werden, dass intestinale Rattenmyofibroblasten das Wachstum fetaler Rattenendodermzellen stimulieren (Fritsch et al., 1997). Bemerkenswert ist, dass

Myofibroblasten auch an Regenerationsprozessen beteiligt zu sein scheinen. So konnte dokumentiert werden, dass Myofibroblasten, bedingt durch ihre kontraktile Eigenschaften, in der Lage sind, die Oberfläche von Wunddefekten zu verkleinern (Moore et al., 1989; Racine-Samson et al., 1997; Tomasek et al., 1992). Da Myofibroblasten ein breites Spektrum an Zytokinen, Chemokinen und Entzündungsmediatoren produzieren (Hogaboam et al., 1998; Pang et al., 1994; Papanicolaou et al., 1998; Simon-Assmann et al., 1995; Sprenger et al., 1997; Youngman et al., 1993), scheinen sie darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen zu spielen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten durch ihre Synthese von Prostaglandinen sowie durch konstitutive Cyclooxygenase-1- und induzierbare Cyclooxygenase-2-Expression mit in den Arachidonsäurezyklus eingreifen (Berschneider und Powell, 1992; Forstermann et al., 1998; Hinterleitner et al., 1996; Hogaboam et al., 1998; Muhl und Pfeilschifter, 1996; Wilborn et al., 1995).

Auch wurde beschrieben, dass Fibroblasten restitutions- (Ohshima et al., 2000; Shimaio et al., 1999) und proliferationsfördernde (Göke et al., 1998b) Effekte ausüben.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass in der intestinalen Mukosa eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren gebildet werden (Dignass et al., 1996; Kurokawa et al., 1987; Suemori et al., 1991). Unter den durch Myofibroblasten sezernierten Wachstumsfaktoren zeigt der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) mitogene, morphogene, aber auch motogene Eigenschaften (Jiang und Hiscox, 1997). HGF wird in mesenchymalen, nicht aber epithelialen Zellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert (Fukamachi et al., 1994; Prat et al., 1991).

In der Extrazellulärmatrix existiert eine pro-Form von HGF, die durch Serin Proteasen in eine α - und β -Kette gespalten wird. Nach anschließender Disulfidbindung wird das aktive heterodimere Glykoprotein HGF gebildet. HGF entfaltet seine Wirkung lokal durch Bindung an seinen spezifischen, hochaffinen Zelloberflächenrezeptor c-Met (Stella und Comoglio, 1999), der in der Darmmukosa entlang der Krypt-Villus-Achse exprimiert ist (Sonnenberg et al., 1993). Durch Bindung des HGF an c-Met werden Proteinkinasen aktiviert, die nachgeschaltete intrazelluläre Signalmechanismen induzieren, die ihrerseits Funktionen der intestinalen Mukosa modulieren (Boccaccio et al., 1998). Es wird vermutet, dass HGF und sein Rezeptor c-Met für Wachstums-, Morphogenese-, und Differenzierungsprozesse essentiell sind (Zarnegar, 1995). Bekannt ist auch, dass HGF die Transformation und Tumorgenese in Fibroblasten der Maus fördert (Vande Woude et al., 1997).

Von besonders großem Interesse ist die Beobachtung, dass HGF neben einer Vielzahl von Regulationsmechanismen sowohl die Migration von Epithelzellen (Delehedde et al., 2001;

Dignass et al., 1994a; Takahashi et al., 1995) als auch die Proliferation von Darmepithelzellen fördert (Fukamachi et al., 1994; Igawa et al., 1991; Mason et al., 1996; Matsumoto et al., 1991; Göke et al., 1998b). Der letztgenannte Autor zeigte, dass die humane Kolonmyofibroblasten-Zelllinie CCD-18 die Proliferation von Epithelzellen via HGF steigert. Die beschriebenen mesenchymal-epithelialen Wirkungen wurden sowohl in direkter und indirekter Co-Kultur als auch unabhängig von Zell-Zell-Kontakten durch Überstände von CCD-18 vermittelt. Eine weitere Ausgangsbasis dieser Arbeit waren Beobachtungen Zytokin-bedingter Modulationen der HGF-Expression in Gingiva und Lungenfibroblasten. Hierbei wurde gezeigt, dass die HGF mRNA-Expression durch Stimulation mit TNF- α , IL-1 α and IL-1 β gesteigert wird (Tamura et al., 1993).

Ungeklärt war bisher die Frage, ob die HGF-Expression in *primären* intestinalen Myofibroblasten durch verschiedene Zytokine moduliert wird, und ob darüber hinaus diese eventuelle Beeinflussung der HGF-Expression mit einer Förderung der Restitution bzw. Proliferation von Kolon-Epithelzellen einhergeht. Dieser mögliche Zusammenhang wird in Abb. 1 schematisch dargestellt.

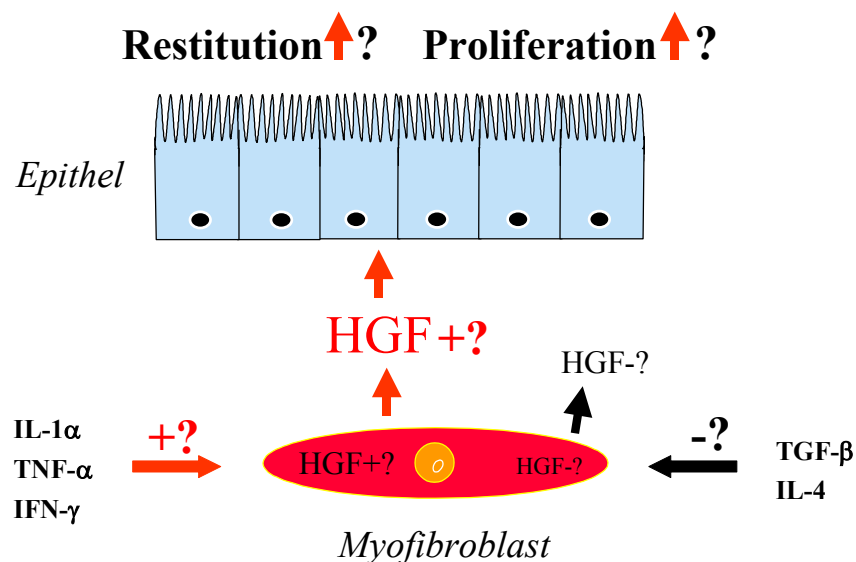


Abb. 1
Schematische Darstellung möglicher Zytokin-induzierter Myofibroblasteneffekte auf die HGF-Expression mit konsekutiver Modulation der Restitution und der Proliferation in Darmepithelzellen.

1.4 Funktion von Eicosanoiden im Arachidonsäurezyklus und deren Modulation an Wundheilungsprozessen

Eicosanoide sind als Mediatoren an zahlreichen inter- und intrazellulären Regulationsprozessen beteiligt. Neben vielen Funktionen in unterschiedlichen Organen (Regulation des Herz-Kreislauf-Systems, der Blutgerinnung, der Entzündung, des Atmungs- und Fortpflanzungssystems) tragen sie auch im Gastrointestinaltrakt zu Wundheilungs- und Differenzierungsprozessen verschiedener epithelialer Zellpopulationen bei. Zu der Substanzgruppe der Eicosanoide, deren Grundgerüst aus 20 Kohlenwasserstoffatomen besteht, gehören die für Regulationsprozesse wichtigen Prostaglandine, Thromboxan und Leukotriene.

Die Synthese dieser Stoffe erfolgt über die Arachidonsäurekaskade, die in Abb.2 schematisch dargestellt ist. Arachidonsäure, die zumeist in membranständigen Phospholipiden inkorporiert vorliegt, wird enzymatisch durch Phospholipase A₂ freigesetzt. Für die Synthese von Leukotrienen, die bei immunologischen und entzündlichen Prozessen von Bedeutung sind, wird die freigesetzte Arachidonsäure zunächst durch Katalyse von Lipoxygenase zu dem Intermediärprodukt Hydroxyeicosatetraensäure (5-HPETE) oxygeniert. Anschließend wird 5-HPETE ebenfalls durch Lipoxygenase zu dem instabilen Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄) umgewandelt, welches schließlich durch Hydrolase zu verschiedenen Leukotrienen umgesetzt wird. Der Name Leukotrien rührt daher, dass derartige Stoffe mit drei konjugierten Doppelbindungen erstmals aus Leukozyten isoliert wurden. Leukotriene, insbesondere LTB₄, wirken chemotaktisch auf Leukozyten, Fibroblasten und Keratinozyten und sind daher auch für Wundheilungsprozesse von großer Bedeutung. LTC₄ und LTD₄ werden durch ihre starke bronchokonstriktorische Wirkung mit der Auslösung von Asthma in Verbindung gebracht (Ducharme et al., 2002; Parnes, 2002; Rorke et al., 2002). Auch wird angenommen, dass Leukotriene an der Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn beteiligt sind (Bertran et al., 1996; Hammerbeck und Brown, 1996; Schmidt et al., 1996; Taniguchi et al., 1997; Wallace et al., 1998; Zarif et al., 1996).

Prostaglandine und Thromboxan werden nach Freisetzung der Arachidonsäure aus den Zellmembranen unter Katalyse von Cyclooxygenasen synthetisiert. Nach Einbau von 2 Sauerstoffatomen in die Arachidonsäure entsteht das instabile Intermediärprodukt Prostaglandin (PG) G₂, das dann durch nachfolgende Reduktion zu PGH₂ umgesetzt wird.

Schließlich wird PGH_2 durch eine Reihe verschiedener gewebespezifischer Enzyme zu Prostaglandinen oder Thromboxan umgewandelt.

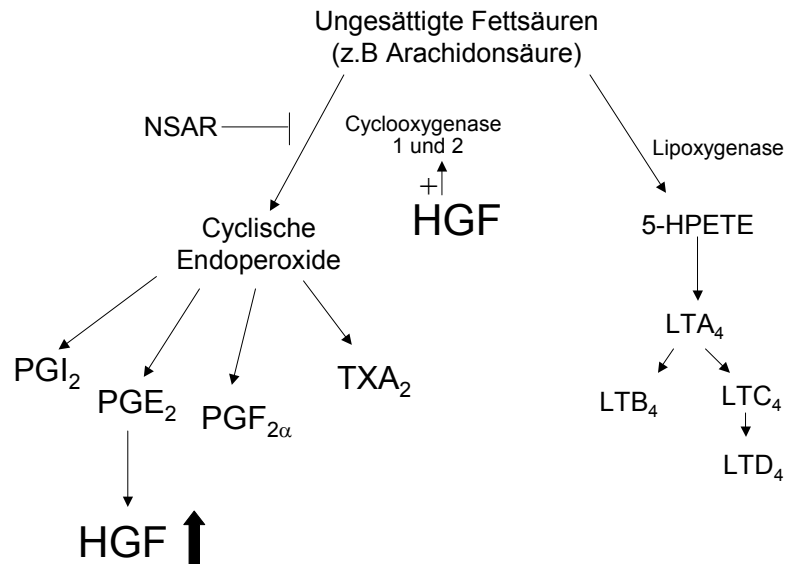


Abb. 2
Schematische Darstellung des Arachidonsäurezyklus

Prostaglandine, die als Antwort auf inflammatorische Stimuli gebildet werden, sind Entzündungsmediatoren und spielen eine Rolle bei der Entstehung von Schmerzen und Schwellungen. Durch direkten Angriff an der glatten Muskulatur der Gefäße wirken sie zudem blutdrucksenkend; die renale Durchblutung wird gesteigert (Clark et al., 1973; Hendriks, 1971; Suzuki et al., 1975). Zudem ist auch eine uteruskontrahierende Wirkung beschrieben (Clark et al., 1973; Hendriks, 1971; Suzuki et al., 1975). Im Bereich des Intestinaltraktes ist u.a. das PGE_2 von zytoprotektiver Bedeutung. Es wurde berichtet, dass exogenes Prostaglandin PGE_2 die Proliferation von Stammzellen intestinaler Krypten stimuliert (Cohn et al., 1997). Die vielschichtigen Interaktionen zwischen HGF und dem COX-Stoffwechsel zeigen sich auch darin, dass durch lokale HGF-Applikation die COX-Expression gesteigert wird. Hierbei wurde darüber hinaus die Wundheilung von gastralen Ulzerationen gefördert (Brzozowski et al., 2001). Ferner wurde gezeigt, dass Prostaglandine die HGF-Expression steigern (Bamba et al., 1998).

Die analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Wirkungen nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR) beruhen auf der Hemmung der Cyclooxygenasen-1 und -2 mit konsekutiver Hemmung der Prostaglandin-Synthese (Vane, 1971). Aufbauend auf der Klonierung des COX-2 Genes konnte gezeigt werden, dass die Cyclooxygenase in zumindest zwei Isoformen vorliegt (Kujubu et al., 1991; Xie et al., 1991). Die Regulation beider Isoformen erfolgt in unterschiedlicher Weise. Während COX-1 in allen gesunden Geweben im Rahmen der normalen Zellfunktion konstitutiv exprimiert wird, also unabhängig von extrazellulären Stimuli, erfolgt die Expression von COX-2 unter dem Einfluss externer Stimuli wie z.B. Endotoxine, Phorbol-ester Wachstumsfaktoren, Zytokinen (DuBois et al., 1994a; DuBois et al., 1994b). Zur Zeit wird über eine dritte Isoform der Cyclooxygenase spekuliert (Botting, 2000; Willoughby et al., 2000).

Klassische NSAR hemmen sowohl COX-1 als auch COX-2 und reduzieren infolgedessen die Bildung aller Prostaglandine (Bjarnason et al., 1993). Als unerwünschte Begleiterscheinungen, die sich besonders im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes manifestieren, treten Schleimhautschädigungen, petechiale Blutungen, Striae, Erosionen sowie Ulzerationen auf (Allison et al., 1992; Cheatum et al., 1999; Graham und Smith, 1988; Griffin et al., 1991; Langman, 1989; McCarthy, 1989). Einige Autoren berichteten, dass NSAR die Permeabilität im Kolon steigern, was durch Gabe von Metronidazol wieder reduziert werden konnte (Davies et al., 1993). Die Autoren schlossen daraus, dass die Permeabilitätsbeeinflussung durch NSAR infolge bakterieller Coinfektion auftritt (Bjarnason et al., 1991; Davies et al., 1993).

Mit der Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren, wie Celecoxib und Rofecoxib, liegen nunmehr Antiphlogistika/Analgetika vor, die mit wesentlich höherer Selektivität die COX-2-Aktivität hemmen als klassische NSAR, so dass mit diesen Substanzen die pathophysiologische Rolle der beiden Isoenzyme differenziert werden kann (Leahy et al., 2002). Klinische Studien belegen, dass das Nebenwirkungsspektrum zumindest im Bereich des Gastrointestinaltraktes reduziert ist (Silverstein et al., 2000). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bildung von Prostaglandinen im Gastrointestinaltrakt, welche die Magenschleimhaut vor erodierenden Wirkungen der sauren Verdauungssäfte schützt, zum großen Teil vom Isoenzym COX-1 kontrolliert wird (Kargman et al., 1996).

Anzumerken ist, dass bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) auch heute noch, neben anderen Medikamenten, das Salicylsäurederivat 5-Aminosalicylsäure (5-ASA, Mesalazin) verordnet wird. Trotz seiner strukturellen Verwandtschaft mit klassischen NSAR zeichnet sich nur 5-ASA, nicht aber die klassischen NSAR, durch schützende Wirkungen auf

die Darm-Mukosa während der aktiven Phasen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen aus. Die Mukosa-schützenden Eigenschaften in der Therapie des Morbus Crohn beruhen auf einem noch weitgehend ungeklärten Wirkmechanismus.

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden häufig an Arthralgien und Arthritis. Neuerdings werden hierbei zur Reduktion gastraler Nebenwirkungen statt der klassischen NSAR COX-2-selektive Inhibitoren eingesetzt (Chan et al., 1999; Penning et al., 1997)

Bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) zeigte die Behandlung mit Celecoxib eine Verbesserung des Krankheitsbildes. Die für diese Erkrankung typischen adenomatösen kolorektalen Polypen, aus denen sich bei Nichtbehandlung in einem hohen Prozentsatz ein Kolon-Karzinom entwickelt, wurden nach nur 6-monatiger Celecoxib-Einnahme in Anzahl und Größe reduziert (Steinbach et al., 2000).

HGF steigert die Expression von Cyclooxygenasen (Jones et al., 1999). Auch die unter 1.2 bereits beschriebene Förderung der Proliferation und Restitution epithelialer Zellen durch Cyclooxygenasen und Prostaglandine und die unter 1.3 beschriebene Steigerung der HGF-Expression durch Prostaglandine stützt das Konzept, dass HGF für diese beiden Prozesse ein zentrales Regulatormolekül darstellt. Es lässt sich hier die Hypothese aufstellen, dass Prostaglandine möglicherweise die Proliferation und Migration von Epithelzellen beeinflussen, indem sie die HGF-Expression in Myofibroblasten modulieren, was schematisch in Abb. 3 illustriert wird. Die Frage nach Regulationsmöglichkeiten von Cyclooxygenasehemmern auf Myofibroblasten-induzierte Wundheilungseffekte steht noch offen.

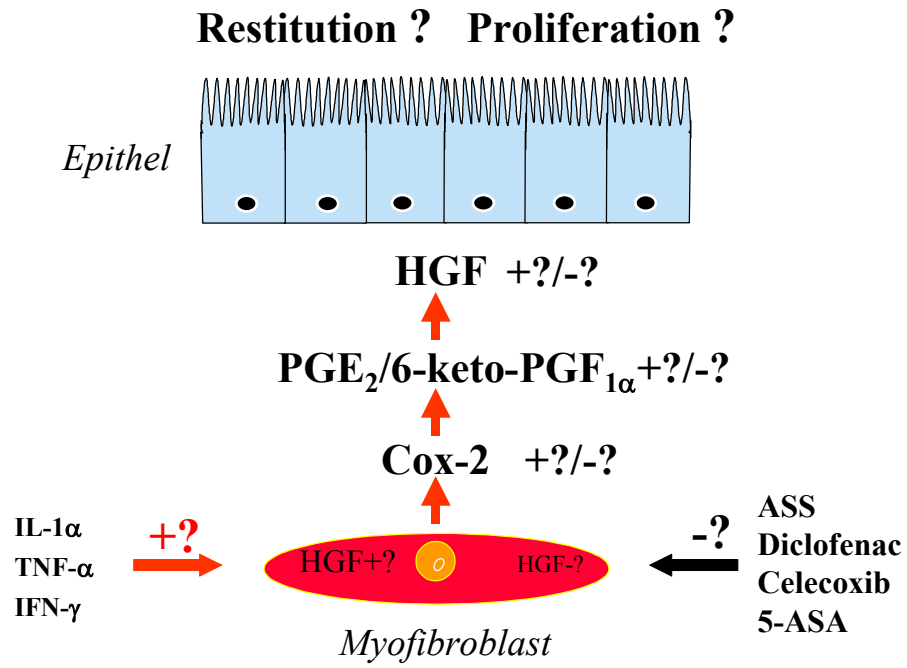


Abb. 3
Schematische Darstellung möglicher Einflussnahmen von NSAR auf Myofibroblasten-vermittelte wundheilungsfördernde Effekte.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit soll eine Methode zur Kultivierung von *primären* humanen intestinalen subepithelialen Myofibroblasten etabliert werden.

Es soll anschließend geklärt werden, ob die Proliferation und Restitution von Darmepithelzellen durch *primäre* intestinale subepitheliale Myofibroblasten via HGF moduliert wird.

In Expressionsanalysen soll untersucht werden, ob die HGF-Expression in intestinalen subepithelialen Myofibroblasten durch pro- und antiinflammatorische Zytokine differenziert reguliert wird.

Ferner soll analysiert werden, ob eine veränderte HGF-Expression in intestinalen Myofibroblasten mit einer Steigerung der epithelialen Proliferation und Restitution gekoppelt ist.

Durch selektive Inhibition von Signalkaskaden soll die Frage beantwortet werden, durch welche Signalkaskadewege HGF-regulierte Myofibroblasten-Effekte vermittelt werden.

Es soll untersucht werden, ob Myofibroblasten via HGF die Apoptose intestinaler Epithelzellen beeinflussen.

Auf die oben gestellten Fragen aufbauend, soll in einer *in vitro*-Studie untersucht werden, ob Cyclooxygenase-Inhibitoren (ASS, Diclofenac, Celecoxib und 5-ASA)

- a) - die HGF-Expression intestinaler Myofibroblasten,
- b) - die Prostaglandin-Synthese intestinaler Myofibroblasten,
- c) - die COX-2-Expression intestinaler Myofibroblasten

regulieren.

Funktionsuntersuchungen sollen zeigen, ob Cyclooxygenase-Inhibitoren die restitutions- und proliferationsfördernden Myofibroblasten-Effekte beeinflussen.

Abschließend soll analysiert werden, ob sich klassische NSAR von selektiven COX-2-Inhibitoren und von 5-ASA bezüglich der aufgeführten Fragepunkte unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Medien

2.1.1.1 Eukaryontische Zelllinien

Die Caco-2-Zelllinie ist eine adhärente Adenocarcinom Zelllinie, die aus humanem Kolon Epithel gewonnen wurde (Fogh et al., 1977). Die Zellen entwickeln nach Konfluenz Charakteristika einer Enterozyten-Differenzierung (ATCC, HTB-37).

Die primären humanen intestinalen subepithelialen Myofibroblasten (HISMF) stammen aus normalem Kolongewebe und werden nach einem modifizierten Protokoll nach (Mahida et al.1997) isoliert und immunhistochemisch charakterisiert.

2.1.1.2 Zellkultur-Reagenzien für Caco-2-Zellen und HISMF

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure [Dinatriumsalz-Dihydrat] (EDTA)	Merck, Darmstadt
Minimal-Essentiales Medium (Eagle) mit nicht essentiellen Aminosäuren und Eagle'BSS (MEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Fetales bovines Serum (FBS)	Life Technologies, Karlsruhe
Fungizone®	Life Technologies, Karlsruhe
L-Glutamin-Lösung	Life Technologies, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin-Lösung	Life Technologies, Karlsruhe

2.1.2 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.1.2.1 Verwendete Plasmide

HGF

Dieses Plasmid basiert auf dem Vektor pcR 2.1TM und enthält (in seiner multiple-cloning-site) eine Teilsequenz der humanen HGF cDNA. Mit EcoRI läßt sich aus diesem Plasmid ein 538 bp umfassendes cDNA-Fragment von HGF isolieren, welches nach radioaktiver Markierung mit ³²P CTP als Sonde für Northern Blot-Analysen verwendet wurde. (Göke et al., 1998)

β-Aktin

Dieses Plasmid basiert auf dem Vektor pBluescriptTM. Es enthält ein 250 bp cDNA β-Aktin-Fragment, welches mit dem Restriktionsenzymen KpmI und XbaI herausgeschnitten werden kann.

Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz.

Beide Fragmente werden als Sonden in Northern Blot-Analysen eingesetzt.

Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. C. Trautwein aus der Abteilung Gastroenterologie zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Chemikalien und Radionuklide

2.1.3.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa TM für Spülzwecke	Fresenius, Bad Homburg
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Butanol	J.T. Baker, Griesheim
Complete™ Mini Proteasen-Inhibitoren Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
dATP	Promega, Mannheim
dCTP	Promega, Mannheim
dGTP	Promega, Mannheim
Emulsifier-Safe™ (Szintillationsflüssigkeit zur Bestimmung der Aktivität radioaktiv markierter DNA-Sonden-bzw. Oligonukleotide)	ICN, Eschwege
dTTP	Promega, Mannheim
Essigsäure	J.T. Baker, Griesheim
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Farbreagenz für Proteinmessung (Dye reagent concentrate)	BioRad, München
Ficoll™ 400	Amersham, Freiburg
Formamid (deionisiert)	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	ICN, Eschwege
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Life Technologies, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat·Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt

di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-orthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet™ P40	Boehringer, Mannheim
Omniscript™ Reverse Transcriptase	Qiagen, Hilden
pcR 2.1™	Invitrogen, Groningen, Niederlande
PCR-Puffer (10x)	Life Technologies, Karlsruhe
Pefabloc™	Boehringer, Mannheim
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
TA cloning kit (pCR™ Vector)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Taq DNA Polymerase rekombinant	Life Technologies, Karlsruhe
TaqMan™ 1000 RXn Gold/Buffer A Pack	Perkin Elmer, Weiterstadt
TaqMan™ GAPDH Control Reagents	Perkin Elmer, Weiterstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween™ 20	Serva, Heidelberg

2.1.3.2 Radionuklide

[α- ³² P]-CTP	Amersham, Freiburg
Methyl-[³ H]-Thymidin, 1 mCi/ml (6,7 Ci/mmol)	ICN, Eschwege

2.1.4 Molekulargewichtsmarker

2.1.4.1 DNA-Marker

1 kb-Leiter

Life Technologies, Karlsruhe

50 b-Leiter

New England BioLabs, Schwalbach

2.1.4.2 Protein-Marker

Kaleidoscope Prestained Standards™

BioRad, München

Prestained SDS-Page standard low range

BioRad, München

2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen: Kpml, XbaI

New England Biolabs,
Schwalbach

T4-Kinase (Polynukleotid-Kinase)

New England Biolabs, Schwalbach

RNasin™

Promega, Mannheim

2.1.6 Antikörper

Esel IgG anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt
(Sekundäntikörper)

Amersham, Freiburg

Esel IgG anti-Ziege, Peroxidase-gekoppelt
(Sekundäntikörper)

Santa Cruz Biotechnology,
Heidelberg

Maus IgG2a anti-human Isotyp Kontrolle

Dianova, Hamburg

Maus IgM anti-human Isotyp Kontrolle	Dianova, Hamburg
Maus monoklonal IgG1 und IgG2a	Sigma, Deisenhofen
Anti-human Cytokeratin	
Maus monoklonal IgG1 anti-human HGF	R&D, Wiesbaden
Maus monoklonal IgG1 anti-human PI ₃ -Kinase p85a	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus monoklonal IgG2a Anti-human α -Smooth Muscle Actin	Sigma, Deisenhofen
Maus monoklonal IgM anti-human Vimentin	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen polyklonal IgG anti-human ERK 1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen polyklonal IgG anti-human ERK 2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen polyklonal IgG anti-human Akt	New England BioLabs, Schwalbach
Kaninchen polyklonal IgG anti-human Phospho-Akt	New England BioLabs, Schwalbach
Kaninchen polyklonal IgG anti-human Phospho-p44/42 MAP Kinase	New England BioLabs, Schwalbach
Schaf IgG anti-mouse, Peroxidase-gekoppelt (Sekundärantikörper)	Amersham, Freiburg
Ziege polyclonal IgG anti-human Aktin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.7 Zytokine

Rekombinanter humaner
Hepatozyten Wachstums-Faktor (HGF) R&D, Wiesbaden

Rekombinanter humaner
Tumor Nekrose-Faktor (TNF)- α R&D, Wiesbaden

Rekombinantes humanes Interferon (IFN) - γ R&D, Wiesbaden

Rekombinantes humanes Interleukin (IL)-1 α R&D, Wiesbaden

Rekombinantes humanes Interleukin (IL)-4 R&D, Wiesbaden

Rekombinanter humaner
Transforming Growth-Faktor (TGF)- β 1 R&D, Wiesbaden

2.1.8 Inhibitoren

LY294002 Calbiochem, Schwalbach
(2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)

Mitomycin C Sigma Deisenhofen

PD98059 (2-Amino-3-methoxyflavone) Calbiochem, Schwalbach

2.1.9 **Arzneistoffe**

Acetylsalicylsäure	Sigma, Deisenhofen
5-Aminosalicylsäure	Merckle GmbH, Ulm
Celecoxib	Pharmacia Corporation, St. Louis Missouri, USA
Diclofenac	Sigma, Deisenhofen

2.1.10 **Sonstige Materialien**

Agarose-Gel-Extraktions-Kit™, einschl. Silica-Gel-Partikel (QIAEX 2)™	Qiagen, Hilden
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} (Histon-ELISA)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Cell Scraper	Sarstedt, Nümbrecht
Centrifuge-Tubes, Ultra-Clear™	Beckman, München
Dako Pen™	DAKO Diagnostika, Hamburg
ECL-Detektions Kit™	NEN, Brüssel, Belgien
Filmkassette mit Verstärkerfolie	Amersham, Freiburg
Histostain™-Plus Kit	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
Imaging Plate	Fuji, Düsseldorf
Micro Amp™ Reaction Tubes	Perkin Elmer, Weiterstadt
MicroSpin Columns™	Amersham, Freiburg
3MM Filterpapier	Whatman, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
Nunc Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Nylonmembran für Northern Blot	Qiagen, Hilden
Nylonmembran Immobilon-P™ für Western Blot	Millipore, Eschborn

Omniscript™	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Quantikine™-HGF Elisa	R&D, Wiesbaden
Quarzküvetten	Hellma, Möllheim
Ready-To-Go-DNA Labelling Kit	Amersham, Freiburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilme (HyperfilmMP™)	Amersham, Freiburg
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt
Taq Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Zellkultur-Flaschen 5 ml mit Filter	Nunc-Life Technologies, Karlsruhe
Zellkultur-Schalen, Ø100mm	Corning Costar, Bodenheim
Zellkultur-Platten mit 24 Vertiefungen (24 well-Platten)	Greiner, Nürtingen
Zellkultur-Platten mit 6 Vertiefungen (6 well-Platten)	Greiner, Nürtingen

2.1.11 Geräte

Aufsatzkamera Progressive 3CCD (für Olympus Mikroskop)	Sony, Köln
Begasungsbrutschrank HERA cell	Heraeus, Hanau
β-Counter	Berthold, Hannover
Elektrophoresekammer, horizontal	Serva, Heidelberg
Elektrophoresekammer, vertikal	von Keutz, Reiskirchen
ELISA-reader Rain Bow Thermo	Tecan, Crailsheim
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsofen für Northern Blot	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührgerät	Jürgens-Omnilab, Hannover
Mikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Okular für Restitutionsassays	Olympus, Hamburg

pH-Meter MP220

Mettler-Toledo, Greifensee,
Schweiz

Schüttler für Bakterienkulturen

Edmund Bühler, Tübingen

Schwenkgerät (Red Rocker)

Amersham, Freiburg

Sonifiziergerät (Sonoplus-Ultraschall-Homogenisator)

Omnilab, Gehrden

Spannungsgeräte

Amersham, Freiburg

Spektralphotometer

MWG-Biotech AG, Ebersberg

Sterilarbeitsbank HERA safe

Heraeus, Hanau

TaqMan-Detektor ABI 7700™

Perkin Elmer, Weiterstadt

Transferkammer für Western Blot

BioRad, München

UV Stratalinker 1800™

Stratagene, Heidelberg

Vortex

Jürgens-Omnilab, Hannover

Wasserstrahlpumpe Plastibrand PP

Jürgens-Omnilab, Hannover

Waagen:

Feinwaage Mettler H20T

Mettler-Toledo, Greifensee,
Schweiz

Sartorius MC1

Sartorius, Göttingen

Zentrifugen:

Laborzentrifuge 2 K 15

Sigma, Deisenhofen

Laborzentrifuge GS-6R

Beckman, München

Tischzentrifuge

Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge 5417R

Eppendorf, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Die Kultivierung von Caco-2-Zellen erfolgt in 10 cm Zellkultur-Schalen mit 10 ml MEM Zellkultur-Medium (mit 20% FBS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin) bei 37 °C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank. Der Zellkultur-Mediumwechsel erfolgt alle drei Tage. Nach Erreichen der Zellkonfluenz werden die Zellen analog zu 2.2.1.2. geteilt. Hierbei wird eine 0,2%ige Trypsin enthaltene Versene-Lösung verwendet. Die Caco-2-Zellen lassen sich in einem Verhältnis von 1:7 teilen.

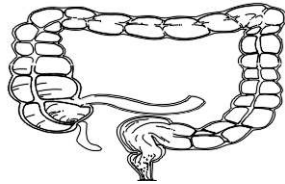
2.2.1.2 Isolation und Kultivierung primärer humaner intestinaler subepithelialer Myofibroblasten (HISMF)

Die Isolation primärer humaner intestinaler subepithelialer Myofibroblasten (HISMF) werden nach Modifikation eines Protokolls isoliert (Mahida et al., 1997).

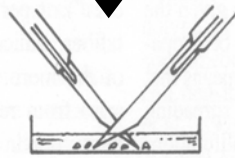
Normales humanes Kolongewebe, erhalten von Operationspräparaten, wird in HBSS aufgenommen. Die Mukosa des Kolongewebes wird von der Submukosa unter Zuhilfenahme eines Skalpells und einer Operationsschere abgetrennt und in etwa 5 mm große Stücke geschnitten, die mit HBSS gewaschen werden. Die Gewebestücke werden in 1 mM DTT (gelöst in HBSS) für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenker inkubiert und anschließend bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und mit DTT-freiem HBSS gewaschen. Der Waschvorgang mit HBSS wird zweimal wiederholt. Es folgt eine 30minütige Inkubation der Gewebestücke mit 1 mM EDTA-Lösung (gelöst in HBSS) bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 g werden die Gewebestücke dreimal, wie oben beschrieben, mit HBSS gewaschen. Die Inkubation mit EDTA mit anschließendem Waschen wird zweimal wiederholt. Die Behandlung mit DTT und EDTA bewirkt eine Ablösung der Epithelzellen, die durch die Waschschrte möglichst vollständig entfernt werden sollen. Die Kultivierung der Mukosastücke erfolgt in 5 ml

Zellkultur-Flaschen, die mit einem Filter am Deckel versehen sind, mit 5 ml MEM Zellkultur-Medium (mit 10% FBS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin, 2,5 µg/ml Fungizon) bei 37 °C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank. Der Zellkultur-Mediumwechsel erfolgt alle vier Tage. Nach drei bis fünf Tagen Kultivierung erscheinen die ersten Myofibroblasten. Nach weiteren fünf Tagen etablieren sich erste Kolonien von Myofibroblasten, die dann innerhalb von sieben Tagen zu einem konfluenten Monolayer wachsen. Nach Erreichen der Zellkonfluenz werden die Zellen an einer Sterilarbeitsbank auf mehrere Zellkultur-Schalen verteilt. Dazu wird nach Absaugen des Kulturmediums der Zellrasen zunächst einmal mit 1ml 0,1% Trypsin enthaltender Versene-Lösung (0,14 M NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ und 0,68 mM EDTA) gewaschen, woraufhin sich eine ca. 5minütige Inkubation der Zellen in 2 ml 0,1%Trypsin/Versene-Lösung im Brutschrank anschließt. Hierbei verlieren die Zellen ihre Adhärenz an den Boden der Zellkultur-Schale. Die Zellen werden durch mehrfaches Aufziehen in eine 5 ml-Pipette resuspendiert und mit frischem Zellkultur-Medium, welches nun kein Fungizon mehr enthält, im gewünschten Verhältnis (in der Regel 1:2) verdünnt und schließlich in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Die erhaltene primäre Myofibroblasten-Zelllinie kann bis zu zehnmal auf diese Weise passagiert werden.

Nachfolgendes Schema soll die einzelnen Isolationsschritte zusammengefasst veranschaulichen:



1. Spülen des
Kolonresektates mit HBSS



2. Zerkleinerung



3. Inkubation in 1 mM
EDTA und 1 mM DTT



4. Kultivierung intestinaler
Myofibroblasten



Abb. 4

Schematische Darstellung der Isolation primärer intestinaler subepithelialer Myofibroblasten

2.2.2 Immunhistochemische Charakterisierung von HISMF

In immunhistochemischen Verfahren werden Proteine in situ durch spezifische Antikörper und einer anschließenden Farbkomplexreaktion sichtbar gemacht.

Die immunhistochemische Reaktion wird auf Objektträgern durchgeführt. Um HISMF und Caco-2-Zellen gut auf Objektträgern zu fixieren, werden die Objektträger zuvor mit einer 0,5%igen 3-Aminopropyltriethoxysilan Acetonlösung 5 min beschichtet. Nach anschließendem Spülen in Aceton werden sie mit destilliertem Wasser gespült und bei Raumtemperatur getrocknet und später autoklaviert. Die autoklavierten Objektträger werden in 10 cm-Kulturschalen mit MEM-Medium gelegt und mit einer trypsinisierten Myofibroblasten-Zellsuspension beträufelt. Nach 3 Tagen sind die Myofibroblasten bzw. Caco-2-Zellen auf den Objektträgern adhärent zur Konfluenz gewachsen. Die Zellen werden in Aceton bei 4 °C für 10 min fixiert und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Für spätere immunhistochemische Versuche werden die Objektträger in Alufolie eingewickelt und bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.2.1 Immunhistochemische Färbung

Die Durchführung der immunhistochemischen Färbung erfolgt mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Histostain™-plus Kits gemäß den Angaben des Herstellers.

Zur Eingrenzung des Reaktionsfeldes auf dem Objektträger wird mit einem Dako-Fett-Stift ein im Durchmesser etwa 0,5 cm großer Kreis gezogen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, werden die Zellen in einer 1%igen BSA Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS-Tween (0,6% Tris Base; 0,9 % NaCl; 0,1% Tween; 37 mM HCl) für jeweils 5 min folgt die Inkubation des primären Antikörpers in der individuell benötigten Verdünnung bei 4 °C für 12 Stunden. Anti-Cytokeratin und anti-Desmin werden in einer Verdünnung von 1:100, anti- α -Smooth Muscle Actin und anti-Vimentin in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Die IgG2a Isotypkontrolle wird in einer Konzentration von 16,3 μ g/ml und die IgM Isotypkontrolle in einer Konzentration von 18,5 μ g/ml verwendet. Es folgen ein 5-minütiges Waschen in TBS-Tween und eine anschließende Inkubation des unverdünnten Sekundärantikörpers des Histostain™-plus Kits für 20 min. Es wird dann erneut der Objektträger für 5 min in TBS-Tween gewaschen und später mit einer Streptavidin-

Enzymkomplexlösung des Histostain™-plus Kits, die an den Sekundärantikörper bindet, versetzt. Nach erneutem 5-minütigen Waschen in TBS-Tween wird eine Farbstofflösung (D-Substratlösung AEC; Histostain™-plus Kit) verwendet. Bei positiver Reaktion färbt dieser die zu untersuchenden Proteine bräunlich-rot.

2.2.2.2 Hämalaun-Färbung

Für die Färbung der Zellkerne wird Mayers' Hämalaunlösung verwendet. Die Objektträger werden 2 s in die Fertiglösung getaucht und anschließend in fließendem Leitungswasser gespült. Die gefärbten Gewebeschnitte werden mit einem Tropfen Kaisers' Glyceringelatine benetzt und mit einem Deckgläschen versehen.

2.2.3 Protein-Untersuchungen

2.2.3.1 HGF-Protein-Untersuchungen im Zellkultur-Überstand

Unter Zuhilfenahme des Quantikine™-Kits kann humanes HGF quantitativ im Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden. Diesem Test liegt eine „Enzym-gekoppelte Immunsandwich-Technik“ (enzyme-linked-immunosorbent assay) [ELISA] zugrunde.

HISMF werden in 10 cm-Zellkultur-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% in MEM/10% FBS kultiviert. Die subkonfluenten Zellen werden anschließend mit 1xPBS gewaschen und 15 h in MEM/0,2% FBS kultiviert. Hierdurch soll eine Adaptation der Zellen an serumarme Kulturbedingungen erreicht werden. HISMF werden dann wahlweise mit Interleukin-1 α (IL-1 α), Tumor Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (INF- γ) sowie den Arzneistoffen Acetylsalicylsäure, 5-Aminosalicylsäure, Diclofenac und Celecoxib in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h inkubiert. Die Zellkultur-Überstände werden abgenommen und auf die Microtiterplatte des ELISAs, die mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet ist, zusammen mit entsprechenden Standardproben aufgetragen. Während einer 2-stündigen Inkubation wird HGF von dem an die Mikrotiterplatte gekoppelten Antikörper gebunden. Nicht gebundene Substanzen werden durch Waschen mit

einem Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe eines Enzym-gekoppelten polyklonalen Antikörpers entsteht während einer 105-minütigen Inkubation ein Antikörper-HGF-Antikörper-Komplex. Nach erneutem 4-maligen Waschen zur Entfernung von ungebundenen enzymgekoppelten Antikörpern schließt sich eine 30-minütige Inkubation mit einer Substrat-Lösung an, die eine Blaufärbung proportional zur HGF-Konzentration bewirkt. Nachdem die Farbreaktion durch eine Schwefelsäure enthaltende Stop-Lösung beendet wird, kann die Farbintensität und somit die HGF-Konzentration photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

2.2.3.2 Eicosanoid-Protein-Untersuchungen im Zellkultur-Überstand

Die Arachidonsäuremetabolite Prostaglandin-E₂ (PGE₂) und 6-keto-ProstaglandinF_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) können unter Zuhilfenahme eines kommerziell erhältlichen ELISA-Microtitertests quantitativ im Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden.

2.2.3.3 Gewinnung von Gesamtzell-Extrakten

HISMF werden zu Beginn des Experiments analog zu 2.2.3.1 kultiviert und mit den dort aufgeführten Substanzen 24 h inkubiert.

Zur Gewinnung der Gesamtzell-Extrakte werden die HISMF zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in einem Volumen von 600 µl PBS von den Schalen gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wird bei 4 °C 5 min bei 1000 g zentrifugiert und das Zellpellet in 200µl 1%iger SDS-Lösung resuspendiert. Die Lyse und Zerstörung der Zellwände und anschließende Homogenisierung der Protein-Suspension erfolgt mit Hilfe eines Sonifiziergerätes für 30 s.

Abschließend werden die Proteine bei 95 °C für 10 min. in einem Heizblock denaturiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wird der Überstand bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4 Bestimmung von Protein-Konzentrationen

2.2.3.4.1 Spektrophotometrische Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Protein-Konzentration eines Gesamtzellextraktes wird spektralphotometrisch bestimmt (Kalb und Bernlohr, 1977).

10 µl der Extrakte werden mit 490 µl dH₂O gemischt (1:50). Die Absorption wird bei 230 und 260 nm gemessen und gegen einen Nullwert, bestehend aus 10 µl einer 1%igen SDS Lösung und 490 µl dH₂O, abgeglichen. Die Protein-Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$(187 \times OD_{230} \times 50) - 81,7 \times OD_{260} \times 50 = X \mu\text{g/ml Protein}$$

Der Quotient aus OD₂₃₀ und OD₂₆₀ stellt ein Maß für die Verunreinigung des Gesamtzellextraktes mit DNA dar.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wird eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei werden die Proteine zuerst durch SDS-Behandlung denaturiert, in Polyanionen überführt und durch Elektrophorese aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte aufgetrennt.

Die Bestimmung der molekularen Größe einzelner Proteinbanden erfolgt durch direkten Vergleich mit einem kalibrierten Molekulargewichtsstandard.

8 µg Proteinlösung werden mit destilliertem Wasser auf ein einheitliches Volumen gebracht, mit 10 µl 3 x SDS-Auftragspuffer (150 mM Tris, 6% SDS, 15 mM DTT, 30% Glycerol 0,25% Bromphenolblau) versetzt und bei 95 °C 5 min erhitzt. Die Ansätze sowie 5 µl eines Molekulargewichtsstandards werden auf ein 5%iges Sammelgel (5% Acrylamid, 125 mM Tris•Cl, pH 6,8, 0,1% APS, 0,1% TEMED) aufgetragen und einer konstanten Spannung von 130 V in 1xSDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, pH 8,8) ausgesetzt. Die Spannung wird nach Eintritt der Bromphenolblau-Lauffront in das 10%ige Trenngel (10% Acrylamid, 375 mM Tris•Cl, pH 8,8, 0,1% APS, 0,1% TEMED) auf 200V erhöht. Die

Elektrophorese wird beendet, wenn die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hat. Nach Beendigung der Elektrophorese kann das Gel z.B. für Western Blot-Analysen verwendet werden.

2.2.3.6. Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis einzelner Proteine in einem Proteingemisch. Zuvor elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden unter elektrischer Spannung im nassen Milieu auf eine Nylonmembran transferiert (Lämmli et al., 1970).

Zur Detektion des zu untersuchenden Proteins wird ein spezifischer Primärantikörper verwendet, an den sich wiederum ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Antikörper anlagert. In einer Licht emittierenden Peroxidase-Reaktion (Chemolumineszenz) werden die spezifischen Proteinbanden auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

Die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden in einer Standard-Nassblotkammer auf eine Nylonmembran, die zuvor für 30 s jeweils in Methanol und anschließend in Wasser benetzt wird, transferiert. Der Proteintransfer im Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% Methanol, pH 8,3) erfolgt bei 4 °C über Nacht bei einer Spannung von konstant 20V. Nach Beendigung des Proteintransfers folgt eine 1-stündige Inkubation der Membran in 5%iger Magermilchpulverlösung in Waschpuffer (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3,8 mM HCl, 0,3% Tween 20, pH 7,6) bei Raumtemperatur. Nach kurzem Waschen in TBS-Tween wird die Membran 60 min mit dem spezifischen primären Antikörper, der individuell unterschiedlich in Waschpuffer verdünnt wird (für ERK1/2 1:750, für Phospho MAP-Kinase, für PI₃ und β-Actin 1:1000), inkubiert. Es schließt sich dreimaliges Waschen (2x10 und 1x5 min) der Membran und die Zugabe des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers über einen Zeitraum von einer h mit einer 1:10000- bzw. 1:20000-Verdünnung an. Nach erneutem mehrmaligen Waschen (2x10 und 1x5 min) wird der Blot anschließend mit dem Substratansatz des ECL-Detektions Kits gemäß den Angaben des Herstellers entwickelt. Die durch die Peroxidase-Reaktion emittierten Lichtsignale werden auf einem Röntgenfilm aufgefangen.

Die Nylonmembran kann nach erfolgter Proteindetektion durch eine 30-minütige Inkubation mit Stripping-Puffer pH 6,7 (65,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol) bei 70 °C von den Antikörpern befreit und anschließend erneut zum Nachweis eines weiteren Proteins verwendet werden.

2.2.4 Ribonukleinsäure (RNA)-Untersuchungen

2.2.4.1 Isolation von Gesamt-mRNA aus Zellen

Zur Isolation von Gesamt-mRNA aus Zellen wird ein RNeasy Mini Kit™ verwendet. Die folgenden Versuchsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

HISMF werden initial analog zu 2.2.3.1 kultiviert. Nach Absaugen des Zellkultur-Mediums werden die Zellen zunächst zweimal mit jeweils 5 ml 1xPBS gewaschen. Nach dreiminütiger Inkubation des Guanidinium-Isothiocyanat, 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol, 1 µl/ml DTT und 1 µl/ml RNasin® enthaltenden Lysepuffers werden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkultur-Schale abgelöst. Nach Homogenisierung der Proben folgt die Zugabe von 70%igem Isopropanol, wodurch geeignete Bedingungen zur Bindung der Proben-RNA an die Silica-Gel-Membran der Zentrifugationssäule geschaffen werden. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit unterschiedlichen Waschpuffern zur Entfernung von Verunreinigungen wird die Gesamt-mRNA in RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wird mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der spezifische RNA-Faktor beträgt 40, d.h. bei einer gemessenen Extinktion von 1 bei 260 nm liegt eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml vor. Die RNA-Konzentration der Probe (in µg/ml) entspricht dem Produkt aus der Extinktion (260 nm), dem Verdünnungsfaktor und dem spezifischen RNA-Faktor (40). Die Reinheit der RNA errechnet sich aus dem Quotienten der bei 260 nm und bei 280 nm gemessenen Extinktion (Maniatis et al. 1982).

2.2.4.3 Northern Blot

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA mit nachfolgendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wird als Northern Blot bezeichnet und dient dem Nachweis spezifischer RNA-Moleküle. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten denaturierten cDNA Sonden, die der gesuchten RNA komplementär sind, können durch Autoradiographie die gesuchten RNA-Fragmente spezifisch sichtbar und nachgewiesen werden.

2.2.4.3.1 RNA-Gelelektrophorese

Um RNA gelelektrophoretisch aufzutrennen, wird ein 1%iges Agarose-Gel mit 1xMOPS-Puffer (0,02 M MOPS, 5mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8) verwendet.

Von den zuvor gemessenen RNA-Proben werden jeweils 10 µg eingesetzt. Sie werden mit RNase-freiem Wasser (Ampuwa®) auf ein jeweils gleiches Volumen gebracht und mit 1/5 Volumen 5xRNA-Ladepuffer (4 mM EDTA, pH 8, 0,22 M Formaldehyd, 20% Glycerol, 30% deionisiertes Formamid, 4xMOPS-Puffer, 0,25% Bromphenolblau) versetzt. Es schließt sich eine 10-minütige Inkubation der Proben bei 68 °C an. Nach Zugabe von 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) werden die Proben in dem vorbereiteten Agarosegel bei 100-150V elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer mit 1xMOPS-Puffer). Auftragsgleichmäßigkeit, die Auftrennungsgenauigkeit und Reinheit der RNA lassen sich anschließend unter UV-Licht abschätzen.

2.2.4.3.2 Kapillarblot

In diesem Abschnitt wird der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten RNA vom Gel auf eine Nylonmembran beschrieben. Die Nylonmembran und das RNA-Gel werden kurz in RNase-freiem Wasser und dann 15 Minuten in 10xSSC, pH 8 (1,5 M NaCl, 0,15 M tri-Natriumcitrat·Dihydrat) für 15 Minuten geschwenkt.

Folgender Blot wird aufgebaut (von oben nach unten):

- Gewicht (ca. 600g)
- Glasplatte
- 50 Saugtücher aus Cellulose
- 2 Whatman-Filter (gleiche Größe wie Gel und Nylonmembran; angefeuchtet in 2xSSC-Puffer)
- Nylonmembran (hat gleiche Größe wie das Gel)
- RNA-Gel (Beladungstaschen des Gels zeigen nach unten)
- 2 Whatman-Filter, die in eine mit 2xSSC-Puffer gefüllte Schale hineinhängen
- Glasplatte
- Schale gefüllt mit 2x SSC-Puffer

Der RNA-Transfer findet über Nacht (ca. 16 h) bei Raumtemperatur statt. Die anschließende Hybridisierung wird analog zu 2.2.4.3.5 durchgeführt.

2.2.4.3.3 Isolierung und radioaktive Markierung von DNA-Sonden

DNA-Fragmente, welche für eine Hybridisierungsreaktion verwendet werden sollen, werden mit geeigneten Restriktionsenzymen aus den in Kapitel 2.1.2.1 beschriebenen Plasmiden herausgeschnitten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe eines Qiagen-Gel-Extraktionskits aufgereinigt. Die cDNA-Fragmente werden nach radioaktiver Markierung (2.2.4.3.4) für Northern Blot-Hybridisierungen (2.2.4.3.5) verwendet.

2.2.4.3.4 Radioaktive Markierung von DNA mit Random-Primern

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wird mit Hilfe des Ready•To•Go-DNA Labelling Kits durchgeführt. An die im TE-Puffer (pH 8) gelöste denaturierte Einzelstrang-DNA (25-50 ng) lagern sich Random-Oligomere an. Diese dienen als Primer und ermöglichen der DNA-Polymerase II (Klenow-Enzym) das Auffüllen der zwischen ihnen liegenden Bereiche mit Nukleotiden. Bei dieser sich über 60 min bei 37 °C erstreckenden Reaktion wird radioaktiv markiertes [α -³²P]-dCTP verwendet. Es entstehen somit DNA-Doppelstränge,

deren Radioaktivität nach Reinigung durch Zentrifugation in einer MicroSpin-Column im β -Counter bestimmt wird.

2.2.4.3.5. Hybridisierung

Die Trägermembran wird 20 min zwischen zwei Whatman-Filtern getrocknet. Die auf der Nylonmembran fixierte RNA wird mit Hilfe eines UV-Crosslinkers kovalent an die Nylonmembran gebunden. Die Membran wird mit einer radioaktiv markierten denaturierten cDNA-Sonde mit einer Aktivität von 10^7 cpm (Kap. 2.2.3.4) in Church-Lösung (0,25 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA, pH 8) über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Es folgt sechsmaliges Waschen mit Church-Waschlösung (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7,2, 1 % SDS) bei 65 °C um die Hybridisierungslösung und nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen. Abschließend wird mit Hilfe eines Phosphoimagers ein Autoradiogramm angefertigt, mit dem eine Quantifizierung möglich ist. Hierzu wird das Programm PC-Bas verwendet.

2.2.4.4 TaqMan™ PCR: Quantifizierung von COX-2 mRNA-Expression

Die TaqMan™ PCR beruht auf der in den 80er Jahren entwickelten Polymerase Kettenreaktion (PCR), eine sehr sensitive enzymatische Methode, bei der eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz durch sich wiederholende Zyklen mit Hilfe von spezifischen Primern *in vitro* erreicht wird. Die Taq-Man™PCR zeichnet sich darüber hinaus dadurch aus, dass die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht wird, was mit einer Automatisierung der PCR, mit geringerem Zeitaufwand, geringerem Reagenzienverbrauch und einer geringeren Gefahr einer Kontamination verbunden ist. Zur Detektion wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, so dass mit Hilfe des ABI PRISM Sequence Detektors die Veränderung der Fluoreszenzen im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst werden kann.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt analog zu 2.2.4.1. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben. Um eventuell vorhandene Verunreinigungen an DNA zu entfernen, wird die in Ampuwa gelöste RNA mit RNase freier

DNase für 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird die RNA mit Hilfe von Reverse Transkriptase-gekoppelter PCR (RT-PCR) in DNA quantitativ umgeschrieben. Hierzu wird das kommerziell zu erwerbende Transkriptase-Omniscript™ verwendet. Zur Überprüfung des Erfolgs der Transkription wird eine PCR mit den für eine spätere TaqMan™ PCR einzusetzenden humanen COX-2 Primern durchgeführt. Folgende Oligonukleotid-Primer werden verwendet: forward: 5'-GCC CTT CCT GTG CC-3'; reverse: 5'-AAT CAG GAA GCT TTT TAC-3'. Es werden für die PCR folgende Bedingungen eingehalten: 1. 95 °C 15 min, 2. 95 °C 15 s, 3. 53 °C 30 s, 4. 72 °C 30 s, 5. 72 °C 2 min, 6. 15 °C; die Punkte 2. bis 5. werden jeweils 37 mal wiederholt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden in einem 4%igen Agarose Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch nach Fragmentgröße aufgetrennt. Die zu erwartende Fragmentgröße wird durch eine mitlaufende Basenpaarleiter bestätigt.

Für die nun folgende TaqMan™ PCR wird neben den oben aufgeführten Primern folgende 5'-6-carboxyfluorescein (FAM) markierte Sonde eingesetzt: (FAM) 5'-ATG ATT GCC CGA CTC CCT TGG GGT GT-3'. Für die PCR-Reaktion wird ein Gesamtvolumen von 25 µl verwendet, das aus 200 nM beider Primer, 100 nM Sonde, 300 µM dNTPs, 3,5 mM MgCl₂, 2,5 U Taq-Polymerase und einem PCR-Puffer (50 mM N,N'-bis(2-Hydroxyethyl)glycin (Bicine), 125 mM Kaliumacetat, 10 µM EDTA, 8% Glycerol, pH 8.2) besteht. Die Amplifikation und Detection erfolgt nach folgendem Profil: 50 °C 2 min, 60 °C 30 min, 95 °C 5 min, 45 Zyklen 95 °C 15 s. Und 60 °C 1 min an einem ABI 7700 Detektor. Als interner Standard dient die mit 2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein (JOE) markierte humane Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) Sonde mit folgender Sequenz: JOE-5'-CCG ACT CTT GCC CTT CGA AC-3'. Als GAPDH Primer werden forward: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA-3'; und reverse: 5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' verwendet. Die Quantifizierung erfolgt über eine $\Delta\Delta C_T$ -Methode (PE Applied Biosystems, User Bulletin #2, ABI Prism 7700 SDS, 1997).

2.2.5 Funktionsuntersuchungen

2.2.5.1 Restitutionsassays

Methode nach Sato und Rifkin 1990, modifiziert nach Ciacci (1993), Göke (1998) und Rosenberg, 1997.

In einem Restitutionsassay wird die Migration von Darmepithelzellen unter serumarmen Kulturbedingungen *in vitro* untersucht.

Caco-2-Zellen werden dazu in 6-well Zellkultur-Schalen ausgesät und bis zur Konfluenz in MEM/20% FBS kultiviert. Die konfluenten Zellen werden anschließend mit 1xPBS gewaschen und 15 h in MEM/0,2% FBS kultiviert. Der Zellrasen wird mit einer sterilen 100 µl Pipettenspitze, die einen Spitzengrößendurchmesser von 1 mm hat, verwundet. Hierzu werden vor Verwundung außen auf den Kulturschalenboden 4 parallele Linien gezeichnet. Jeweils senkrecht zu diesen vier Linien werden mit der Pipettenspitze mechanische Standardwunden in den Zellrasen eingebracht, so dass visuell ein Gitter mit 16 markierten Kreuzungspunkten als definierte Abschnitte für die Analyse der Zellmigration entsteht. Die Kulturmedien der verwundeten Caco-2-Zellen werden durch Kultur-Überstände von zuvor 24 h stimulierten und unstimulierten HISMF ersetzt. Um die sich eventuell überlagernden Proliferationseffekte auszuschalten, werden in einem Zusatzexperiment HISMF-Überstände für 4 h mit Mitomycin C (2 µg/ml), einem etablierten Spindelinhistor, der Zellen in der M-Phase arretiert, versetzt. Unmittelbar nach Zugabe der Kultur-Überstände der Myofibroblasten und ggf. anderer Stimuli auf die Caco-2-Zellen wird unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung mit Hilfe eines skalierten Okulars die Distanz der Wundränder in µm zum Zeitpunkt Null festgestellt. Nach 8 und 24 h Inkubation der Caco-2-Zellen mit den Myofibroblasten-Überständen im Brutschrank bei 37 °C wird die nun verminderte Wundungsgröße festgehalten. Die Verkleinerung der Distanz der Wundränder nach 8 h bzw. 24 h im Vergleich zum Zeitpunkt „0“ gibt die Migrationsstrecke in µm an. Bildet man den Quotienten aus Migrationsstrecke zur Migrationszeitdauer und dividiert diesen Wert anschließend durch 2 (da die Migration von 2 Seiten erfolgt), so erhält man die Migrationsgeschwindigkeit in µm/h. Untereinander lassen sich diese Werte vergleichen.

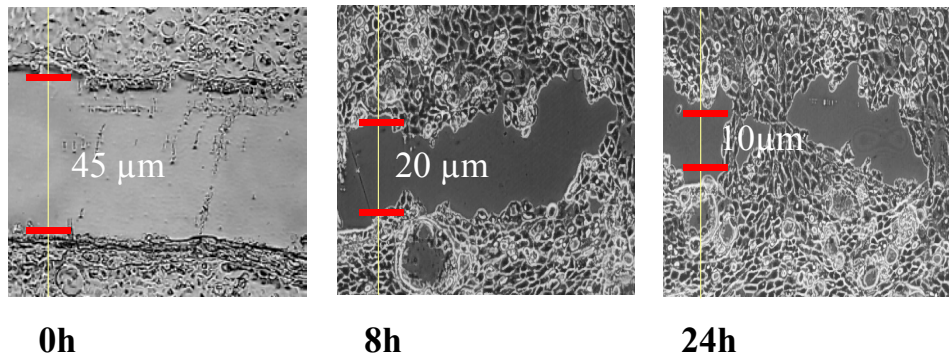


Abb. 5
Photographisches Schema eines Restitutionsassays

2.2.5.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels [³H]-Thymidineinbau in DNA

Methode nach Weiser et al. (1973) und Göke et al. (1998)

Die DNA-Neusynthese von Zellen kann durch Messung der [³H]-Thymidininkorporation quantifiziert werden und lässt so Rückschlüsse auf das Ausmaß der Zell-Proliferation zu.

Caco-2-Zellen werden in 24-well Zellkultur-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 60% in MEM/20% FBS kultiviert. Die Caco-2-Zellen und HISMF werden initial analog zu 2.2.3.1 und 2.2.5.1 kultiviert und stimuliert. Es erfolgt eine 28-stündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit den Überständen stimulierter HISMF bei 37 °C im Begasungsbrutschrank. In den letzten 4 Inkubationsstunden wird zu jeder 24 well Schale zusätzlich 1,5 μCi [³H]-Thymidin gegeben. Anschließend werden die Zellen zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen

und mit Methanol/Essigsäure im Verhältnis 3:1 (Vol/Vol) für 60 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen werden dann durch Zugabe von 1N NaOH für mindestens 30 min bei Raumtemperatur lysiert und in Szintillationsgefäße, die anschließend mit Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt werden, überführt. Nach Aufschütteln der Proben zur möglichst gleichmäßigen Resuspendierung der lysierten Zellen, folgt die Thymidin-incorporationsmessung, die in einem Szintillationszähler durchgeführt wird. Die erhaltenen Messwerte in [cpm] sind dem [³H]-Thymidineinbau direkt proportional.

2.2.5.3 Quantifizierung der Apoptose mittels Histon-ELISA

Während der Apoptose werden endogene Endonukleasen in der Zelle aktiviert, welche die chromosomale DNA „verdauen“. Die DNA ist nur an den sogenannten „Linker“-Bereichen für diese Enzyme zugänglich. An den Nukleosomen bildet die DNA mit den Kernhistonen enge Komplexe; daher ist sie hier vor dem Angriff der Endonukleasen geschützt. Die Spaltung der DNA findet in den internukleosomalen DNA-Abschnitten statt. Es entstehen so 180 Bp-große Mono- und Oligonukleosomen, die noch die schützenden Core-Histone enthalten. Im Cell Death Detection ELISA Kit werden diese Fragmente in einem speziellen Sandwich-Verfahren nachgewiesen. Ein Biotin-gekoppelter anti-Histon-Antikörper bindet die Partikel an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Der spezifische Nachweis der DNA erfolgt mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-DNA-Antikörper.

Caco-2-Zellen werden in 24 well Zellkultur-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 60% in MEM/10% FBS kultiviert. Anschließend werden die Caco-2-Zellen und HISMF analog zu 2.2.3.1 und 2.2.5.1 kultiviert und stimuliert. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubation werden die Zellen in 200 µl des Lysepuffers 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 800g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und 1:10 verdünnt. 20 µl dieses Ansatzes werden in jedes „well“ einer beschichteten Mikrotiterplatte gegeben, wobei für jede Probe Dreifachmessungen durchgeführt werden. In jedes „well“ wird 80 µl Immunoagens-Mix (4 µl anti-Histon-Antikörper, 4 µl anti-DNA-Antikörper, 72 µl Inkubationspuffer) gegeben. Der Ansatz wird anschließend 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Während der Inkubationszeit bindet der anti-Histon-Antikörper an die Histonkomponente der in den Proben vorhandenen Nukleosomen. Der so entstandene Immunkomplex wird über den Biotinteil am anti-Histon-Biotin-Antikörper an die

Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Zusätzlich bindet der anti-DNA-Peroxidase-Antikörper an die DNA-Komponente der Nucleosomen.

Die Platte wird 3 x mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe von 100 µl 2,2'-Azino-di[ethylbenzthiazolin-sulfonat] (ABTS[®]) als Substrat wird der Anteil an freien Nucleosomen mittels der in den Immunkomplexen vorhandenen Peroxidase bestimmt. Nach 5 min Inkubationszeit wird der Substratumsatz durch Messung der Extinktionen am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt. Dabei ist die gemessene Absorption der Menge an freien Nucleosomen in der Probe direkt proportional und liefert einen relativen Wert für die Apoptoserate im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.

2.2.6 Plasmidisolation

2.2.6.1 DNA-Minipräparation

Die Methode der DNA-Minipräparation ermöglicht die Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen. 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur (Kap. 2.2.3.1) werden in ein Eppendorfgefäß gefüllt und zwei min bei 18000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Bakterien-Pellet zur Lyse mit 300 µl STET-Puffer (8% Sucrose, 0,5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris•Cl, pH 8) und 10 µl Lysozym (10mg/ml) versetzt, resuspendiert und 1 min bei 95 °C erhitzt. Es schließt sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 21500g und 4 °C an. Im Überstand befindet sich nun die Plasmid-DNA, die mit 400 µl Isopropanol über 10 min bei Raumtemperatur gefällt wird, während das entstandene Pellet zuvor mit einer Pipettenspitze entfernt wurde. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation bei 21500g und 4 °C wird das Plasmid-DNA-Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgt eine letzte Zentrifugation (21000g, 4 °C, 10 min). Nach Absaugen des Überstandes und einer etwa 30-minütigen Lufttrocknung bei Raumtemperatur wird das Plasmid-DNA-Pellet in 50µl TE-Puffer, pH 8 (10 mM Tris•Cl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgt bei -20 °C.

2.2.6.2 DNA-Maxipräparation

Die DNA-Maxipräparation wird mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit durchgeführt und dient der Isolierung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA.

Nach Pelletierung der Bakterien werden die Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen lysiert. Die nach Zentrifugation gewonnene Plasmid-DNA wird daraufhin auf eine Anionenaustauschersäule gegeben und dort durch mehrmaliges Waschen mit Puffern verschiedener Salzkonzentrationen von Verunreinigungen (z. B. durch RNA oder Proteine) befreit. Es folgen die Elution und die Fällung der Plasmid-DNA mit Isopropanol. Nach Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol und anschließender Lufttrocknung wird das DNA-Pellet in TE-Puffer, pH 8 aufgenommen und kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgt im Spektralphotometer. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Als Maß zur Bestimmung der Reinheit der DNA dient der Quotient aus den Extinktionen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

2.2.6.3 Restriktionsenzymverdau der Plasmide

Zur Isolierung von DNA-Sonden für Northern Blot-Analysen werden die entsprechenden Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Dabei wird für $1\mu\text{g}$ zu verdauende DNA mindestens 1U Enzym eingesetzt. Der Restriktionsansatz wird für mindestens 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.2.7 Statistische Analyse

Für jede experimentelle Bedingung wird aus jeweils mindestens drei Einzelwerten ein arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) sowie der dazugehörige Standardfehler ($\pm\text{SEM} = \text{Standard Error of the Mean}$) ermittelt. Die Ergebnisse sind graphisch in einem Säulendiagramm dargestellt. Zur Evaluation der statistischen Signifikanz wird der Wilcoxon-Test (syn. Mann-Whitney-U-Test) für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben eingesetzt (Mendenhall, 1987). Unterschiede zwischen Stichproben verschiedener Gruppen werden bei P-Werten $< 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Isolation primärer humaner intestinaler subepithelialer Myofibroblasten (HISMF)

Für die Durchführung der nachfolgenden Experimente werden primäre humane intestinale subepitheliale Myofibroblasten (HISMF) verwendet, die zuvor aus humanen Kolon-Resektaten, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, isoliert werden. In den Abbildungen 6 A-D sind isolierte primäre Myofibroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Isolation zu sehen.

Abb. 6A zeigt Mukosa Gewebe, das sich seit etwa 4 Tagen in Kultur befindet. An den Randbereichen des Mukosa Gewebes lassen sich erste Zellen mit spindelförmigem Fibroblasten-typischen Phänotyp erkennen, die seitlich aus dem Gewebe herauszuwachsen scheinen. Nach weiteren etwa 3 Tagen Kultivierung werden auch außerhalb des Mukosagewebes erste spindelförmige Zellen sichtbar (Abb. 6 B). Nach etwa 10 Tagen etablieren sich erste Fibroblasten-typische-Zellkolonien (Abb. 6 C), die dann innerhalb von sieben Tagen zu einem konfluenten Monolayer wachsen (Abbildung 6 D).

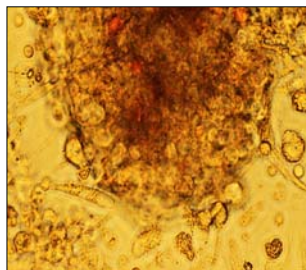


Abb. 6 A



Abb. 6 B

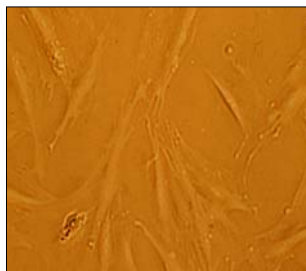


Abb. 6 C

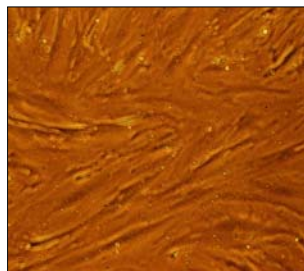


Abb. 6 D

Abb. 6 A-D

Photographische Abbildungen einer HISMF-Primärkultur.

3.2 Charakterisierung der HISMF

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen werden diese immunhistochemisch auf spezifische Zell-Marker untersucht. Hierbei werden die isolierten Zellen auf die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin (Abb. 7 A₁) und des Myofibroblasten-typischen Markers α -Smooth-Muscle Actin (Abb. 7 C₁) untersucht, die wie erwartet positiv getestet werden. Zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen auf epitheliale Cytokeratine erbringen einen negativen Befund (Abb. 7 B₁). Als Negativkontrollen für Vimentin und α -Smooth-Muscle-Actin dienen Isotypkontrollen für IgM (Abb. 7 A₂) bzw. IgG2a (Abb. 7 C₂). Die epitheliale Zelllinie Caco-2 wird als Positivkontrolle für epitheliale Cytokeratine verwendet (Abb. 7 B₂). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7 A-C dargestellt; verwendete Konzentrationen sind in 2.2.2.1 aufgeführt.

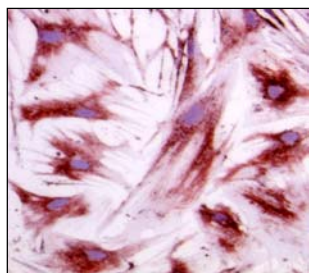


Abb. 7 A₁
Vimentin

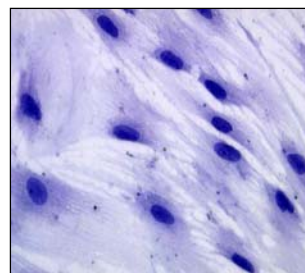


Abb. 7 A₂
Negativkontrolle: Isotypkontrolle IgM

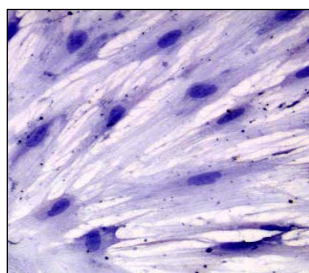


Abb. 7 B₁
Cytokeratin

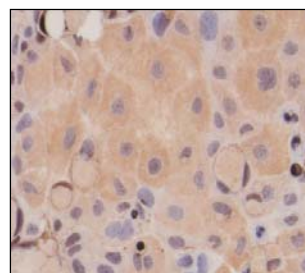


Abb. 7 B₂
Positivkontrolle: Caco-2

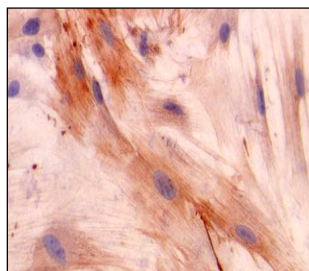


Abb. 7 C₁
 α -Smooth-Muscle- Actin

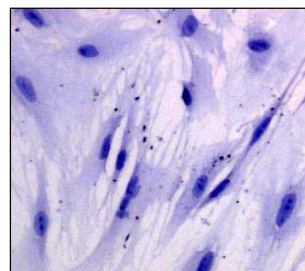


Abb. 7 C₂
Negativkontrolle: Isotypkontrolle IgG2a

Abb. 7 A-C
Immunhistochemische Färbungen zur Charakterisierung von HISMF.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass die isolierten Zellen nicht nur phänotypisch das spindelförmige Aussehen von Fibroblasten haben, sondern aufgrund des oben dargestellten Expressionsmusters Myofibroblasten-typische Charakteristika aufweisen. Mit diesen Zellen werden alle im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

3.3 Untersuchungen zur Expression des Wachstumsfaktors HGF

3.3.1 Zytokine modulieren die HGF-Protein-Expression in HISMF-Kulturüberständen

In nachfolgenden Untersuchungen wird geprüft, welchen Einfluss pro- und anti-inflammatorische Zytokine auf die HGF-Konzentration im Überstand primärer intestinaler Myofibroblasten des Darms hat. Hierzu wird ein quantitativ auswertbarer HGF-ELISA verwendet.

HISMF werden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% in MEM/10% FBS kultiviert. Die Zellen werden anschließend mit 1xPBS gewaschen und für weitere 15 h im serumarmen Medium (MEM/0,2% FBS) kultiviert. Es schließt sich eine 24-stündige Stimulation der HISMF mit IL-1 α , TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-4 und TGF- β 1 in unterschiedlichen Konzentrationen an. Als Kontrollen dienen unstimulierte HISMF. In Abb. 8 wird die HGF-Konzentration in Relation zu unstimulierten HISMF dargestellt. Die Ausgangskonzentration von HGF in unstimulierten HISMF liegt bei etwa 800 pg/ml. Es zeigt sich, dass TNF- α die HGF Konzentration in HISMF-Überständen um den Faktor 4 ($c\cong 3200$ pg/ml), IL-1 α um den Faktor 3,5 ($c\cong 2800$ pg/ml) und IFN- γ um den Faktor 1,6 ($c\cong 1280$ pg/ml) erhöht. Demgegenüber hat IL-6, aber auch IL-4 und TGF- β 1, keinen signifikanten Einfluss auf die HGF-Konzentration.

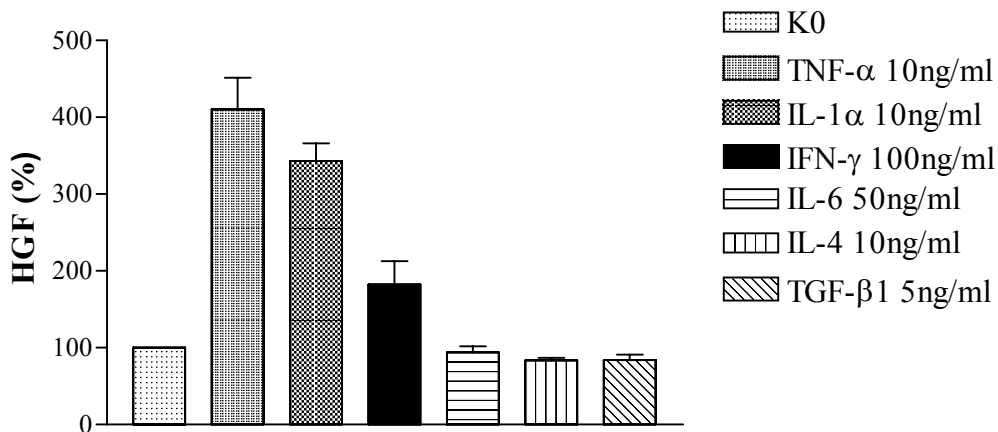


Abb. 8

Effekte von Zytokinen auf die HGF-Konzentration (in % der Konzentration unstimulierter Zellen) im Überstand von HISMF, gemessen mit ELISA-Technik. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , TNF- α und IFN- γ steigern die HGF-Konzentration, während IL-6, IL-4 und TGF β 1 keine signifikante Modulation bewirken.

3.3.2 HGF mRNA-Expression wird dosisabhängig durch Zytokine moduliert

Zur Analyse einer möglichen HGF mRNA-Modulation in HISMF durch pro- und antiinflammatorische Zytokine werden HISMF analog zu 3.3.1 kultiviert. Es schließt sich eine 9-stündige Inkubation mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 α , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 und HGF an. Als Kontrollen dienen unstimulierte HISMF. Nach Isolation der Gesamt-RNA nach 2.2.4.1 und RNA-Konzentrationsbestimmung analog zu 2.2.4.2, erfolgt die Bestimmung der HGF mRNA-Expression mittels Northern-Blot-Technik. Die HGF mRNA-Signalintensität wird jeweils durch Vergleich mit der β -Aktin-Expression validiert und zeigt eine gleichmäßige Beladung der RNA.

Abb. 9 veranschaulicht dosisabhängige Zytokineffekte auf die steady-state mRNA-Expression von HGF in HISMF.

Die HGF steady-state mRNA-Expression steigt nach Inkubation mit IL-1 α mit höher werdenden Konzentrationen an, mit einem Maximum bei 0,5 ng/ml. Bei weiter steigenden IL-1 α Konzentrationen nimmt die mRNA-Expression wieder leicht ab.

Auch durch die Inkubation der HISMF mit TNF- α wird die HGF mRNA-Expression gesteigert. Die HGF steady-state mRNA-Expression steigt mit höher werdender

Konzentration bis 5 ng/ml an (Steigerung densitometrisch um den Faktor 3,2) und bleibt bei höheren Konzentrationen konstant.

Eine ähnlich deutliche Steigerung der HGF mRNA-Expression wird nach Stimulation mit IFN- γ festgestellt. Die HGF mRNA-Expression steigt mit höher werdender Konzentration von IFN- γ bis 200ng/ml stetig an (max. Steigerung um den Faktor 2,5).

Demgegenüber konnte nach Stimulation mit IL-6 keine signifikante Beeinflussung der HGF mRNA-Expression in HISMF-Zellen eruiert werden.

Im Gegensatz zu den steigernden Effekten der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , TNF- α und IFN- γ wurden nach Stimulation mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-4 reduzierende Effekte auf die HGF mRNA-Expression beobachtet. Mit höher werdender Konzentration von IL-4 wird die HGF mRNA-Expression in HISMF gesenkt (um Faktor 2,5 bei IL-4 c=50 ng/ml).

Parallel zu der IL-4 Zytokinregulation bewirkt auch eine TGF- β 1-Stimulation der HISMF-Zellen eine dosisabhängige Hemmung der HGF mRNA-Expression. Mit höher werdender Konzentration von TGF- β 1 wird die HGF steady-state mRNA-Expression erheblich vermindert (um Faktor 6 bei TGF- β 1; c=50 ng/ml).

Untersuchungen zum Eigeneffekt von HGF auf die HGF mRNA-Expression zeigen auch nach Variation der HGF-Konzentration keine signifikante Beeinflussung.

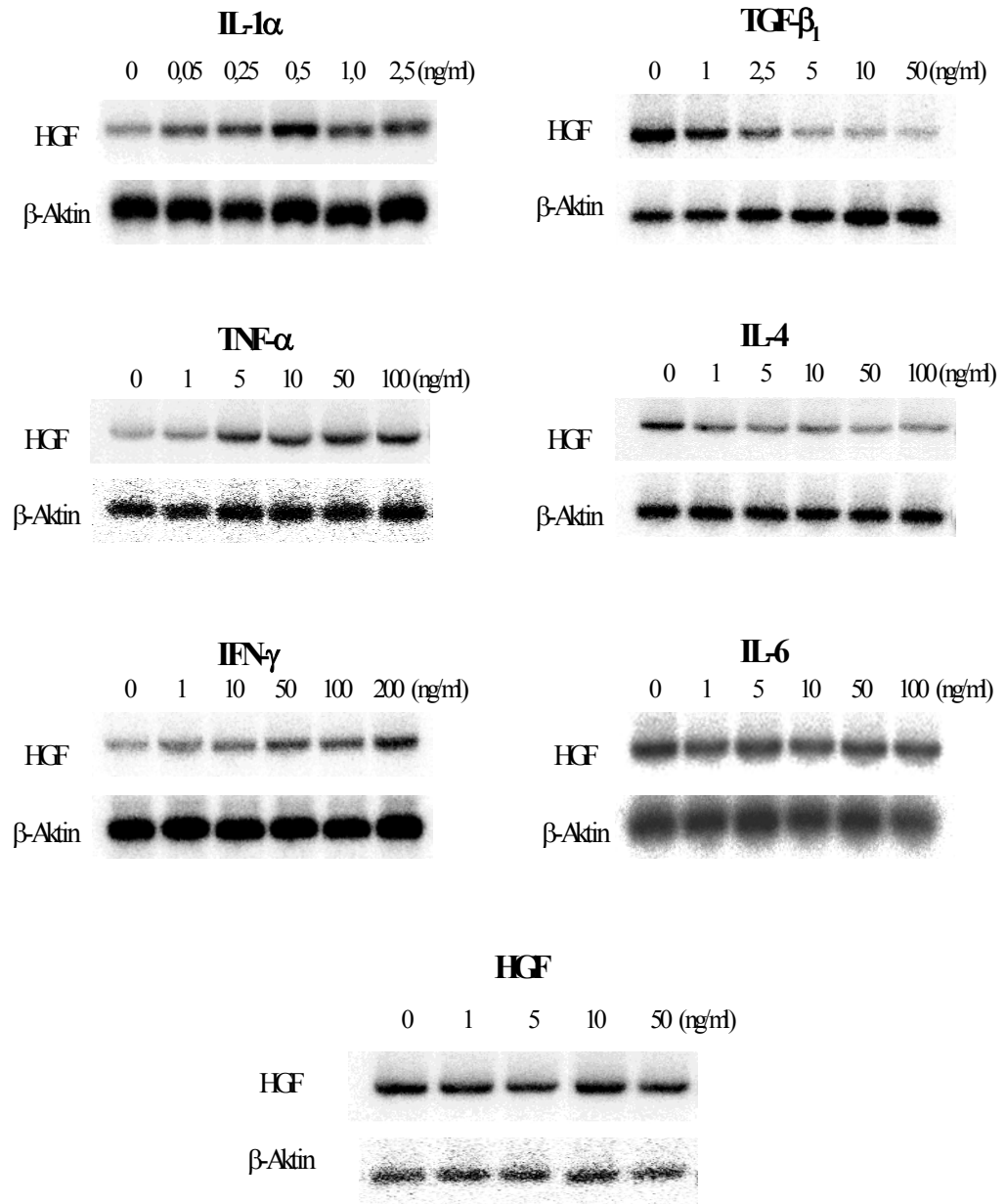


Abb. 9

Effekte von Zytokinen auf die HGF mRNA-Expression in HISMF, dargestellt mittels Northern Blot-Technik. HISMF werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4, TGF- β 1 und HGF stimuliert. Die Hybridisierung erfolgt mit ³²P-CTP markiertem HGF und β -Aktin-spezifischen cDNA-Sonden. Die Detektion wird mittels Autoradiographie durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , TNF- α und IFN- γ die HGF mRNA-Expression konzentrationsabhängig steigern. Demgegenüber senken IL-4 und TGF- β 1 dosisabhängig die HGF mRNA-Expression. IL-6 und HGF selbst haben keinen Einfluss auf die HGF mRNA-Expression.

3.4 Untersuchungen zur Beeinflussung der Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen durch Myofibroblasten

In den folgenden Funktionsuntersuchungen soll analysiert werden, ob Überstände von HISMF die Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen beeinflussen.

Da in früheren Experimenten mit der Fibroblasten Zelllinie CCD-18 gezeigt werden konnte, dass die Fibroblasteneffekte auf Darmepithelzellen unabhängig von Zell-Zell-Kontakten sind (Göke et al., 1998), werden für die folgenden Experimente Überstände von HISMF verwendet.

3.4.1 HISMF steigern die Caco-2-Zellrestitution

Hier soll der Einfluss von intestinalen Myofibroblasten auf das Restitutionsverhalten intestinaler Epithelzellen untersucht werden.

Die Effekte der Überstände von HISMF auf die Migration von Caco-2-Zellen werden unter serumarmen Kulturbedingungen mittels eines *in vitro*-Assays durchgeführt (vgl. 2.2.5.1).

Abb. 10 zeigt, dass die Restitution von Caco-2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit HISMF-Überständen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollmedium inkubiert werden, um 100% gesteigert wird.

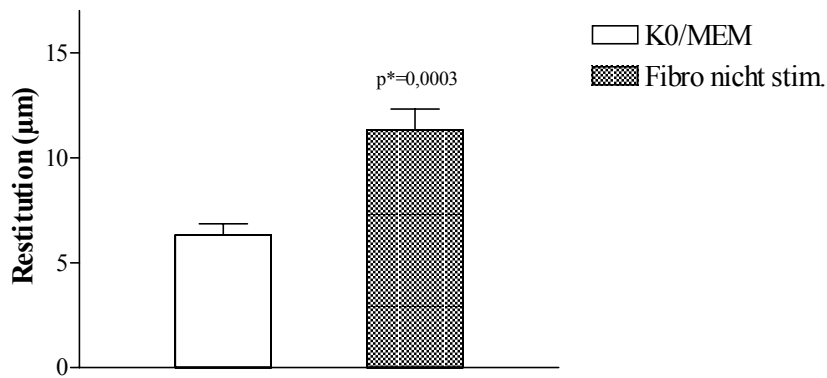


Abb. 10

Effekte von HISMF auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF.
p* vs. KO/MEM

3.4.1.1 Restitutionsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden durch proinflammatorische Zytokine noch weiter verstärkt

Des Weiteren soll analysiert werden, ob durch Stimulation der HISMF mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 α , TNF- α und IFN- γ eine weitere Steigerung der Restitution von Caco-2-Zellen erzielt werden kann. Hierbei werden HISMF für 24 h mit proinflammatorischen Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Überstände dieser stimulierten Myofibroblasten werden anschließend analog zu 3.3.1 auf Caco-2-Zellen gegeben, woraufhin nach weiteren 8 h (Ergebnisse nicht dargestellt) bzw. 24 h Inkubation die Restitution bestimmt wird.

Darüber hinaus soll untersucht werden, ob durch Zugabe von anti-HGF-Antikörpern Myofibroblasten-vermittelte Effekte auf die Caco-2-Zellrestitution inhibiert werden können.

In Abb. 11 wird deutlich, dass durch Inkubation der Caco-2-Zellen mit IL-1 α (0,5 ng/ml) stimulierten HISMF-Überständen, die Restitution von Caco-2-Zellen im Vergleich zur Inkubation von Caco-2-Zellen mit unstimulierten HISMF noch weiter gesteigert werden kann. Die Zugabe des HGF-Antikörpers (10 μ g/ml) zu IL-1 α -stimulierten HISMF kann diesen restitutionsfördernden Effekt inhibieren, was dafür spricht, dass die Restitutionsteigerung von Caco-2-Zellen über HGF vermittelt ist.

Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass die Caco-2-Restitution nach Stimulation mit IL-1 α (5. Säule von links) nicht wesentlich gegenüber unstimulierten Caco-2-Zellen (1. Säule von links) gesteigert wird. Zudem ist die Restitution von allein mit IL-1 α stimulierten Caco-2-Zellen (5. Säule von links) im Vergleich zu IL-1 α -stimulierten Myofibroblasten um 50% vermindert. Hierdurch wird veranschaulicht, dass die restitutionsteigernde Wirkung IL-1 α -stimulierter Myofibroblasten nicht durch IL-1 α selbst bedingt ist und somit nicht auf den Eigeneffekt von IL-1 α zurückzuführen ist. Der starke restitutionsteigernde Effekt von Caco-2-Zellen ist an das Vorhandensein von HISMf gebunden.

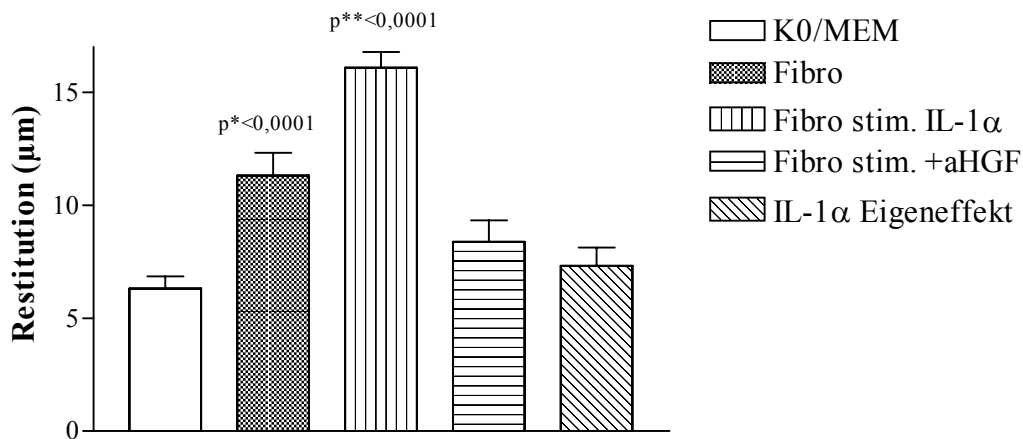


Abb. 11

Effekte IL-1 α -stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMf; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml)-stimulierten HISMf-Überständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml)- stimulierten HISMf-Überständen unter Zusatz von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml).

p* vs. K0/MEM

p** vs. Fibro

Ganz ähnliche Ergebnisse werden in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt. Hier zeigt sich, dass durch Inkubation der Caco-2-Zellen mit TNF- α (10 ng/ml)- bzw. IFN γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen (3. Säule) die Restitution von Caco-2-Zellen im Vergleich zur Inkubation von Caco-2-Zellen mit unstimulierten HISMF (2. Säule) noch weiter gesteigert werden kann. Auch hier wird durch Zugabe von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml) zu TNF- α - bzw IFN- γ -stimulierten HISMF der restitutionsfördernde Effekt inhibiert, was die Vermutung zulässt, dass der restitutionsfördernde Effekt über HGF vermittelt ist. Die 5. Säule zeigt, dass nach direkter Stimulation der Caco-2-Zellen mit TNF- α bzw. IFN- γ keine wesentliche Restitutionssteigerung von Caco-2-Zellen resultiert. Die durch Überstände der mit TNF- α bzw. IFN- γ stimulierten HISMF induzierte Caco-2-Restitutionssteigerung ist nicht auf die Eigeneffekte der einzelnen Zytokine zurückzuführen.

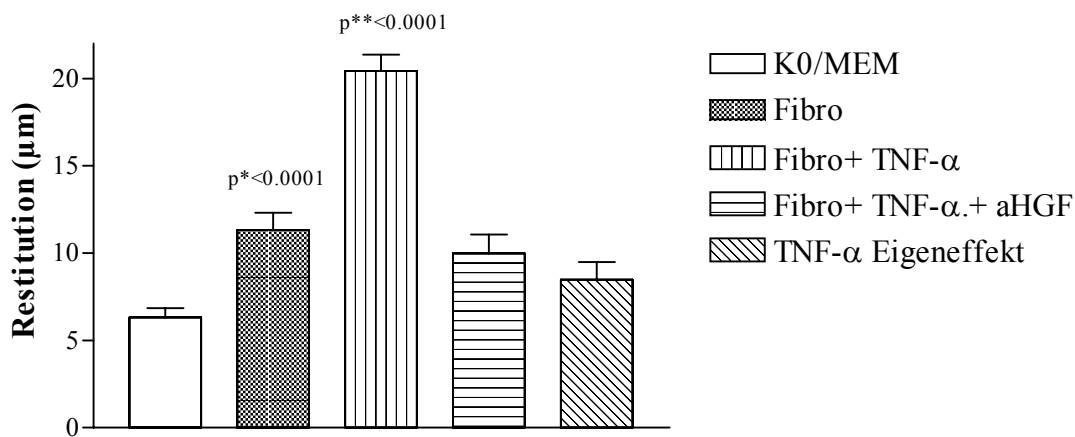


Abb. 12

Effekte TNF- α -stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen unter Zusatz von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml).

p* vs. K0/MEM

p** vs. Fibro

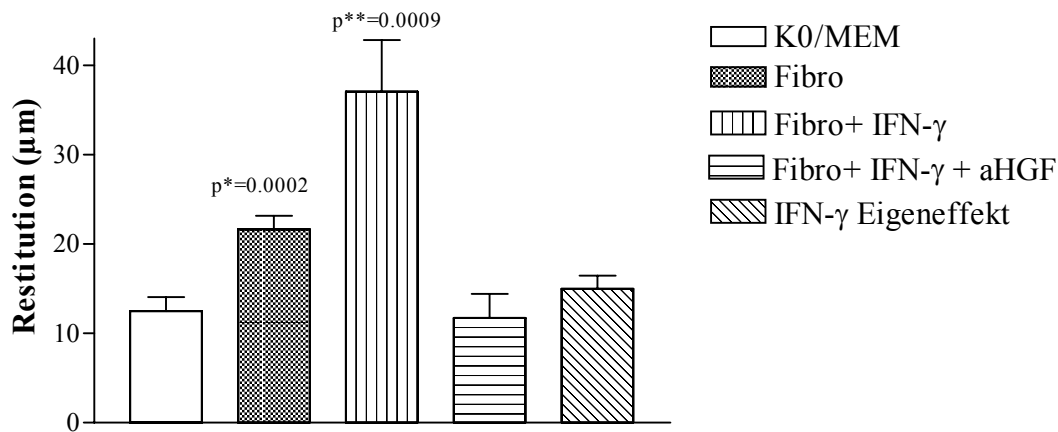


Abb. 13

Effekte IFN- γ -stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen unter Zusatz von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml).

p* vs. K0/MEM

p** vs. Fibro

3.4.2 HISMF steigern die Caco-2-Zellproliferation

Im Folgenden wird mittels Thymidineinbau der Einfluss primärer intestinaler Myofibroblasten auf die Proliferation intestinaler Epithelzellen (Caco-2-Zellen) untersucht.

In Abb. 14 zeigt sich, dass die Proliferation von Caco-2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit HISMF-Überständen um ca. 100% gegenüber Caco-2-Zellen, die mit Kontrollmedium inkubiert werden, gesteigert wird.

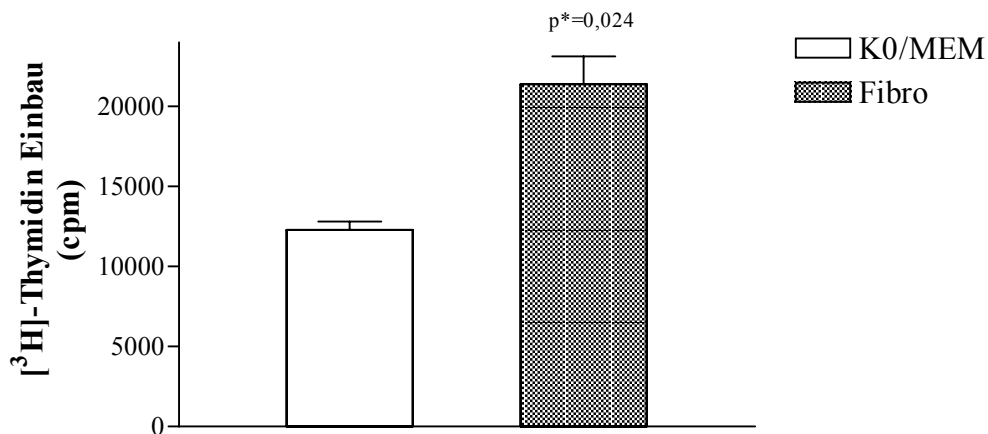


Abb. 14

Effekte von HISMF auf die Proliferation von Caco-2-Zellen. 1. Säule: Caco-2-Zellen mit Kontrollmedium inkubiert (K0/MEM); 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF-Zellen (Fibro).

p* vs. K0/MEM

3.4.2.1 Proliferationssteigernde Myofibroblasten-Effekte werden durch proinflammatorische Zytokine noch weiter verstärkt

Es wird geprüft, ob die Stimulation von HISMF mit den Zytokinen IL-1 α , TNF- α und IFN- γ eine weitere Steigerung der Proliferation von Caco-2-Zellen bewirkt.

Abb. 15 zeigt, dass nach Inkubation der Caco-2-Zellen mit IL-1 α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen, die Proliferation von Caco-2-Zellen im Vergleich zur Inkubation von Caco-2-Zellen mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen deutlich gesteigert wird. Die Zugabe des HGF-Antikörpers (10 μ g/ml) zu IL-1 α -stimulierten HISMF blockiert diesen proliferationsfördernden Effekt, was dafür spricht, dass die Proliferationssteigerung von Caco-2-Zellen durch HGF vermittelt ist. Die direkte Stimulation der Caco-2-Zellen mit IL-1 α (IL-1 α Eigeneffekt) zeigt im Vergleich zu unstimulierten Caco-2-Zellen (K0/MEM) keine Proliferationssteigerung, was zeigt, dass die eventuell vorhandenen IL-1 α -Eigeneffekte zu vernachlässigen sind.

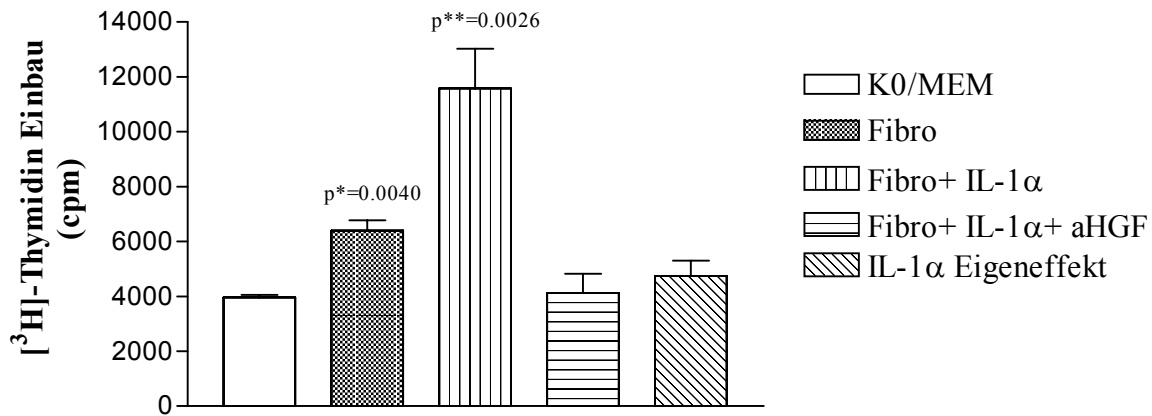


Abb. 15

Effekte IL-1 α -stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellproliferation. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml) stimulierten HISMF-Überständen unter Zusatz von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml).

p* vs. K0/MEM

p** vs. Fibro

Ähnliche Ergebnisse werden in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt. Durch die Inkubation der Caco-2-Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) bzw. IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen wird die Proliferation von Caco-2-Zellen im Vergleich zur Inkubation von Caco-2-Zellen mit unstimulierten HISMF-Überständen noch weiter gesteigert. Die Zugabe der HGF-Antikörper (10 μ g/ml) zu TNF- α -bzw. IFN- γ -stimulierten HISMF bewirkt eine deutliche Inhibition der Proliferation. Die Proliferation wird nach direkter Stimulation mit TNF- α und IFN- γ im Vergleich zu unstimulierten Caco-2-Zellen um etwa 25 % gesteigert, was auf schwache Eigeneffekte dieser Zytokine hindeutet. Der durch die direkte Caco-2-Stimulation mit IFN- γ und TNF- α (TNF- α - bzw. IFN- γ -Eigeneffekt) bedingte proliferationsfördernde Effekt ist jedoch um ca. 100% geringer als die TNF- α - bzw. IFN- γ -stimulierten Myofibroblasten-Effekte (Fibro +TNF- α bzw. Fibro+ IFN- γ). Es kann auch hier gefolgert werden, dass der proliferationssteigernde Effekt durch Myofibroblasten induziert wird.

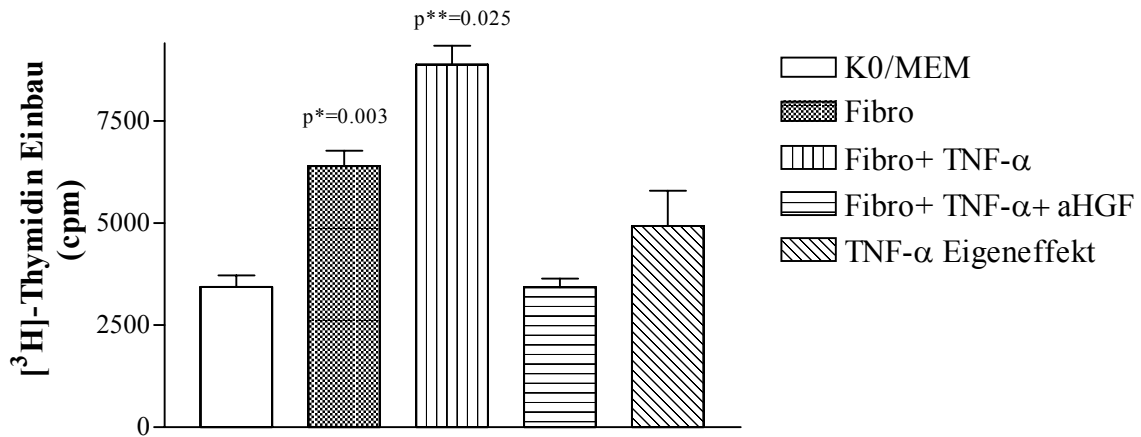


Abb. 16

Effekte TNF- α -stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellproliferation. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen unter Zusatz von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml).

p* vs. K0/MEM

p** vs. Fibro

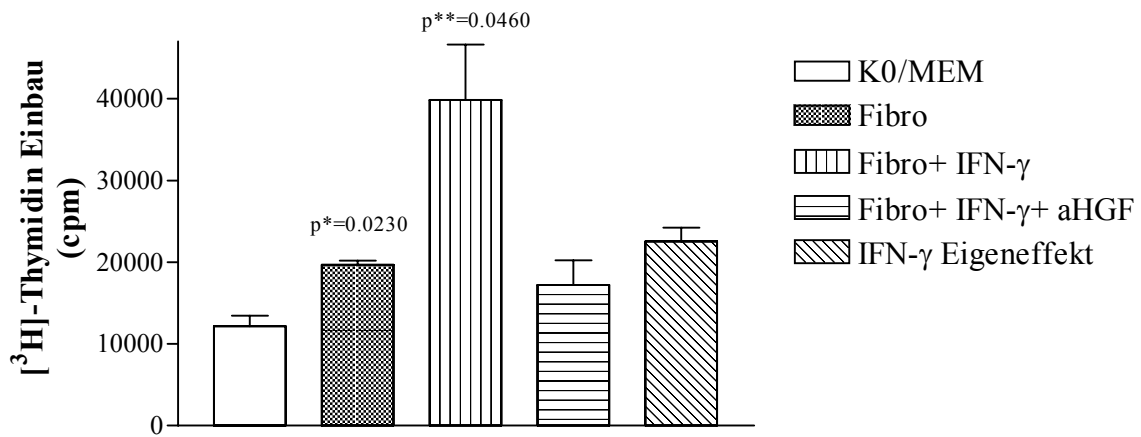


Abb. 17

Effekte IFN- γ -stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellproliferation. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule Caco-2-Zellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten HISMF; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Überständen unter Zusatz von anti-HGF-Antikörpern (10 μ g/ml); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml).

p* vs. K0/MEM

p** vs. Fibro

Da durch Myofibroblasten sowohl die epitheliale Zellrestitution als auch die Zellproliferation gesteigert wird, drängt sich die Frage auf, ob der restitutionssteigernde Effekt eventuell durch die Steigerung der Proliferation vorgetäuscht ist. Um dies zu untersuchen, werden die HISMF-Kulturüberstände mit Mitomycin C (2 µg/ml), einem Spindelgift, das durch Zellarrest die Zellproliferation verhindert, versetzt. (In hier nicht gezeigten Thymidin-Inkorporations-Experimenten wurde zuvor gezeigt, dass eine Mitomycin C Konzentration von 2 µg/ml proliferationsinhibierend wirkt.)

Nach 4-stündiger Inkubation der Caco-2-Zellen mit Mitomycin C-haltigen HISMF-Überständen wird anschließend die Restitution der Caco-2-Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienen Caco-2-Zellen, die mit HISMF-Überständen ohne Mitomycin C inkubiert sind.

Abb. 18 veranschaulicht, dass die restitutionssteigernden Myofibroblasten-Effekte auf Caco-2-Zellen weitgehend unabhängig von der Proliferation sind, da die Effekte unstimulierter Myofibroblasten und auch die Effekte zytokinstimulierter Myofibroblasten durch Behandlung der Epithelzellen mit Mitomycin C nicht wesentlich beeinflusst werden.

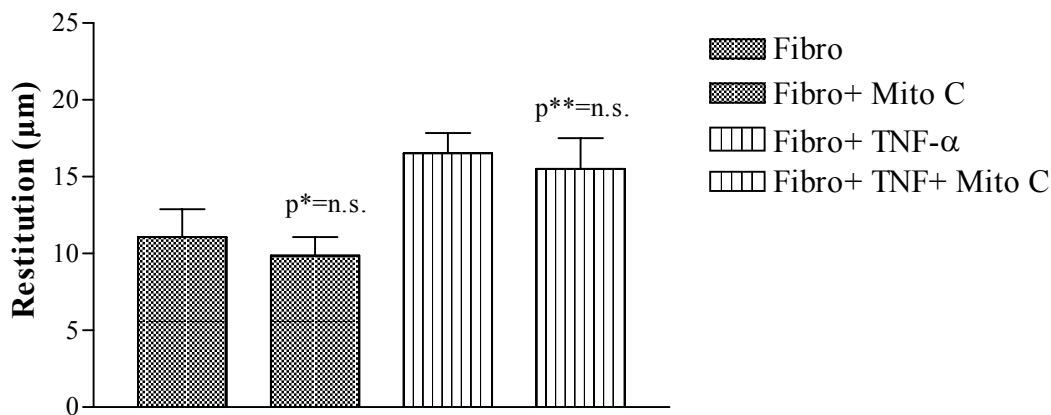


Abb. 18

Effekte von Mitomycin C auf die Caco-2-Restitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit HISMF-Kulturüberständen; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von Mitomycin C (2 µg/ml); 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF-α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF-α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von Mitomycin C (2 µg/ml).

p* vs Fibro

p** vs Fibro+TNF-α

3.5 Untersuchungen zum Signalkaskadeweg der proliferations- und restitutionsfördernden Myofibroblasten-Effekte

Es stellt sich die Frage, durch welche Signalkaskadewege die zuvor gezeigten restitutions- und proliferationssteigernden Myofibroblasten-Effekte vermittelt werden. Mögliche Kandidaten für die Signalvermittlung sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃)-Kinase und die Extracellular Signal Regulated Kinasen 1 und 2 (ERK1 und ERK2), die über Modulation von Transkriptionsfaktoren im Zellkern die Restitution und Proliferation beeinflussen und in nicht-intestinalen Epithelzellen als Signalvermittler von HGF bekannt sind. LY294002 ist ein etablierter PI₃-Kinase Inhibitor, während PD98059 den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg durch Inhibition der MAP-Kinase-Kinase-1 (MEK1) inhibiert.

Um diesen Zusammenhang experimentell darzustellen, werden die Fibroblasteneffekte in Gegenwart des PI₃-Kinase Inhibitors LY294002 und des MEK1-Inhibitors PD98059 untersucht. Hierfür werden Caco-2-Zellen mit zytokinstimulierten Myofibroblasten-Kulturüberständen, die zusätzlich 1 µM PD98059 bzw. 10 µM LY294002 enthalten, für 24 h inkubiert. Anschließend wird die Restitution bzw. die Proliferation gemessen.

3.5.1 Restitutionsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden über PI₃-und MAP-Kinasen vermittelt

Abbildungen 19-21 illustrieren, dass die restitutionsfördernden Effekte IL-1α-, TNF-α- und IFN-γ-stimulierter Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellrestitution sowohl durch PD98059 als auch durch LY294002 deutlich gehemmt werden. Dies deutet an, dass die Effekte intestinaler Myofibroblasten auf die Caco-2-Restitution durch ERK1/2 und PI₃-Kinase vermittelt sind.

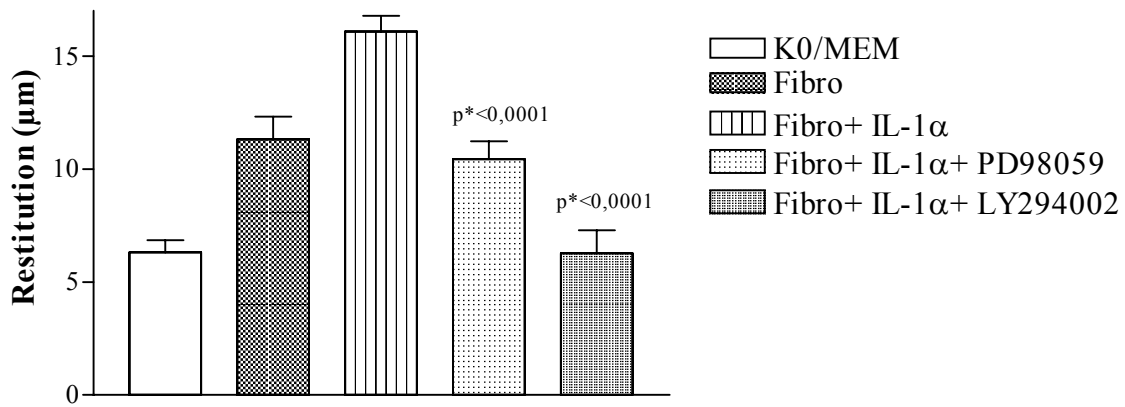


Abb. 19

Effekte von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit unstimulierten HISMF Kulturüberständen; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von PD98059 (1 µM); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von LY294002 (10 µM).

p* vs. Fibro + IL-1α

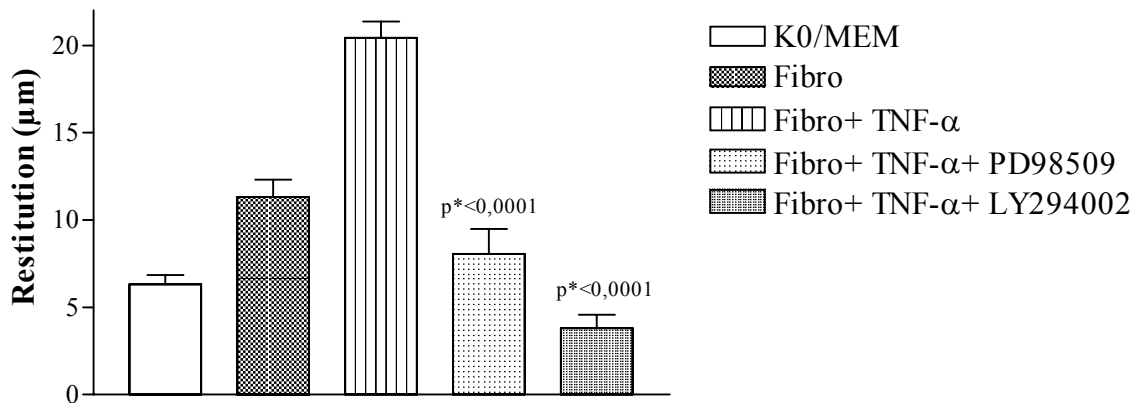


Abb. 20

Effekte von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF-α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit (10 ng/ml) TNF-α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von PD98059 (1 µM); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF-α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von LY294002 (10 µM).

p* vs. Fibro + TNF-α

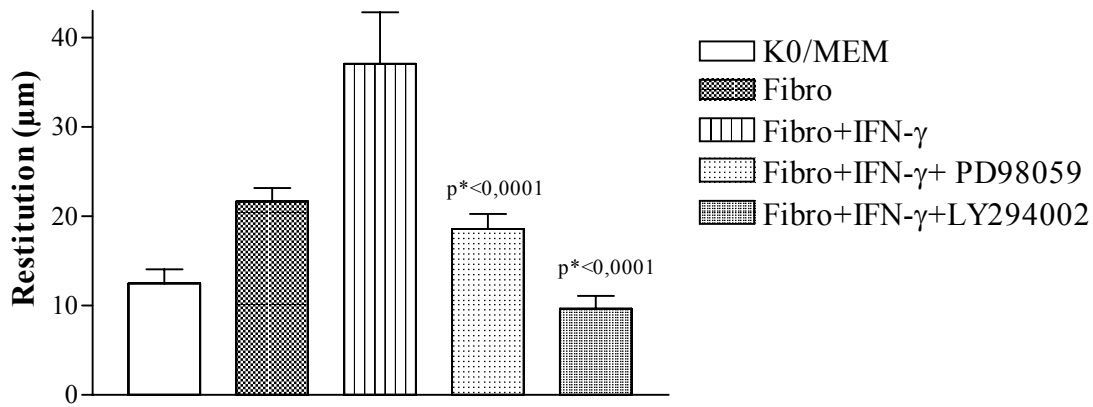


Abb. 21

Effekte von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die Caco-2-Zellrestitution. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50ng/ml)-stimulierten HISMF Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50ng/ml)-stimulierten HISMF Kulturüberständen unter Zusatz von PD98059 1 μ M); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von LY294002 (10 μ M).

p* vs. Fibro + IFN- γ

3.5.2 Proliferationsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden über PI₃-und MAP-Kinasen vermittelt

Auch die proliferationsfördernden Effekte der mit IL-1 α -, TNF- α - und IFN- γ -stimulierten Myofibroblasten auf die Caco-2-Zellproliferation werden sowohl durch PD98059 als auch LY294002 stark gehemmt, wie die Abbildungen 22-24 veranschaulichen. Diese Befunde sind Indizien dafür, dass ERK1/2 und PI₃-Kinasen an den proliferationsfördernden Myofibroblasten-Effekten auf Caco-2-Zellen beteiligt sind.

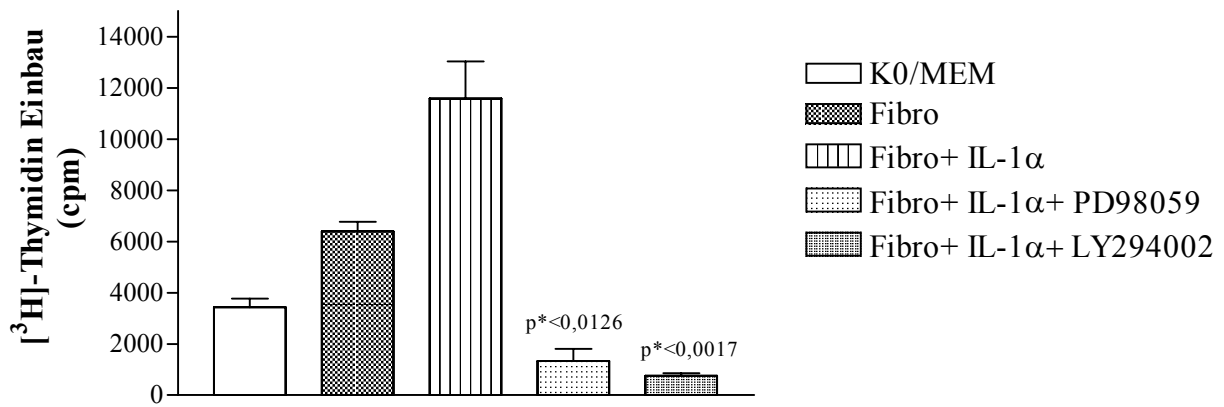


Abb. 22

Effekte von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die Caco-2-Zellproliferation. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von PD98059 (1 μ M); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IL-1 α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von LY294002 (10 μ M).

p* vs. Fibro + IL- α

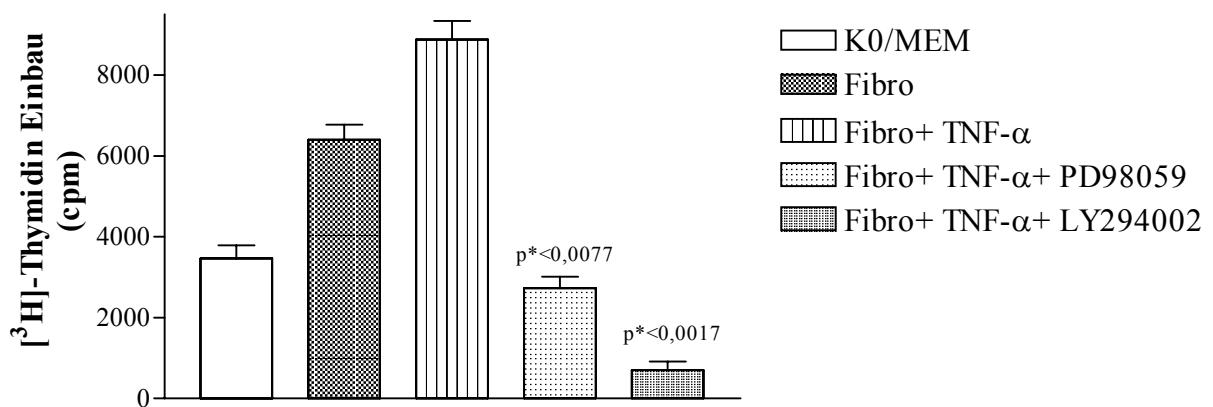


Abb. 23

Effekte von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die Caco-2-Zellproliferation. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von PD98059 (1 μ M); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit TNF- α (10 ng/ml)-stimulierten HISMF Kulturüberständen unter Zusatz von LY294002 (10 μ M).

p* vs. Fibro + TNF- α

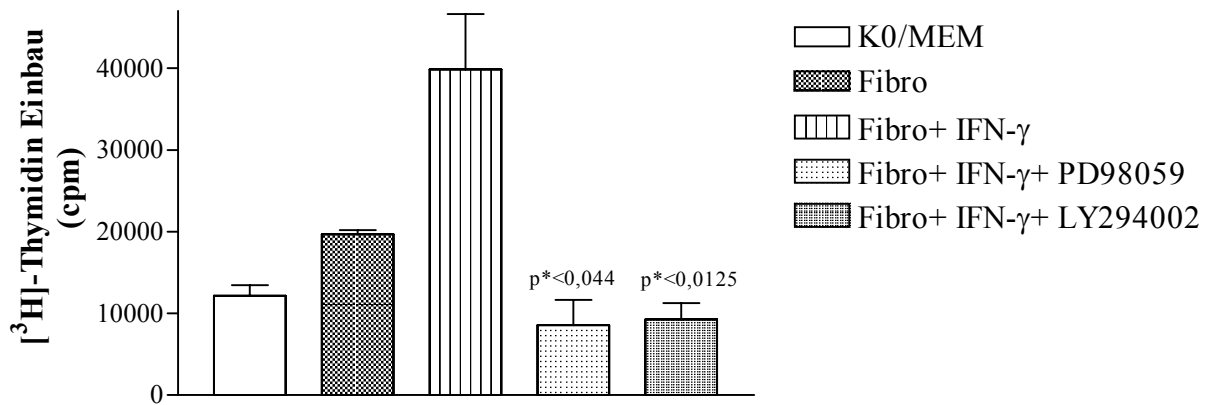


Abb. 24

Effekte von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die Caco-2-Zellproliferation. 1. Säule: Caco-2-Zellen unbehandelt; 2. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen; 3. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen; 4. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von PD98059 (1 μ M); 5. Säule: Caco-2-Zellen, inkubiert mit IFN- γ (50 ng/ml)-stimulierten HISMF-Kulturüberständen unter Zusatz von LY294002 (10 μ M).

p* vs. Fibro + IFN- γ

3.6 HGF reguliert die ERK/Phospho-ERK und PI₃-Kinase Protein-Expression

Im Folgenden wird evaluiert, ob HGF die Expression von ERK-, Phospho-ERK und PI₃-Kinase Protein steigert. Zudem wird überprüft, ob eine veränderte ERK, Phospho-ERK- oder PI₃-Expression durch anti-HGF-Antikörper und durch den MAP-Kinase-Inhibitor PD98059 bzw. den PI₃-Kinase-Inhibitor LY294002 vermindert wird.

Myofibroblasten werden mit HGF für 24 h inkubiert. Nach 20 h Inkubation mit HGF werden die Myofibroblasten zusätzlich mit den oben genannten Inhibitoren und mit HGF-Antikörpern versetzt. Die anschließend gewonnenen Protein-Extrakte werden in einer Western Blot-Analyse untersucht.

Abb. 25 veranschaulicht, dass 50 ng/ml HGF in Myofibroblasten die Phospho-ERK-Protein-Expression gegenüber unstimulierten Myofibroblasten drastisch steigert. Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Anwesenheit von neutralisierenden anti-HGF-Antikörpern, aber auch durch den MAP-Kinase-Inhibitor PD98059 gehemmt. Die ERK1/2-Protein-Expression wird durch HGF demgegenüber nur leicht gesteigert.

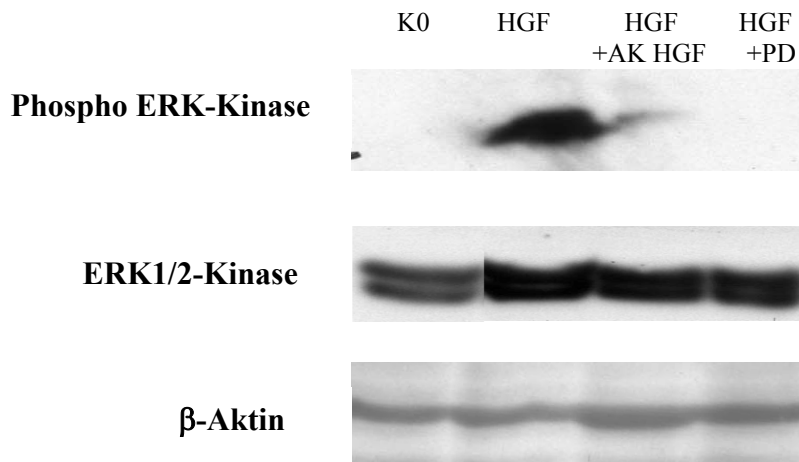


Abb. 25

Effekte von HGF auf die ERK-, Phospho-ERK-Protein-Expression in HISMF. HISMF werden für 24 h mit HGF (50 ng/ml) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von anti-HGF-Antikörpern (AK HGF; 10 µg/ml) bzw. PD98059 (PD; 1 µM) kultiviert. Die ERK- und Phospho-ERK-Protein-Expression in HISMF wird mittels Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt.

HGF steigert in intestinalen Myofibroblasten auch die Expression der PI₃-Kinase (Abb. 26), ein Effekt, der sowohl durch gleichzeitige Gabe von neutralisierenden anti-HGF-Antikörpern als auch durch LY294002 substantiell gehemmt wird.

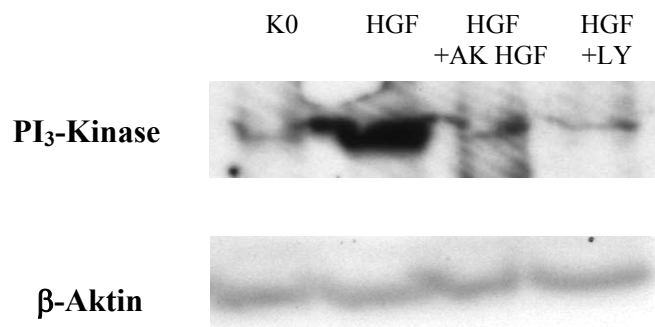


Abb. 26

Effekte von HGF auf die PI₃-Protein-Expression in HISMF. HISMF werden für 24 h mit HGF (50 ng/ml) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von anti-HGF-Antikörpern (AK HGF; 10 µg/ml) bzw. LY294002 (LY; 10 µM) kultiviert. Die PI₃-Protein-Expression in HISMF wird mittels Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt.

3.7 Apoptose von Caco-2-Zellen wird durch HISMF nicht beeinflusst

Mögliche Effekte von zytokin- und unstimulierten Myofibroblasten auf den Apoptosegrad von Epithelzellen werden mittels Histon-ELISA untersucht. Hierzu werden HISMF in Gegenwart bzw. Abwesenheit von IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , TGF- β und IL-4 für 24 h kultiviert. Nach erneuter 24-stündige Inkubation von Caco-2-Zellen mit stimulierten und unstimulierten HISMF-Überständen, erfolgt die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 405 nm. In Abb. 27 zeigt sich, dass weder nach Inkubation mit unstimulierten HISMF-Kulturüberständen noch nach Inkubation mit zytokinstimulierten HISMF-Kulturüberständen die Apoptose in Caco-2-Zellen moduliert wird.

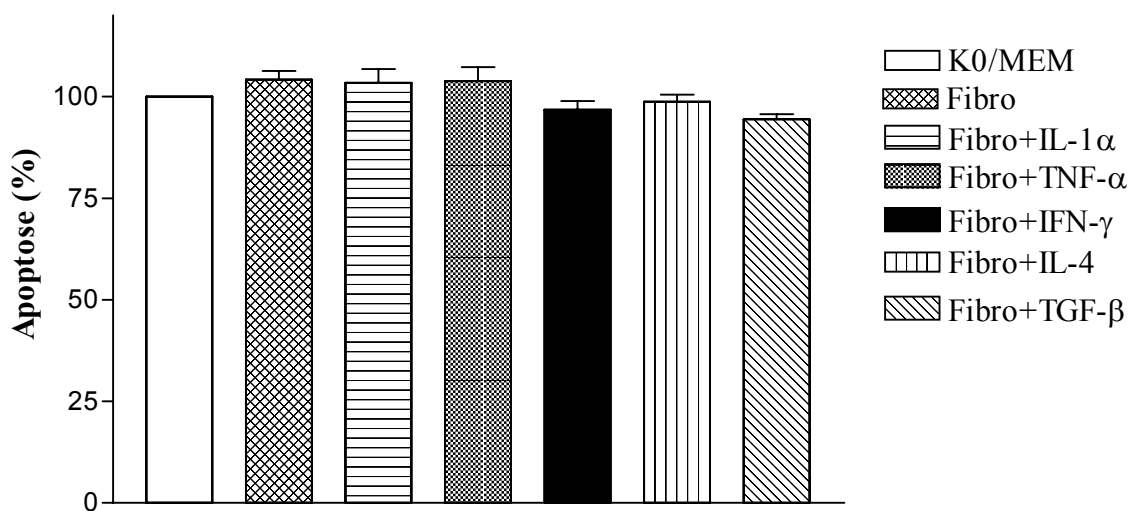


Abb. 27

Nicht-signifikante Effekte unstimulierter HISMF-Überstände und zytokinstimulierter HISMF-Überstände auf die Apoptose von Caco-2-Zellen, dargestellt als relative Werte (in %) bezogen auf die Apoptose von Caco-2-Zellen, die mit Kontrollmedium (K0/MEM) kultiviert werden.

Verwendete Zytokin-Konzentrationen: IL-1 α (c=10 ng/ml), TNF- α (c=10 ng/ml), IFN- γ (c=50 ng/ml), IL-4 (c=10 ng/ml), TGF- β (c=5 ng/ml),

3.8 Cyclooxygenase (COX)-Hemmer und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) modulieren epitheliale Wundheilungsfunktionen des Darms

In diesem Abschnitt sollen Effekte von verschiedenen Arzneimitteln auf die Modulation von Wundheilungsfunktionen, wie die Restitution und Proliferation intestinaler Epithelzellen, untersucht werden. Diese Effekte sollen an mit proinflammatorischen Zytokinen stimulierten sowie an unstimulierten Myofibroblasten, die ihrerseits das Darmepithel beeinflussen, analysiert werden.

Für die folgenden Experimente werden die in der Medizin breit eingesetzten nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) wie die unspezifischen COX-Inhibitoren Acetylsalicylsäure (ASS) und Diclofenac sowie der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib verwendet. Zusätzlich werden die Effekte von 5-ASA (5-Aminosalicylsäure=Mesalazin), einem Salicylsäure-Derivat, das in der Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt wird, untersucht.

3.8.1 NSAR- und 5-ASA-inkubierte Myofibroblasten modulieren die Restitution des Darmepithels

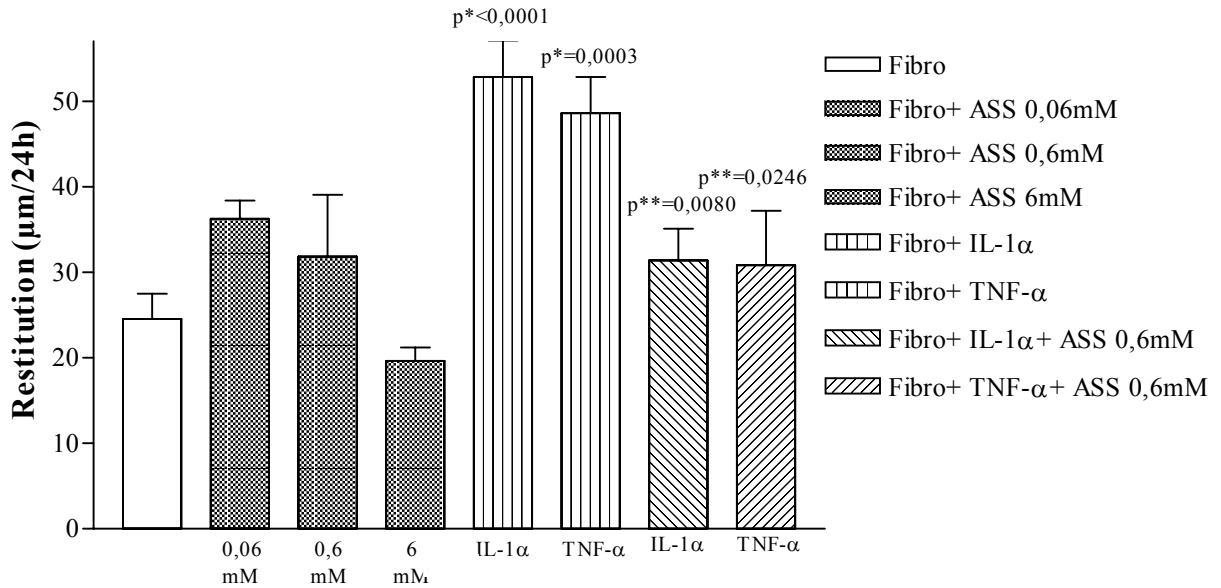
Um zu prüfen, ob COX-Inhibitoren die bereits beschriebenen Myofibroblasten-Effekte auf epitheliale Restitution modulieren, werden HISMF mit den genannten Arzneistoffen in unterschiedlicher Konzentration in Gegenwart bzw. Abwesenheit der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und TNF- α für 24 h inkubiert. Nach anschließender Inkubation der Caco-2-Zellen mit den Überständen stimulierter HISMF wird die Caco-2-Restitution bestimmt.

Abbildungen 28 A-D zeigen, dass ASS, Diclofenac und der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib die durch proinflammatorische Zytokine gesteigerte HISMF-vermittelte Förderung der Restitution nahezu auf das Ausgangsniveau herabsetzen. Die Inkubation mit Überständen 5-ASA-stimulierter HISMF hingegen zeigt keinen signifikanten hemmenden Effekt auf die Restitution von Caco-2-Zellen.

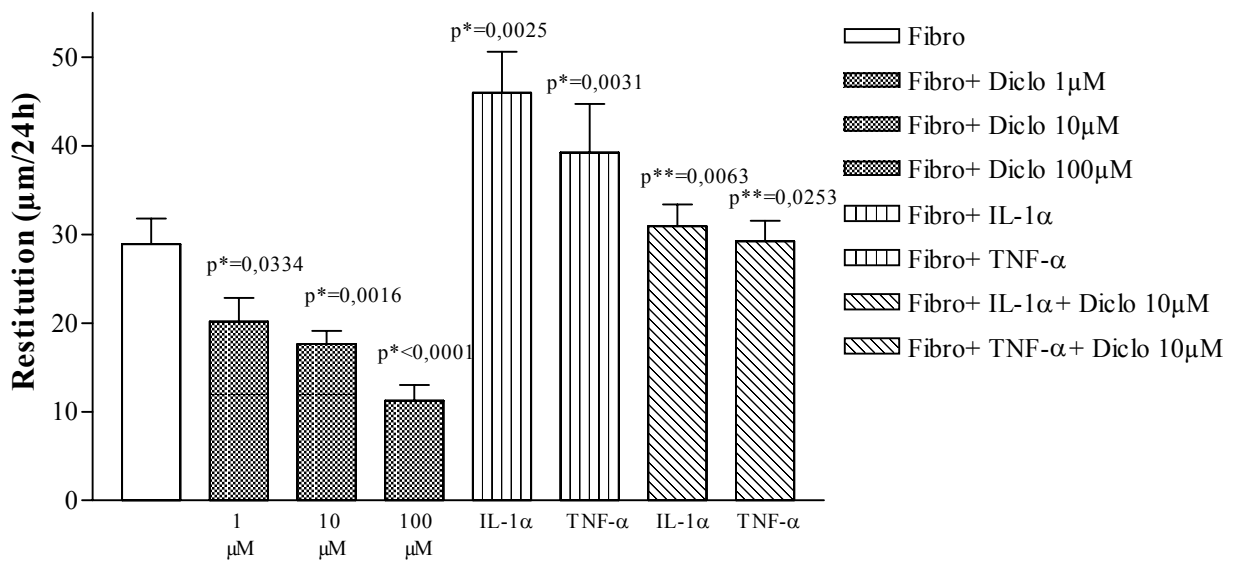
Es zeigt sich, dass die Restitution von Epithelzellen durch Inkubation mit Überständen von mit ASS-, Celecoxib- und 5-ASA-stimulierten Myofibroblasten (bei Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine) nicht erheblich beeinflusst wird. Nur Überstände von mit

Diclofenac (100 μM)-stimulierten Myofibroblasten, hemmen auch in Abwesenheit von IL-1 α und TNF- α signifikant die Restitution von Caco-2-Zellen.

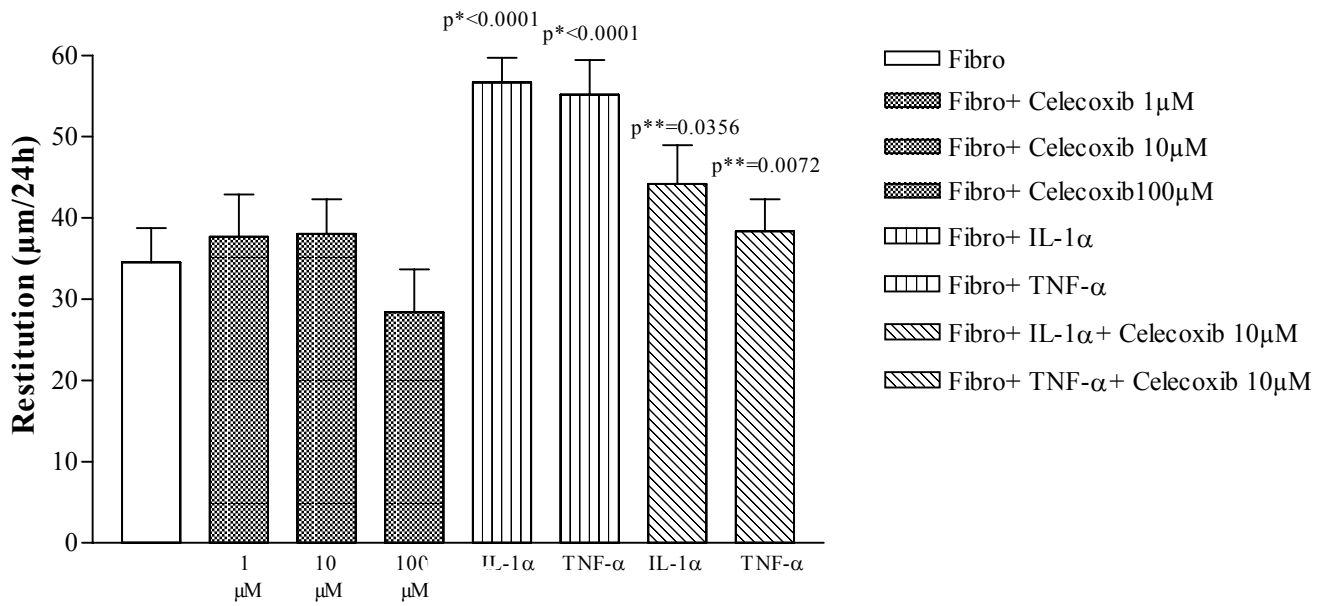
28 A



28 B



28 C



28 D

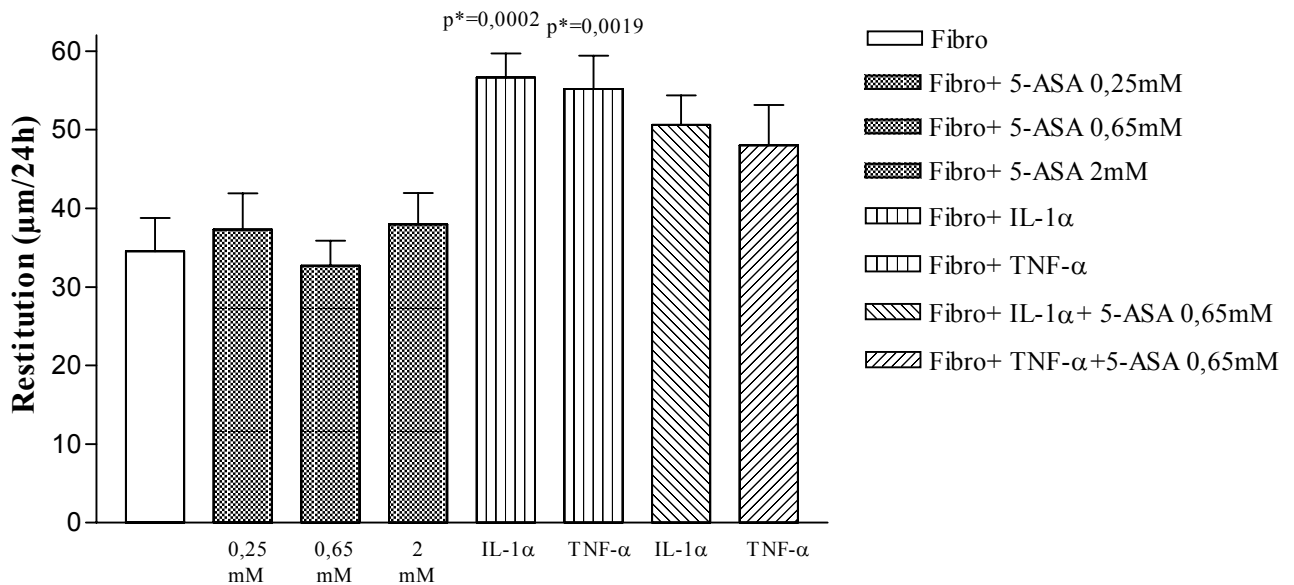


Abb. 28 A-D

Effekte von Überständen von mit ASS- (A), Diclofenac- (B), Celecoxib- (C) und 5-ASA- (D) stimulierten HISMF (jeweils 2.-4. Säule) auf die Caco-2-Zellrestitution. Caco-2-Zellen werden mit Überständen zytokinstimulierter HISMF (IL-1α [10 ng/ml] 5. Säule und TNF-α [10 ng/ml] 6. Säule) in Gegenwart (4. und 5. Säule) bzw. Abwesenheit der genannten Arzneistoffe kultiviert. Als Kontrollen dienen Caco-2-Zellen, die mit HISMF-Überständen (Fibro) kultiviert sind.

p* vs. Fibro

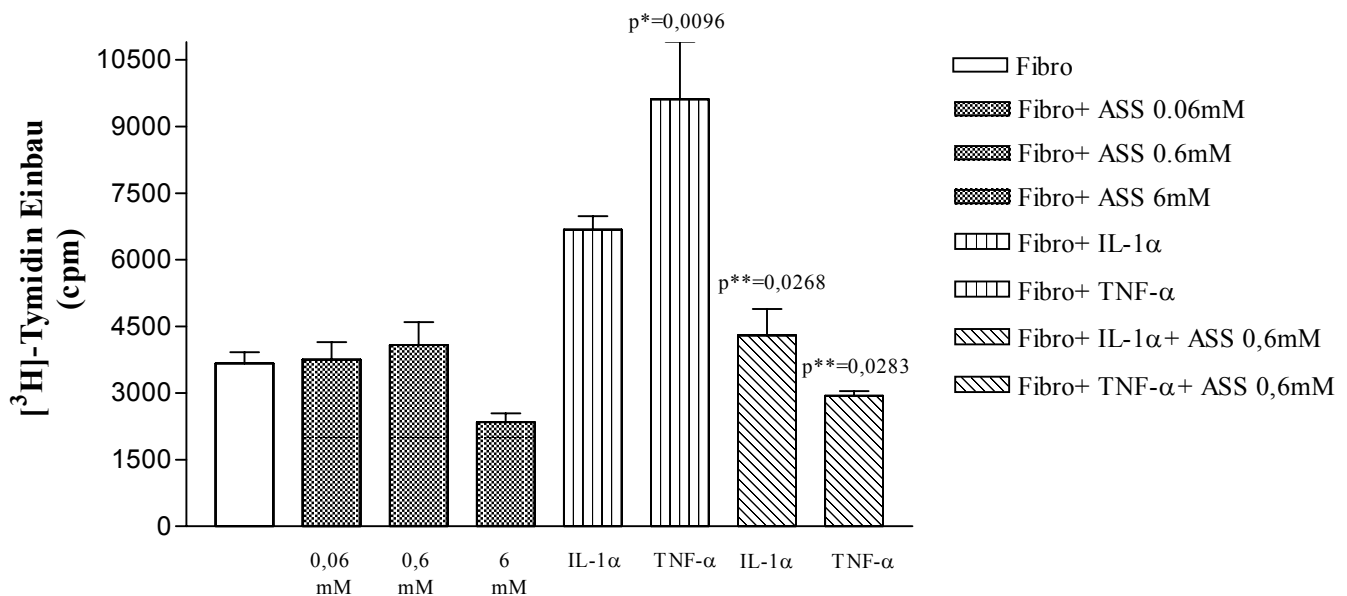
p** vs. Fibro+IL-α/TNF-α

3.8.2 NSAR- und 5-ASA-inkubierte Myofibroblasten modulieren die Proliferation des Darmepithels

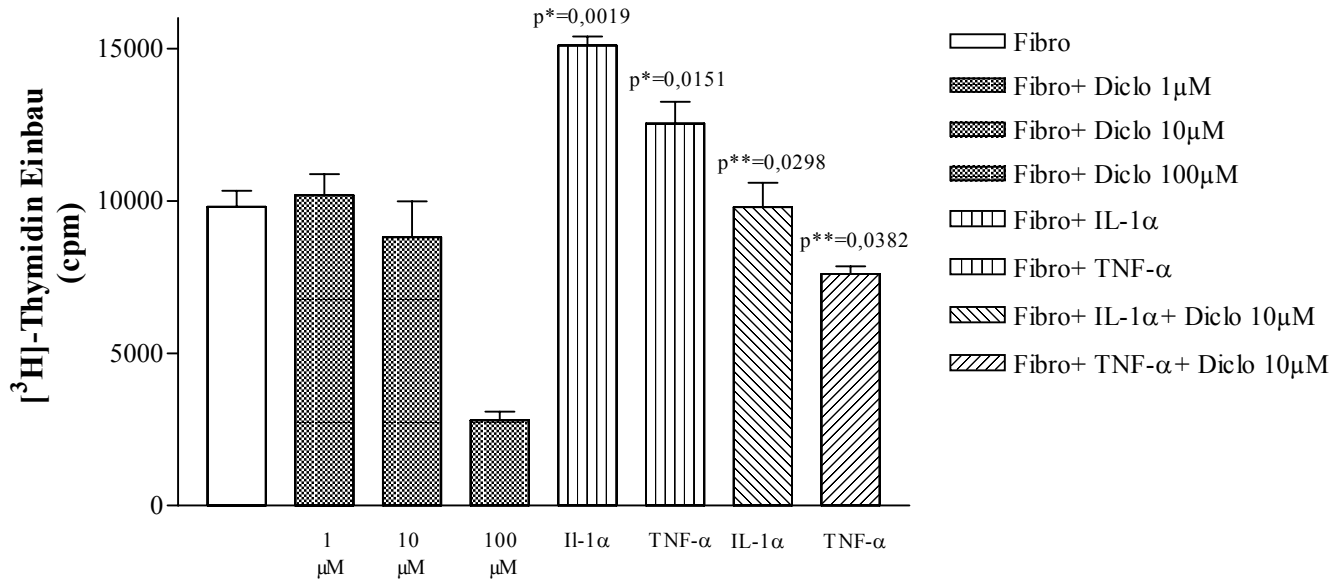
NSAR- und 5-ASA-stimulierte Myofibroblasten-Überständen hemmen dosisabhängig die Proliferation von Caco-2-Zellen.

Die Abbildungen 29 A-D dokumentieren, dass die durch mit IL-1 α - und TNF- α -stimulierten Myofibroblasten bedingte Proliferationsförderung sowohl von ASS und Diclofenac als auch von Celecoxib signifikant inhibiert wird. Im Gegensatz zu den Effekten auf die Zellrestitution zeigen auch Überstände von mit 5-ASA-stimulierten Myofibroblasten bei Anwesenheit von TNF- α einen stark hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Proliferation von Caco-2-Zellen durch Überstände von mit ASS (6 mM), Diclofenac (100 μ M), Celecoxib (100 μ M) und 5-ASA (2 mM) stimulierten HISMF auch ohne Zusatz von IL-1 α und TNF- α dosisabhängig reduziert wird (jedoch deutlich geringer als bei Anwesenheit der Zytokine).

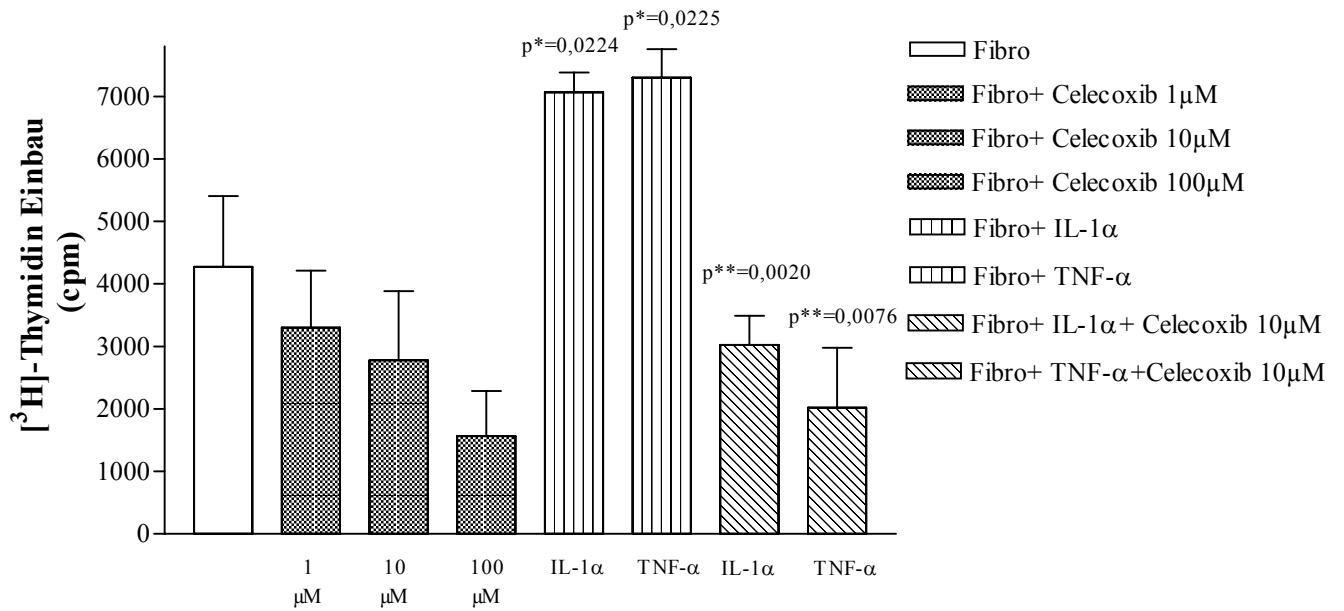
29 A



29 B



29 C



29 D

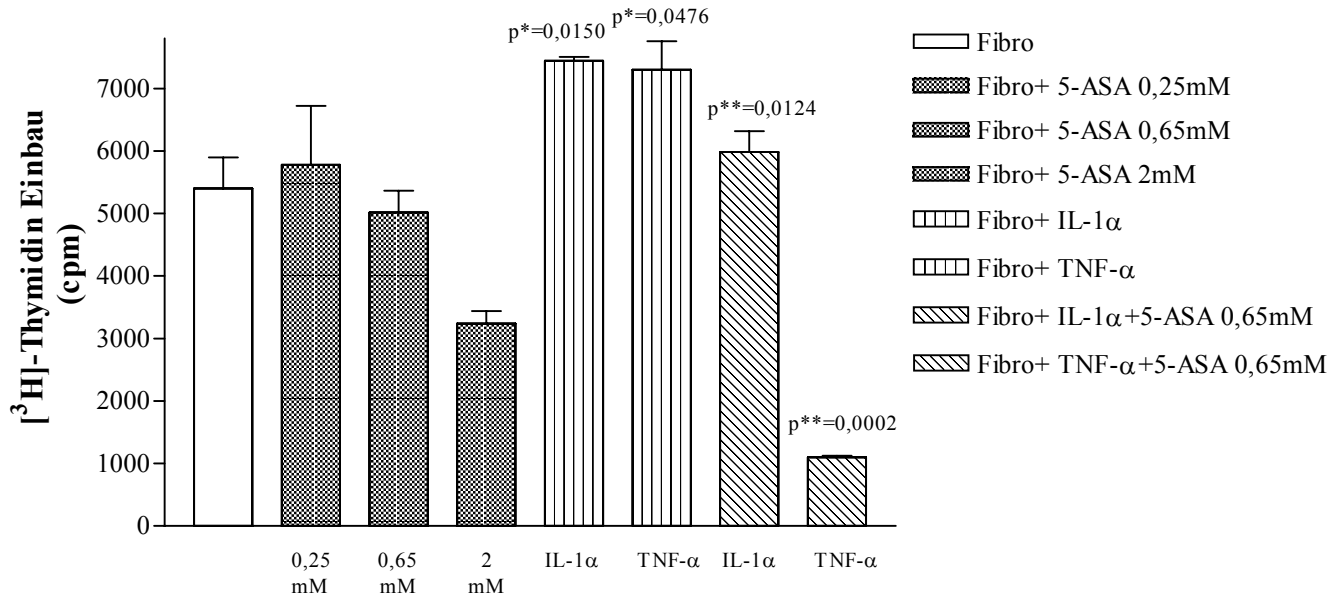


Abb. 29 A-D

Effekte von Überständen von mit ASS- (A), Diclofenac- (B), Celecoxib- (C) und 5-ASA- (D) stimulierten HISMF (jeweils 2.-4. Säule) auf die Caco-2-Zellproliferation. Caco-2-Zellen werden mit Überständen zytokinstimulierter HISMF (IL-1 α 5. Säule und TNF- α 6. Säule) in Gegenwart (4. und 5. Säule) bzw. Abwesenheit der genannten Arzneistoffe kultiviert. Als Kontrollen dienen Caco-2-Zellen, die mit HISMF-Überständen (Fibro) kultiviert sind.

p* vs. Fibro

p** vs. Fibro+IL- α /TNF- α

3.9 COX-Inhibitoren modulieren in HISMF die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten

Die oben beobachtete Hemmung der Restitution und Proliferation intestinaler Epithelzellen unter dem Einfluss von COX-Inhibitoren wirft die Frage auf, durch welche Mediatoren diese Effekte vermittelt sind. COX-Inhibitoren hemmen bekannterweise die Synthese von Prostaglandinen (PG) und könnten auch bei der Modulation der hier dargestellten Restitution und Proliferation von Caco-2-Zellen eine Rolle spielen. Zusätzlich ist in diesem Zusammenhang auch der Wachstumsfaktor HGF von wichtiger Bedeutung, für den bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass dieser die Proliferation und Restitution von Darmepithelzellen moduliert.

Die PGE₂- und 6-keto-PGF_{1 α} - sowie die HGF-Konzentrationen werden mittels ELISA-Technik in den Kulturüberständen von Myofibroblasten evaluiert. Hierfür werden HISMF für 24 h in Gegenwart bzw. Abwesenheit der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und TNF- α

kultiviert. Zusätzlich werden HISMF mit den Arzneistoffen ASS, Diclofenac, Celecoxib und 5-ASA allein und simultan mit IL-1 α und TNF- α stimuliert.

Wie Tabelle 1 veranschaulicht, werden nach Inkubation mit IL-1 α und TNF- α sowohl die Konzentrationen von Prostaglandin PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} als auch die Konzentration von HGF signifikant erhöht.

	HISMF unstimuliert	HISMF +TNF- α (10 ng/ml)	HISMF + IL-1 α (10 ng/ml)
PGE ₂ -Konzentration (pg/ml)	311.7	1737 p*=0.0337	1994 p*=0.0010
6-keto-PGF _{1α} -Konzentration (pg/ml)	87,64	1161.00 p*=0.0216	3048.00 p*=0,038
HGF-Konzentration (pg/ml)	561,60	1009.00 p*=0.0368	1145.00 p*=0,0334

Tab. 1

PGE₂, 6-keto-PGF_{1 α} und HGF Konzentration in HISMF Kultur-Überständen nach IL-1 α (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml) Inkubation

*p-Wert verglichen mit HISMF unstimuliert

** p-Wert verglichen mit IL-1 α and TNF- α stimulierten HISMF

3.9.1 COX-Inhibitoren reduzieren die PGE₂-Konzentration in HISMF-Überständen; in Gegenwart von IL-1 α und TNF- α sind diese Effekte verstärkt

In unstimulierten HISMF beträgt die PGE₂-Konzentration 103,2 pg/ml. Nach Stimulation der Zellen mit IL-1 α steigt die Konzentration auf 2123,4 pg/ml mit TNF- α auf 494,3 pg/ml. Tabelle 2 zeigt, dass die PGE₂-Konzentration in HISMF-Kulturüberständen nach Inkubation mit ASS um 31,5%, Diclofenac um 48,7%, Celecoxib um 60,3% und 5-ASA um 25,4 % gegenüber Überständen unbehandelter HISMF gesenkt wird. Bei gleichzeitiger Inkubation der HISMF mit IL-1 α wird darüber hinaus für die Inkubation mit ASS eine Reduktion der PGE₂-Konzentration um 96,7%, mit Diclofenac um 92,6% und mit Celecoxib um 97,1% gegenüber IL-1 α -stimulierten HISMF beobachtet. Eine schwächere Hemmung findet sich nach Inkubation mit 5-ASA (48,13%). Ähnliche Effekte der Arzneistoffe werden für die Simultanstimulation mit TNF- α beobachtet (vgl. Tabelle 2).

Hemmung der PGE ₂ -Bildung in HISMF			
	HISMF +COX-Inhibitor	HISMF+ +IL-1 α (10 ng/ml) +COX-Inhibitor	HISMF+ + TNF- α (10 ng/ml) + COX-Inhibitor
Diclofenac (10 μ M)	48,7 % p*=0.027	92,6 % p**=0.0001	90,0 % p**=0.0271
ASS (0.6mM)	31,5 % p*=0.043	96,7 % p**=0.0027	92,13 % p**=0.0145
Celecoxib (10 μ M)	60.3 % p*=0.043	97,13 % p**=0.0012	72.7 % p**=0.0001
5-ASA (0.65mM)	25.4 %	48.13 % p**=0.0151	n.s.

Tab. 2

2. Spalte: Hemmung der PGE₂-Bildung in HISMF nach Inkubation mit COX-Inhibitoren, bezogen auf unstimulierte HISMF.

3. und 4. Spalte: Hemmung der PGE₂-Bildung in HISMF nach Inkubation mit COX-Inhibitoren und IL-1 α (3. Spalte) bzw. TNF- α (4. Spalte), jeweils bezogen auf IL-1 α - und TNF- α -stimulierte HISMF.

Die PGE₂-Konzentrationsmessung wurde in HISMF-Kulturüberständen mittels ELISA-Technik bestimmt.

*p-Wert verglichen mit unstimulierten HISMF

**p-Wert verglichen mit IL-1 α and TNF- α stimulierten HISMF

n.s.= nicht signifikant

3.9.2 COX-Inhibitoren reduzieren die 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration in HISMF-Überständen, in Gegenwart von IL-1 α und TNF- α sind diese Effekte verstärkt

In unstimulierten HISMF beträgt die 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration 259,1 pg/ml. Nach Stimulation der Zellen mit IL-1 α steigt die Konzentration auf 5184,6 pg/ml, mit TNF- α auf 987,0 pg/ml. Analog zur PGE₂-Konzentrationsbeeinflussung in HISMF-Überständen wird die 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration durch die genannten Arzneistoffe moduliert. Es kann auch hier gezeigt werden, dass sowohl ASS und Diclofenac als auch Celecoxib die 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration in HISMF-Kulturüberständen stark herabsetzen (vgl. Tab. 3). Parallel zu den PGE₂ Ergebnissen reduziert 5-ASA nur schwach (18,3%) die 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration.

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, dass die durch die HISMF-Inkubation mit IL-1 α und TNF- α stark erhöhte 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration durch die gleichzeitige Inkubation mit ASS, Diclofenac und Celecoxib hochsignifikant gesenkt wird (vgl. Tabelle 3). Anzumerken ist, dass bei 5-ASA dieser Effekt nicht beobachtet wird.

Hemmung der 6-keto-PGF _{1α} -Bildung in HISMF	HISMF	HISMF	HISMF
	+ COX-Inhibitor	+ IL-1α (10 ng/ml) + COX-Inhibitor	+ TNF-α (10 ng/ml) + COX-Inhibitor
Diclofenac (10μM)	72.0 % p*=0.037	99.0 % p**=0.0021	96.7 % p**=0,0231
ASS (0.6mM)	58.5 % p*=0.0002	93.9 % p**=0.0412	90.3 % p**=0.0229
Celecoxib (10μM)	58.8 % p*=0.0279	99.27 % p**=0.0079	84.5 % p**=0.0089
5-ASA (0.65mM)	18.3 % p*=n.s.	8.2 % p**=n.s.	n.s.

Tab. 3

2. Spalte: Hemmung der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung in HISMF nach Inkubation mit COX-Inhibitoren, bezogen auf unstimulierte HISMF.

3. und 4. Spalte: Hemmung der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung in HISMF nach Inkubation mit COX-Inhibitoren und IL-1α (3. Spalte) bzw. TNF-α (4. Spalte), jeweils bezogen auf IL-1α- und TNF-α-stimulierte HISMF.

Die 6-keto-PGF_{1α}-Konzentrationsmessung wurde in HISMF-Kulturüberständen mittels ELISA-Technik bestimmt.

*p-Wert verglichen mit unstimulierten HISMF

**p-Wert verglichen mit IL-1α and TNF-α stimulierten HISMF

n.s.= nicht signifikant

3.10 COX-Inhibitoren modulieren die HGF-Protein-Konzentration in HISMF-Überständen

Im Anschluss an die Prostaglandin-Konzentrations-Bestimmungen in HISMF-Überständen soll geklärt werden, ob auch die Konzentration des Wachstumsfaktors HGF durch COX-Inhibitoren moduliert wird. Zur Beantwortung dieser Frage werden HISMF in Gegenwart bzw. Abwesenheit der Zytokine IL-1α und TNF-α mit ASS, Diclofenac, Celecoxib und 5-ASA für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgt die HGF-Konzentrationsbestimmung in den HISMF-Überständen mittels ELISA-Technik.

In unstimulierten HISMF beträgt die HGF-Konzentration 1548,1 pg/ml. Nach Stimulation der Zellen mit IL-1α steigt die Konzentration auf 4374,0 pg/ml, mit TNF-α auf 5302,1 pg/ml.

Die Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst und zeigen, dass ASS und Diclofenac die HGF-Konzentration in HISMF-Kulturüberständen senken. Nach Inkubation sowohl mit IL-1α als auch mit TNF-α kann durch gleichzeitige Stimulation mit ASS, mit Diclofenac und mit Celecoxib die HGF-Konzentration gesenkt werden, während mit 5-ASA die HGF-Konzentration nicht reduziert wird.

Hemmung der HGF-Bildung in HISMF	HISMF		
	HISMF + COX-Inhibitor	+ IL-1 α (10 ng/ml) + COX-Inhibitor	TNF- α (10 ng/ml) + COX-Inhibitor
Diclofenac (10 μ M)	17,3 %	38,3 % p**=0.0007	38,7 % p**=0.0118
ASS (0.6mM)	34,4 % p*=0.0045	19,9 % p**=0.0103	10,4 %
Celecoxib (10 μ M)	23,0 % p*=0.037	36,0 % p**=0.0187	41,8 % p**=0.0038
5-ASA (0.65mM)	16,5 %	n.s.	n.s.

Tab. 4

2. Spalte: Hemmung der HGF-Bildung in HISMF nach Inkubation mit COX-Inhibitoren, bezogen auf unstimulierte HISMF.

3. und 4. Spalte: Hemmung der HGF-Bildung in HISMF nach Inkubation mit COX-Inhibitoren und IL-1 α (3. Spalte) bzw. TNF- α (4. Spalte), jeweils bezogen auf IL-1 α - und TNF- α -stimulierte HISMF.

Die HGF-Konzentrationsmessung wurde in HISMF-Kulturüberständen mittels ELISA-Technik bestimmt.

*p-Wert verglichen mit unstimulierten HISMF

**p-Wert verglichen mit IL-1 α and TNF- α stimulierten HISMF

n.s.= nicht signifikant

3.11 Proinflammatorische Zytokine steigern stark; COX-Inhibitoren senken schwach die COX-2 mRNA-Expression in HISMF

Um das Target COX-2 zu untersuchen, wird mittels TaqManTM-PCR die COX-2 mRNA-Expression in HISMF untersucht. HISMF werden analog zu 3.3.1 kultiviert und mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 α und TNF- α (jeweils 10 μ g/ml) und den COX-Inhibitoren ASS (0.6 mM), Diclofenac (10 μ M), Celecoxib (10 μ M) und 5-ASA (0.65 mM) für jeweils 24 h inkubiert. Die Gesamt-RNA-Isolation erfolgt analog zu 2.2.4.1.

Abb. 30 veranschaulicht in einer Amplifikations-Darstellung, dass IL-1 α (blau-gelbe Kurve) die COX-2 mRNA-Expression gegenüber unstimulierten HISMF um das 75fache steigert (C_T -Wert um 7,5 gesenkt). Im Gegensatz dazu senkt ASS, (pink-Lila Kurve) die COX-2 mRNA-Expression gegenüber unstimulierten HISMF um das 12fache (C_T -Wert um 1,2 erhöht; PE Applied Biosystems, User Bulletin #2, ABI Prism 7700 SDS, 1997).

TNF- α steigert die COX-2 mRNA-Expression um das 25fache, während Diclofenac (8fach), Celecoxib (5fach) und 5-ASA (2fach) die COX-2 mRNA senken (Daten jeweils nicht gezeigt).

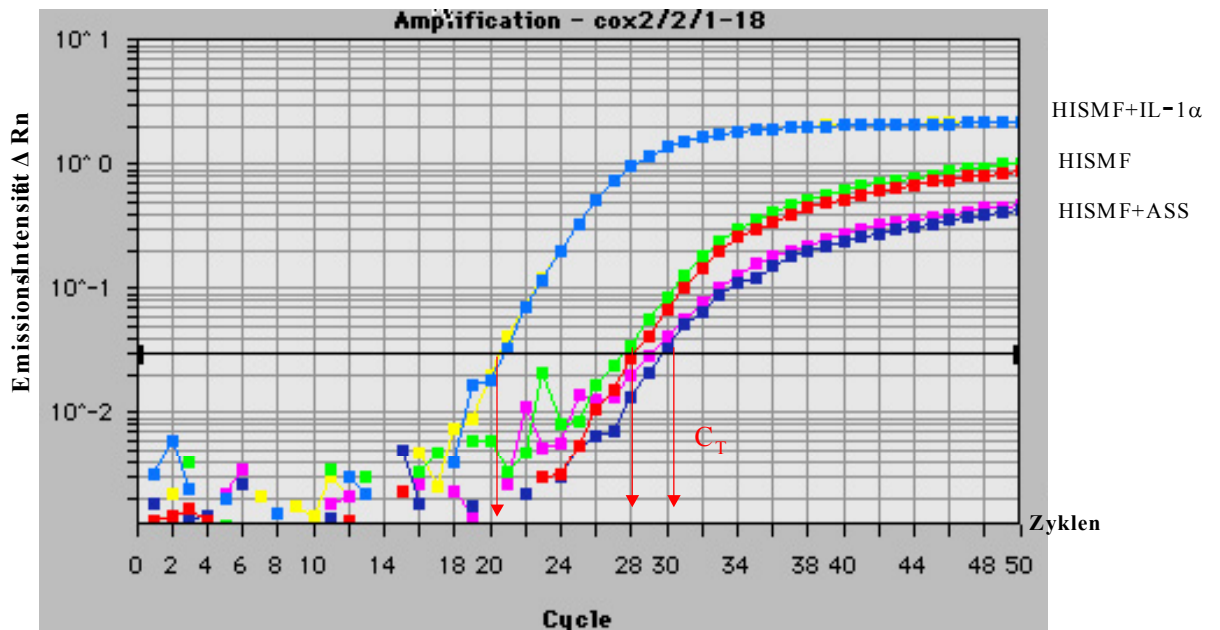


Abb. 30

Effekte von ASS und IL-1 α auf die COX-2 mRNA Expression in HISMF evaluiert durch TaqManTM PCR. HISMF (grün-rote Kurve); HISMF stimuliert mit IL-1 α (blau-gelbe Kurve); HISMF stimuliert mit ASS. (pink-lila Kurve).

4. Diskussion

Bedeutung intestinaler Myofibroblasten für epitheliale Wundheilungsprozesse des Darms

Das Mukosaepithel des Gastrointestinaltraktes ist eine Barriere für schädigende Agentien (Zeit M et al., 1986). Daher ist es essentiell, dass nach Mukosaverletzungen dieser Barrierschutz schnell wieder hergestellt wird und tiefere Mukosaschäden verhindert werden. Dabei spielen die Zellrestitution sowie die Zellproliferation eine entscheidende Rolle. Beide Prozesse werden durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Im Rahmen dieser Dissertation sind hierbei der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), aber auch die Cyclooxygenasen (COX)-1 und COX-2 sowie Prostaglandine untersucht worden. HGF selbst wird u.a. durch die den Epithelzellen benachbarten, unter der Basalmembran gelegenen Myofibroblasten parakrin sezerniert (Bradbury, 1998). Für Myofibroblasten ist bekannt, dass sie an der Bildung der Basalmembran beteiligt sind, die sekretorische Antwort intestinaler Epithelzellen fördern und für die Differenzierung und Morphogenese von Epithelzellen bedeutsam sind. Unzureichend untersucht sind bisher die Einflüsse von Myofibroblasten auf epitheliale Wundheilungsmechanismen.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage beantwortet werden, ob Myofibroblasten die Restitution und Proliferation intestinaler Epithelzellen beeinflussen, und über welche Faktoren bzw. Mechanismen gegebenenfalls diese Modulation vermittelt wird.

Es wurde die Isolation primärer humaner intestinaler subepithelialer Myofibroblasten (HISMF) aus Kolon-Operationsresektaten nach einem modifizierten Protokoll von (Mahida et al., 1997) etabliert. Anhand immunhistochemischer Färbungen konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen den mesenchymalen Marker Vimentin und den Myofibroblastentypischen Marker α -Smooth-Muscle-Aktin exprimieren, während erwartungsgemäß für die epithelialen Cytokeratine ein negativer Befund erhalten wurde. Nach einer Klassifizierung von (Kohnen et al., 1996) und (Schmitt-Graff et al., 1994) handelt es sich bei diesen Primärkulturen um intestinale Myofibroblasten vom VA-Typ (Vimentin/ α -Smooth-Muscle Actin).

In Funktionsexperimenten zur Analyse von Wirkungen mesenchymaler Zellen auf epitheliale Zellen zeigte sich, dass Kulturüberstände von primären intestinalen Myofibroblasten die Proliferation epithelialer Zellen (Caco-2) um 100% steigern. Da bei diesen Untersuchungen Zellkulturüberstände verwendet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der o.g.

Effekt parakrin durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Diese Beobachtung wurde auch bei Proliferations-Untersuchungen, in denen die humane Kolon-Fibroblasten-Zelllinie CCD-18 verwendet wurde, gemacht (Göke et al., 1998b). Auch hier konnte gezeigt werden, dass sowohl in direkten und indirekten Co-Kultur-Experimenten als auch in Untersuchungen mit Kulturüberständen die Proliferation von Epithelzellen gesteigert wird. Bekannt ist, dass Fibroblasten verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β , TGF- α , EGF, bFGF, IGF-II sowie HGF produzieren (Berndt et al., 1995; Border und Noble, 1994; Simmons et al., 1999). Zytokine haben als Mediatoren der zellulären Interaktion eine entscheidende Funktion bei der Initiierung und der Kontrolle von Entzündungsreaktionen in der Darmschleimhaut. Die sogenannten proinflammatorischen Zytokine wie TNF- α , IL-1 α , IL-6 und IFN- γ sind vermehrt bei entzündlichen Prozessen anzutreffen. Ungeklärt war bisher die Frage, ob die HGF-Expression in primären intestinalen Myofibroblasten durch verschiedene Zytokine moduliert wird, und ob darüber hinaus diese eventuelle Beeinflussung der HGF-Expression mit einer Förderung der Restitution bzw. Proliferation von Epithelzellen einhergeht.

In dieser Arbeit wurden primäre intestinale subepitheliale Myofibroblasten mit proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die HGF mRNA-Expression nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 α , TNF- α und IFN- γ dosisabhängig gesteigert wurde. IL-6 hingegen hatte keinen wesentlichen Effekt. Demgegenüber bewirkten die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und insbesondere TGF- β 1 eine hochsignifikante Inhibition der HGF mRNA-Expression. Analog zu den mRNA-Expressionsdaten konnte für die Stimulation von HISMF mit IL-1 α , TNF- α und IFN- γ eine Steigerung der HGF-Protein-Konzentration in den Kulturüberständen gezeigt werden. Es ist zu vermuten, dass die genannten Zytokine sowohl die Proteinsynthese von HGF als auch die Sekretion von HGF in diesen Zellen steigern.

Im Gegensatz zu den stark hemmenden Effekten von IL-4 und TGF- β auf die mRNA-Expression senkten beide Zytokine die HGF-Protein-Expression nur gering. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell auf unterschiedliche Halbwertszeiten von HGF mRNA und HGF-Protein zurückführen. Eine andere mögliche Erklärung liegt darin, dass nur die Regulation der RNA-Expression, nicht aber die Regulation auf der Translationsebene zu HGF-vermindernden Effekten führte.

Die Beobachtung, dass proinflammatorische Zytokine in Kolon-Myofibroblasten die HGF-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene steigern, steht in Übereinstimmung mit Befunden an nicht-intestinalen Fibroblasten. So wurde in Gingiva und Lungenfibroblasten

gezeigt, dass die HGF mRNA-Expression durch Stimulation mit TNF- α , IL-1 α und IL-1 β gesteigert wird (Tamura et al., 1993).

Um der Vermutung nachzugehen, dass die Zytokin-bedingte Steigerung der HGF-Expression in HISMF mit einer Steigerung der Proliferation in Epithelzellen assoziiert ist, wurden Thymidineinbauraten von Caco-2-Zellen bestimmt, die zuvor mit IL-1 α - und TNF- α -stimulierten HISMF-Kulturüberständen inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass die HISMF-Stimulation mit IL-1 α und TNF- α in der Tat im Vergleich zu unstimulierten Myofibroblasten zu einer gesteigerten Caco-2-Zellproliferation führte. Durch Zusatz neutralisierender anti-HGF-Antikörper wurde der durch proinflammatorische Zytokine induzierte proliferationssteigernde Effekt aufgehoben. Demzufolge scheinen die proliferationsfördernden Effekte zytokinstimulierter Myofibroblasten durch HGF vermittelt zu sein. Experimente, in denen der Effekt der Zytokine auf die Proliferation von Caco-2-Zellen untersucht wurde, zeigten, dass der proliferationssteigernde Effekt nicht auf den unmittelbaren Zytokineinfluss zurückzuführen ist; die Proliferation von Caco-2-Zellen, die mit IL-1 α , TNF- α oder IFN- γ direkt stimuliert wurden, wurde nicht wesentlich gesteigert.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Proliferation von Kolon-Epithelzellen *in vitro* durch primäre Kolon-Myofibroblasten via HGF gefördert wird. Diese proliferationsfördernde Myofibroblasten-Effekte werden durch proinflammatorische Zytokine gesteigert. Die Bedeutung von HGF für Wundheilungsprozesse wird durch Untersuchungen an verwundeten Ratten bestätigt. Bei diesen Untersuchungen zeigten sich in Biopsien, aus zuvor mechanisch verwundeten Haut-Fibroblasten des Rattenrückens erhöhte HGF/c-Met-Expressionen (Cowin et al., 2001). Andere Autoren schrieben, dass während der Ulkusheilung in der Mukosa des Rattenmagens die HGF mRNA-Expression in Stromazellen zwischen regenerierenden Drüsen deutlich gesteigert wurde (Schmassmann et al., 1997).

In anschließenden Untersuchungen sollte der Signalkaskadeweg, über den proliferationsfördernde Myofibroblasten-Effekte via HGF parakrin vermittelt werden, charakterisiert werden. Während die Faktoren, welche die Proliferation modulieren, bereits gut untersucht sind, sind die intrazellulären Mechanismen, welche diese epitheliale Antwort initiieren, bislang kaum verstanden. Es ist bekannt, dass HGF nach Bindung und anschließender Phosphorylierung seines Rezeptors c-Met eine Aktivierung von ERK-Kinasen bewirkt, die ihrerseits über Modulation von Transkriptionsfaktoren im Zellkern proliferationssteigernde Effekte auf epitheliale Zellen vermitteln (Boccaccio et al., 1998). Durch Inhibition des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges konnte das Tumor Wachstum

transformierter Darmepithelzellen um mehr als 80% in Mäusen mit Kolon-Karzinomen inhibiert werden. (Sebolt-Leopold et al., 1999).

Um zu überprüfen, ob ebenfalls die gezeigten proliferationsfördernden Myofibroblasten-Effekte auf Kolon-Epithelzellen diesen Signalkaskadeweg aktivieren, wurden Caco-2-Zellen mit Überständen zytokinstimulierter HISMF unter Zusatz des MAP-Kinase-Inhibitors PD98059 (Alessi et al., 1995) inkubiert. Es zeigte sich eine starke Caco-2-Proliferationshemmung. Auch in Gegenwart von LY294002, einem etablierten Phosphatidylinositol-3 (PI₃)-Kinase-Inhibitor (Vlahos et al., 1994), konnten starke inhibitorische Effekte bezüglich der Proliferation beobachtet werden. Zusätzliche Western Blot-Untersuchungen dokumentierten, dass HGF in Myofibroblasten die Phospho ERK-Proteinexpression gegenüber unstimulierten Myofibroblasten steigert, was wiederum durch die zusätzliche Anwesenheit von neutralisierenden anti-HGF-Antikörpern und auch durch PD98059 gehemmt wurde. Ferner steigert HGF in intestinalen Myofibroblasten auch die Expression der PI₃-Kinase. Dieser Effekt konnte einerseits erneut durch gleichzeitige Gabe von neutralisierenden anti-HGF-Antikörpern, aber auch durch LY294002 gehemmt werden.. Sowohl ERK- als auch PI₃-Kinasen sind für die proliferationsfördernden HGF-vermittelten Myofibroblasten-Effekte von Bedeutung (vgl. Abb. 31).

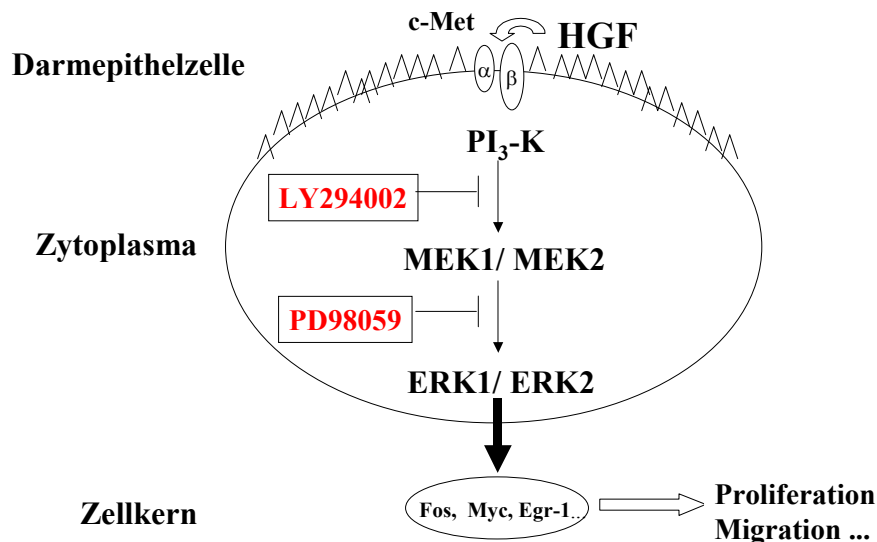


Abb. 31

Schematische Darstellung von PI₃-Kinase- und MAP-Kinase-vermittelten proliferations- und migrationsfördernden HGF-Effekten

Um diese Daten auf den für die Wundheilung ebenfalls wichtigen Prozess der Zellrestitution zu erweitern, wurde untersucht, ob Myofibroblasten auch die Restitution epithelialer Zellen über einen HGF-vermittelten Mechanismus beeinflussen.

Nach Inkubation mit HISMF-Kulturüberständen wurde die Restitution von Caco-2-Zellen auf das Doppelte gesteigert. Nach Stimulation der Caco-2-Zellen mit IL-1 α -, TNF- α - oder IFN- γ - stimulierten Myofibroblasten-Überständen wurde die Restitution der Caco-2-Zellen gegenüber unstimulierten Caco-2-Zellen fast 4-fach gesteigert. Diese restitutionsfördernden Effekte wurden, ähnlich wie bei den Untersuchungen der Proliferation, durch Zugabe von anti-HGF-Antikörpern inhibiert. Die Fähigkeit neutralisierender anti-HGF-Antikörper, die migrationsfördernden Effekte zytokinstimulierter Myofibroblasten abzuschwächen, deutet darauf hin, dass HGF an der Vermittlung restitutionsssteigernder Effekte eine wichtige Rolle spielt. Die Beobachtung, dass die proinflammatorischen Zytokine die Restitution von Caco-2-Zellen selbst nur wenig steigern, veranschaulicht, dass der restitutionsfördernde Stimulus nicht auf direkten Effekten der Zytokine auf die Darmepithelzellen beruht. Dadurch, dass durch Inkubation mit dem neutralisierenden HGF-Antikörpern die zuvor gesteigerte Restitution nahezu auf das Ausgangsniveau unstimulierter Caco-2-Zellen sinkt, scheint sich vielmehr die Annahme zu bestätigen, dass die beobachtete Restitutionssteigerung parakrin über HGF vermittelt wurde.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass proinflammatorische Zytokine die HGF-Expression in Kolon-Myofibroblasten steigern. Die gesteigerte HGF-Expression in Kolon-Myofibroblasten ist mit einer HGF-vermittelten Förderung der Restitution intestinaler Epithelzellen durch subepitheliale Myofibroblasten assoziiert.

In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde berichtet, dass die HGF-Expression in Magenepithelzellen des Kaninchens durch PGE₁ hochreguliert wurde. Anschließende Ko-Kultur-Untersuchungen mit Epithelzellen und Fibroblasten des Kaninchenmagens zeigten migrationsfördernde Effekte auf Magenepithelzellen. Diese Effekte wurden durch Zugabe von anti-HGF-Antikörpern blockiert (Takahashi et al., 1996). HGF scheint somit an der Vermittlung restitutionsfördernder Effekte beteiligt zu sein.

Andere bereits publizierte Daten zeigten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, dass in IEC-6-Zellen der Ratten nach Inkubation mit Überständen primärer Myofibroblasten eine Restitutionssteigerung zu beobachten ist (McKaig et al., 1999). Jedoch schrieben die Autoren nicht HGF, sondern dem immunmodulatorischen Wachstumsfaktor TGF- β die Vermittlung dieses restitutionsfördernden Effektes zu. Eine mögliche Erklärung ist das variable Zytokin-Expressionsspektrum in Myofibroblasten, welches je nach

Aktivierungszustand unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Zudem stellen intestinale Myofibroblasten eine heterogene Zellpopulation dar, die durch eine Variabilität im Expressionsmuster und Expressionsniveau diverser Zytokine in unterschiedlichen Regionen des Gastrointestinaltraktes gekennzeichnet ist. So zeigte sich in diesem Zusammenhang, dass Myofibroblasten je nach deren Lokalisation TGF- β und HGF unterschiedlich exprimieren: TGF- β wird verstärkt von Myofibroblasten aus dem distalen Ileum exprimiert, während HGF der vergleichsweise dominante Faktor in Myofibroblasten des Kolons ist (Plateroti et al., 1998).

Bislang ist der Signalkaskadeweg für die Restitutionsvermittlung noch unzureichend charakterisiert. Es wurde jedoch berichtet, dass durch mechanische Verwundungen von Rattenepithelzellverbänden sowohl der ERK- als auch der p38-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Dieckgraefe et al., 1997)

Zur Untersuchung dieses Zusammenhanges wurde die Caco-2-Zellrestitution nach Inkubation zytokinstimulierter Myofibroblasten in Gegenwart bzw. Abwesenheit von PD98059 verglichen. Parallel zu den zuvor beschriebenen Proliferations-Ergebnissen zeigte sich nach Inkubation mit PD98059 eine signifikante Hemmung der Caco-2-Restitution. Auch die Kultivierung mit LY294002 erbrachte eine signifikante Hemmung der Zellrestitution. Diese letzten Daten geben deutliche Hinweise darauf, dass sowohl MAP- als auch PI₃-Kinasen an den restitutionsfördernden Myofibroblasten-Effekten beteiligt sind.

Es wurden Restitutionsuntersuchungen in Gegenwart von Mitomycin C in proliferationshemmender Dosis durchgeführt. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass die oben beschriebenen restitutionsfördernden Myofibroblasten-Effekte nur durch die Steigerung der Proliferation vorgetäuscht wurden. Mitomycin C ist ein Spindelinhistor, der Zellen in der M-Phase (Mitose) arretiert und daher einen Zellzyklusarrest bzw. Proliferationsstopp bewirkt (Kang et al., 2001). Es zeigte sich, dass die Restitution durch Zusatz von Mitomycin C-haltigen Myofibroblasten-Überständen im Vergleich zu Mitomycin C-freien Überständen nicht wesentlich beeinflusst wurde, was darauf hindeutet, dass die dokumentierten Myofibroblasten-Effekte auf die Restitution von Caco-2-Zellen nicht durch gleichzeitige Proliferationsprozesse überlagert werden.

In letzter Zeit wurde an verschiedenen Organ-Systemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass HGF auch Apoptose-protective-Wirkungen besitzt (Abounader et al., 2002; Gao

et al., 2001; Mildner et al., 2002; Shimada et al., 2000; Wang et al., 2002; Xiao et al., 2001). Aufgrund der nachgewiesenen anti-apoptischen Eigenschaften von HGF stellte sich die Frage, ob auch Myofibroblasten, vermittelt über HGF, die Apoptose von Kolon-Epithelzellen modulieren. Diese Frage ist negativ zu beantworten. Weder unstimulierte noch Zytokin-stimulierte Myofibroblasten zeigten hierauf regulierende Effekte. Möglicherweise scheinen noch weitere Einflussfaktoren von Myofibroblasten für die Regulierung von Apoptose eine Rolle zu spielen. Diese möglichen Faktoren wurden jedoch in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert.

Eine Beteiligung von HGF und seinem Rezeptor c-Met an wundheilungsfördernden Prozessen wurde auch in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Dissertation von Frau M. Veen) gezeigt. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass sowohl die c-Met- und HGF-Expression als auch die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 im Kolon IL-10-defizienter Mäuse (als Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich verstärkt ist.

Eine Forschergruppe aus den USA konnte darüber hinaus kürzlich *in vivo* zeigen, dass eine induzierte Entzündungssituation im Rattendarm nach HGF-Infusion erheblich reduziert wurde (Alavi et al., 2000). Zudem wurde berichtet, dass auch durch lokale HGF-Applikation die gastrale Ulzerationsheilung gefördert wurde. Hierbei wurden erhöhte COX-1- und COX-2-Expressionen beobachtet (Brzozowski et al., 2001).

Die Steigerung der HGF-Expression im entzündeten Darm könnte ein wichtiger Mechanismus für epitheliale Wundheilungsprozesse sein. An diesen Wundheilungsprozessen sind, wie die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, Kolon-Myofibroblasten beteiligt, die über Sekretion von HGF parakrin sowohl die Restitution als auch die Proliferation in intestinalen Epithelzellen steigern. Myofibroblasten übernehmen somit nicht nur die Aufgaben der schon bekannten Strukturbildung, Morphogenese, Differenzierung, Villuskontraktion und sekretorischen Antwort von Darmepithelzellen, sondern tragen auch zu epithelialen Reparaturprozessen bei. Hinzuzufügen ist jedoch, dass Myofibroblasten neben der Eigenschaft als Modulator in regenerativen Prozessen auch vermutlich bei Chronifizierungen entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt sind. Es wurde beobachtet, dass durch eine fortbestehende, nicht rechtzeitig beendete Aktivierung der Myofibroblasten eine vermehrte Kollagenproduktion einhergeht, die die Bildung von Strikturen bzw. Stenosen begünstigt (Apte et al., 1998; Border und Noble, 1994; Friedman, 1997; Graham et al., 1987; Marra et

al., 1997; Stallmach et al., 1992). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob intestinale Myofibroblasten an der Entstehung gastrointestinaler Stromazelltumoren, der Polypenbildung bei Patienten mit familiärer Adenomatosis coli (FAP) sowie der Entstehung sporadischer kolorektaler Karzinome eine Rolle spielen (Powell et al., 1999b)

Einfluss nicht-steroidaler Antiphlogistika auf wundheilungsfördernde Myofibroblasten-Effekte

Klassische nicht-steroidale Antirheumatika, wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS) und Diclofenac, rufen ihre therapeutischen Wirkungen sowohl über Hemmung der Cyclooxygenase-1 als auch der Cyclooxygenase-2 hervor. Die Hemmung der beiden Isoenzyme ist je nach Wirkstoff unterschiedlich stark ausgeprägt. Zu den einhergehenden unerwünschten Nebenwirkungen zählen Schleimhautschädigungen, die als petechiale Blutungen, hämorrhagische Striae, Erosionen und Ulzerationen und sogar massive gastrointestinalen Blutungen oder Perforationen manifest werden können. (Allison et al., 1992; Cheatum et al., 1999; Graham und Smith, 1988; Griffin et al., 1991; Langman, 1989; McCarthy, 1989).

Mit der Entwicklung selektiver COX-2-Hemmer, wie z.B. Celecoxib und Rofecoxib, liegen nunmehr Antiphlogistika und Analgetika vor, die vergleichsweise hochselektiv an COX-2 binden. Idealerweise hemmen selektive COX-2-Inhibitoren nur das COX-2-Isoenzym, das im Rahmen entzündlicher Prozesse induziert wird, während die konstitutive COX-1-Aktivität in therapeutischen Dosierungen nicht wesentlich beeinflusst wird.

Prostaglandine werden nach Freisetzung von Arachidonsäure aus den Zellmembranen durch Phospholipase A₂ und anschließender Umwandlung durch Cyclooxygenase gebildet und übernehmen z.B. im Gastrointestinaltrakt wichtige cytoprotektive Aufgaben, wodurch sie die Integrität der Magen-Darm-Schleimhaut aufrechterhalten (Robert et al., 1979). Ferner sind Prostaglandine, die als Antwort auf inflammatorische Stimuli gebildet werden, Entzündungsmediatoren und spielen eine Rolle bei der Entstehung von Schmerzen und Schwellungen.

Es wird diskutiert, ob Prostaglandine an der Regulation der Proliferation epithelialer Zellen beteiligt sind. So wurde gezeigt, dass exogenes PGE₂ die Proliferation von intestinalen

Magenepithelzellen der Ratte stimuliert (Uribe et al., 1987). Ferner wurden in Stammzellen intestinaler Krypten der Maus nach Verwundung sowohl erhöhte COX-1 mRNA Expressionen als auch erhöhte PGE₂-Konzentrationen gefunden. Diese erhöhten Konzentrationen waren mit einer erhöhten Proliferation intestinaler Krypten-Stammzellen assoziiert (Cohn et al., 1997). Die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Zellproliferation scheint durch Metabolite des Cyclooxygenaseweges vermittelt zu werden, da einerseits die Proliferation mit der *de novo* Expression der COX-2 gekoppelt ist, andererseits eine TGF- α -stimulierte Proliferation durch Inhibitoren der Cyclooxygenase aufgehoben werden kann (DuBois et al., 1994a; DuBois et al., 1994b). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte in Magentumorzellen, dass NSAR durch ERK-2-Hemmung die Zellproliferation inhibieren (Husain et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde in Ösophagus-Epithelzellen des Kaninchens die Proliferation durch exogenes PGE₂ nicht beeinflusst (Jimenez et al., 1998).

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die pharmakologischen Effekte von ASS und Diclofenac im Vergleich zum selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib und 5-Aminosalicylsäure (5-ASA=Mesalazin) auf die durch mit proinflammatorischen Zytokinen stimulierten Myofibroblasten bewirkte Modulation epithelialer Zellproliferation und Zellrestitution charakterisiert. Letztere Substanz ist ein Salicylsäure-Derivat, das in der Therapie und Rezidivprophylaxe chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (v.a. der Colitis ulcerosa) eingesetzt wird.

Nach Inkubation von Myofibroblasten mit den genannten Arzneistoffen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von IL-1 α und TNF- α wurden sowohl die Caco-2-Proliferation als auch deren Restitution unterschiedlich moduliert.

ASS und Diclofenac, aber auch Celecoxib setzten die durch proinflammatorische Zytokine gesteigerte HISMf-vermittelte Förderung der Proliferation und Restitution dosisabhängig nahezu auf das Ausgangsniveau von unstimulierten Caco-2-Zellen herab. Im Gegensatz dazu reduzierte 5-ASA zwar stark die durch TNF- α gesteigerte, aber nur schwach die durch IL-1 α verstärkte HISMf-vermittelte Restitutionssteigerung. Außerdem zeigten 5-ASA-haltige HISMf-Überstände im Gegensatz zu ASS, Diclofenac und Celecoxib keine proliferationshemmenden Effekte

Interessanterweise wurde die Caco-2-Proliferation bei Abwesenheit von IL-1 α und TNF- α nach Inkubation mit ASS-, Diclofenac-, Celecoxib- bzw. 5-ASA-haltigen HISMf-Überständen dosisabhängig schwächer gesenkt als bei Anwesenheit der Zytokine. Auch die Restitution wurde durch ASS, Celecoxib und 5-ASA in Abwesenheit der Zytokine nur

unwesentlich beeinflusst. Nur bei mit Diclofenac stimulierten HISMF-Überständen wurde die Restitution von Caco-2 Zellen dosisabhängig signifikant inhibiert.

Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei entzündlichen Prozessen (hier *in vitro* simuliert durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und TNF- α) die proliferations- und restitutionshemmenden Effekte von Diclofenac-, ASS- und Celecoxib-stimulierten Myofibroblasten-Überständen wesentlich stärker ausgeprägt sind. Die Beobachtung, dass die klassischen NSAR und der selektive COX-2-Inhibitor gleichermaßen epitheliale Wundheilungsprozesse hemmen, steht in Übereinstimmung mit Daten, die in Magen-Epithelzellen erhoben wurden. Hierbei wurde gezeigt, dass durch COX-2-selektive Inhibitoren die Proliferation von Magenepithelzellen im Tiermodell im gleichen Ausmaß wie durch klassische NSAR gehemmt wird (Peskar et al., 2001). Bemerkenswert ist, dass, verglichen mit ASS und Diclofenac, die inhibitorischen Effekte von 5-ASA wesentlich geringer waren.

Die Zytokine IL-1 α oder TNF- α führten zu einer erheblichen Steigerung sowohl der PGE₂-als auch der 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration in HISMF-Überständen. Diese erhöhten Prostaglandin-Konzentrationen wurden durch die Zugabe von ASS, Diclofenac und Celecoxib nahezu auf die Ausgangs-Konzentration von unstimulierten HISMF gesenkt, während bei Inkubation mit 5-ASA eine schwächere Hemmung beobachtet wurde. Anzumerken ist, dass die inhibitorischen Effekte von ASS, Diclofenac und Celecoxib auf die Prostaglandin-Konzentration in Myofibroblasten in Abwesenheit von IL-1 α und TNF- α wesentlich schwächer ausgeprägt waren; 5-ASA zeigte sogar in diesem Zusammenhang keine signifikanten inhibitorischen Effekte.

Für die HGF-Konzentration in HISMF-Kulturüberständen wurden hemmende Effekte beobachtet: ASS, Diclofenac und Celecoxib senkten die HGF-Konzentration, 5-ASA hingegen hatte keine wesentlichen Effekte. In Übereinstimmung mit den Effekten von NSAR auf die Prostaglandin-Konzentration, konnte mittels TaqMan™-PCR darüber hinaus gezeigt werden, dass IL-1 α und TNF- α auch die COX-2 mRNA-Expression stark erhöhen. ASS, Diclofenac, Celecoxib und 5-ASA zeigten schwache inhibitorische Effekte auf die COX-2 mRNA-Expression. Die Beobachtung einer COX-2 mRNA-Regulation durch proinflammatorische Zytokine wurde auch von anderen Autoren beschrieben. Es wurde gezeigt, dass IL-1 α die COX-2 mRNA in Kolon-Myofibroblasten hochreguliert (Mifflin et al., 2002).

Zusammenfassend ist erkennbar, dass Diclofenac, ASS und Celecoxib die durch Myofibroblasten bedingte Steigerung der Proliferation und Restitution von Darmepithelzellen inhibieren. Diese proliferations- und restitutionshemmenden Effekte sind assoziiert mit einer Senkung der PGE₂-6-keto-PGF_{1α}- und HGF-Konzentration in Myofibroblasten, was darauf hindeuten könnte, dass sowohl das bereits diskutierte HGF als auch Prostaglandine an den durch Myofibroblasten vermittelten intestinalen Wundheilungsprozessen beteiligt sind. Darüber hinaus sind die hemmenden Effekte von NSAR bei Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine verstärkt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Proliferation und Restitution im Entzündungszustand durch NSAR noch stärker gehemmt werden.

Interessanterweise zeigte sich für 5-ASA eine wesentlich geringere Hemmung der Proliferation und Restitution. Auch die damit verbundenen Prostaglandin- und HGF-Konzentrationen in Myofibroblasten wurden im Gegensatz zu ASS und Diclofenac schwächer gesenkt.

Noch immer ist der Wirkmechanismus, durch den 5-ASA die Mukosa in der Therapie entzündlicher Darmerkrankungen schützt, nicht vollständig verstanden. Die entzündungshemmenden Eigenschaften von 5-ASA lassen sich nicht über den Weg der Hemmung der Cyclooxygenase erklären, da klassische Cyclooxygenasehemmer trotz chemisch-struktureller Verwandtschaft zu 5-ASA, keinen günstigen Effekt für die Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen besitzen. Für klassische NSAR wurde bei Langzeiteinnahme diesbezüglich gezeigt, dass Ulzerationen des Dünndarms entstehen (Bjarnason et al., 1987; Smale et al., 2001). Ferner wurde gezeigt, dass sich bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen nach NSAR-Einnahme der Entzündungszustand verschlechtert (Kaufmann und Taubin, 1987). In einem Ratten-Modell wurde darüber hinaus gezeigt, dass sich die makroskopischen und histologischen Erscheinungsbilder Indometacin-induzierter Ileum- und Jejunum-Ulzerationen kaum von den entsprechenden Erscheinungsbildern bei Morbus Crohn unterscheiden (Anthony et al., 2000).

Im Rahmen der Aufklärung des Wirkmechanismus von 5-ASA wird dessen hemmende Wirkung auf die 5-Lipoxygenase des Arachidonsäure-Metabolismus diskutiert. Hierbei wurde gezeigt, dass 5-ASA die Bildung von Leukotrien B₄, welches in der entzündeten Mukosa in erhöhter Konzentration vorliegt, gehemmt wird (Ahnfelt-Ronne et al., 1987; Lauritsen et al., 1995; Nielsen und Ahnfelt-Ronne, 1988). Ein weiterer bedeutsamer Wirkmechanismus von 5-ASA scheint auch die Hemmung der Bildung von freien toxischen Sauerstoffradikalen zu sein (Miles und Grisham, 1995; Tamai et al., 1991).

Andere Untersuchungen zeigten, dass 5-ASA immunologische Prozesse durch Hemmung der Bildung von IL-1 β und IL-6 (Mahida et al., 1991; Rachmilewitz et al., 1992), aber auch durch Hemmung der NF- κ B-Aktivität, moduliert (Bantel et al., 2000).

Ein eindeutig aufgeklärter Wirkmechanismus von 5-ASA existiert noch nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 5-ASA im Vergleich zu den klassischen NSAR die durch Myofibroblasten-induzierte Wundheilungsförderung in einem geringeren Ausmaß hemmt. Diese Beobachtung könnte eine mögliche weitere Erklärung für die Mukosaprotektiven Effekte von 5-ASA während der aktiven Phasen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sein.

Es lässt sich vermuten, dass mukosale Entzündungen durch Hemmung der hier gezeigten Proliferation und Restitution durch die Einnahme klassischer NSAR schlechter regenerieren.

Im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wird eine erhöhte Permeabilität des Darmepithels als pathogenetischer Faktor diskutiert (Bjarnason et al., 1983; Hollander et al., 1986; Jenkins et al., 1986; Jenkins et al., 1988; Olaison et al., 1988; Olaison et al., 1989; Olaison et al., 1987). Die Permeabilität der Dün- und Dickdarmmukosa wird u.a. durch den parazellulären Transportweg zwischen den Epithelzellen determiniert. Verantwortlich sind dafür die sog. „tight-junctions“, deren Widerstand gegen eine Permeation durch ihre Länge und die Anzahl der „strands“ bestimmt wird (Bentzel et al., 1987; Madara, 1988; Madara, 1989; Madara, 1991). Es wurde gezeigt, dass eine gesteigerte intestinale Permeabilität die Penetration von Antigenen oder infektiösen Agenzien zur Folge hat. Auch NSAR, so wurde kürzlich berichtet, greifen in dieses Zusammenspiel ein und induzieren eine Steigerung der intestinalen Permeabilität (Bjarnason et al., 1991; Bjarnason et al., 1986), was mit einer nachfolgenden Steigerung der Permeation luminaler Substanzen assoziiert ist. Erwähnenswert ist, dass auch HGF in konfluenten Darmepithelzellverbänden eine Abschwächung des transepithelialen Membranwiderstands bewirkt, was durch Störungen der tight-junction-Zellkontakte hervorgerufen wird (Hollande et al., 2001; Jiang et al., 1999; Muto et al., 2000).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Veränderungen der tight-junction-assoziierten Proteine und eine daraus resultierende Permeabilitätsbeeinflussung auch durch HGF-sezernierende Myofibroblasten hervorgerufen werden. Interessant, aber noch nicht untersucht, ist außerdem die Frage, ob NSAR über Modulation der Myofibroblastenfunktionen in dieses Zusammenspiel mit eingreifen.

Neben den bereits diskutierten wundheilungsreduzierenden Eigenschaften werden NSAR die Eigenschaft einer Risikominimierung bei kolorektalen Karzinomen zugeschrieben. Zahlreiche klinische Studien haben in den letzten Jahren verdeutlicht, dass die Einnahme von NSAR zu einer Reduktion des Risikos für ein kolorektales Karzinom führt (Baron und Greenberg, 1991) (Giovannucci et al., 1995; Giovannucci et al., 1994) (Greenberg et al., 1993) (Logan et al., 1993) (Marcus, 1995) (Marnett, 1992). Auch in Tiermodellen zur Kolon-Karzinogenese konnte gezeigt werden, dass NSAR Frequenz und Anzahl prämaligener und maligner Läsionen vermindern (Barnes et al., 1995; Mereto et al., 1994; Reddy et al., 1993; Reddy et al., 1992; Skinner et al., 1991; Yamaguchi et al., 1991). Des Weiteren zeigten sich in kolorektalen Karzinomen und in Adenomen sowohl erhöhte Konzentrationen von COX-2 als auch erhöhte Konzentrationen an PGE₂ (Albers et al., 1995; Karmali, 1983; Lupulescu, 1978; Narisawa et al., 1990; Neoptolemos et al., 1991; Rigas et al., 1993; Tutton und Barkla, 1980). Andererseits wurde tierexperimentell gezeigt, dass hohe Konzentrationen exogen zugeführter Prostaglandine das Tumor-Zellwachstum und die Zelldifferenzierung von epithelialen Jejunum- und Kolon-Zellen hemmen (Karmali, 1983; Santoro et al., 1976; Tutton und Barkla, 1980).

Zahlreiche Studien belegen, dass sich kolorektale Polypen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) unter Behandlung mit dem NSAR Sulindac in Anzahl und Größe reduzierten (Giardiello et al., 1993), wengleich die Wirkung von Sulindac zu keiner vollständigen Regression der Polypen führte (Labayle et al., 1991; Ladenheim et al., 1995; Nugent et al., 1993; Pasricha et al., 1995; Rigau et al., 1991; Spagnesi et al., 1994; Waddell et al., 1989).

Es wäre interessant zu untersuchen, ob intestinale Myofibroblasten via HGF durch Beeinflussung des COX-1/2-Expressionsmodells an der Entstehung kolorektaler Polypen beteiligt sind.

Es bleibt zu diskutieren, ob sich die bisherigen Ergebnisse zur Wundheilungsförderung von einem *in vitro* auf ein *in vivo* System übertragen lassen. In dem hier verwendeten *in vitro* Modell lassen sich einzelne Wundheilungsprozesse wie die Proliferation und Restitution durch Ausblenden störender Vorgänge fokussieren. Jedoch lassen sich sämtliche Einflussfaktoren eines *in vivo* Systems nicht darstellen. Die gewählte Simulation einer

Entzündungssituation durch proinflammatorische Zytokine kann nicht vollständig das eigenständige, sehr komplexe Zusammenspiel inflammatorischer und immunmodulierender Faktoren wiedergeben.

Ausblick

Die hier beschriebenen Wirkungen primärer intestinaler subepithelialer Myofibroblasten auf intestinale Epithelzellen zeigen wichtige Mechanismen der intestinalen Wundheilung. Es scheint, dass die zuvor nur als Strukturbildner und Vermittler der Morphogenese, Differenzierung und sekretorischer Antwort von Epithelzellen bekannten Myofibroblasten auch wichtige Aufgaben bei der epithelialen Wundheilung übernehmen. Hierbei zu nennen sind die durch HGF vermittelten proliferationsfördernden und migrationsfördernden Effekte von Myofibroblasten auf Epithelzellen. Da diese Effekte bei Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine durch eine erhöhte HGF-Expression in Myofibroblasten verstärkt sind, haben subepitheliale Myofibroblasten möglicherweise die wichtige Aufgabe, proinflammatorische Signale in proregenerative Signale umzuwandeln. Da kürzlich in einem Kolitis-Modell der Ratte gezeigt wurde, dass sich durch HGF-Infusionen das klinische Entzündungsbild erheblich verbessert, scheint HGF ein potentiell wichtiger Faktor bei verschiedenen entzündlichen Darmerkrankungen zu sein. Interessant für die Zukunft sind weiterführende Untersuchungen, die Effekte von Myofibroblasten auf andere Zellen (z.B. Lymphozyten und Mastzellen) charakterisieren.

Insgesamt ergeben diese Zusammenhänge Ansatzpunkte für eine Einsicht in die Prozesse, die für die Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen Bedeutung haben könnten.

Sowohl klassische nicht-steroidale Antiphlogistika, für die als Nebenwirkung gastrointestinale Schädigungen bekannt sind, als auch selektive Cyclooxygenasehemmer greifen in das HGF-vermittelte wundheilungsfördernde Zusammenspiel zwischen Myofibroblasten und Epithelzellen durch Reduktion der Proliferation und Restitution mit ein. Mutmaßlich scheinen sowohl die klassischen als auch die selektiven COX-2-Inhibitoren die intestinale Wundheilung zu verzögern. Währenddessen deuten die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse darauf hin dass 5-ASA die intestinale Wundheilung nicht wesentlich verschlechtert, was eine mögliche Erklärung für die Mukosa-protektiv-Wirkungen von 5-ASA in der Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen sein könnte.

Überzeugende Studien mit NSAR zur Reduktion des Risikos des kolorektalen Karzinoms lassen Hoffnungen aufkeimen, dass bei Patienten mit erhöhtem Risiko bei Fehlen von Kontraindikationen - die Gabe von NSAR zum Therapiestandard werden könnte.

Denkbare neue Ansätze liegen in der Entwicklung von Medikamenten, die gleichermaßen sowohl den Cyclooxygenase- als auch den Lipooxygenaseweg hemmen. Durch Inhibition des Cyclooxygenaseweges wird die Bildung von Substanzen des Lipooxygenase-Weges verstärkt. Durch die Blockade beider Synthesewege könnten unerwünschte bronchokonstriktorische und vasokonstriktorische Begleiterscheinungen, ausgelöst durch Leukotriene, vermindert werden.

5. Zusammenfassung

Nach Mukosaverletzung des Darms mit der Folge von Epithelzellverlusten, z.B. durch Erosionen, Ulzerationen, bei chronischen entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch bei Infektionen durch enteropathogene Mikroorganismen, ist eine schnelle Wiederherstellung der Epithelkontinuität essentiell. Hierbei sind zwei Wundheilungsprozesse von wichtiger Bedeutung: die Migration und die Proliferation. Beide Prozesse werden über eine Vielzahl von Einzelfaktoren (z.B. Fettsäuren, Polyamine, Zytokine, Trefoilpeptide und Wachstumsfaktoren) reguliert. Der Einfluss von direkt dem Epithel benachbarten Myofibroblasten auf die Regulation der Migration und Proliferation ist jedoch noch unzureichend charakterisiert und ist im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht worden.

Es wurde ein *in vitro* Modell verwendet, bei dem intestinale Epithelzellen (Caco-2-Zellen) mit konditioniertem Medium primärer intestinaler subepithelialer Myofibroblasten inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass Myofibroblasten sowohl die Proliferation als auch die Restitution intestinaler Epithelzellen stimulieren. Diese Effekte werden über den durch Myofibroblasten parakrin sezernierten Hepatozytenwachstumsfaktor HGF vermittelt. In Zytokin-Regulations-Untersuchungen konnte evaluiert werden, dass unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , TNF- α und IFN- γ sowohl die HGF- RNA- als auch die HGF- Proteinkonzentration in primären intestinalen subepithelialen Myofibroblasten gesteigert wird. Demgegenüber senkten die antiinflammatorische Zytokine IL-4 und TGF- β 1 die mRNA-Expression. Die durch proinflammatorische Zytokine bedingte Steigerung der HGF-Konzentration bewirkte konsekutiv eine weiter verstärkte Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen. Diese Myofibroblasten-induzierten Effekte sind durch ERK1/2 und PI₃- Kinasen vermittelt, da in Gegenwart etablierter ERK1/2 und PI₃-Kinase-Inhibitoren diese Effekte erheblich reduziert wurden.

Die Steigerung der HGF-Expression im entzündeten Darm ist ein wichtiger Mechanismus zur Förderung von Wundheilungsprozessen. In dieser Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass Myofibroblasten durch Hochregulation der HGF-Expression nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in der Lage sind, proinflammatorische Signale in proregeneratorische Signale umzuleiten.

Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) zeigen neben ihren analgetischen, antiphlogistischen und antipyretischen Eigenschaften auch Effekte auf epitheliale

Schutzfunktionen (Steigerung der epithelialen Permeabilität, verminderte Epithelproliferation). Der Einfluss von NSAR auf die Myofibroblasten-vermittelte Wundheilungsförderung wurde bislang nicht untersucht und war ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit.

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Acetylsalicylsäure, Diclofenac und der COX-2-selektive Inhibitor Celecoxib gleichermaßen die Wundheilungsförderung von intestinalen Epithelzellen senken, wenn diese gleichzeitig mit Zytokin-konditionierten Myofibroblasten-Überständen behandelt werden. In diesem Modell sind die Effekte von 5-Aminosalicylsäure auf die Restitution schwächer ausgeprägt. Die restitutions- und proliferationsinhibierenden Effekte der NSAR sind gekoppelt mit einer Reduktion der Prostaglandin (PG)_{E2}- und 6-keto-PGF_{1α}- sowie HGF-Konzentration in Myofibroblasten Kultur-Überständen. Bei Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine zeigten NSAR keine signifikante Beeinflussung der Restitution und Proliferation von Darmepithelzellen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass klassische NSAR, im Gegensatz zu 5-ASA, in einem *in vivo*-Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen den Krankheitsverlauf verschlechtern.

6. Literaturverzeichnis

- Abounader, R., Lal, B., Luddy, C., Koe, G., Davidson, B., Rosen, E. M., und Lattera, J. (2002). In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *Faseb J* 16, 108-110.
- Acra, S. A., Bulus, N., Bogatcheva, G., Coffey, R. J., und Barnard, J. A. (1998). Increased intestinal epithelial proliferation in metallothioneine-transforming growth factor alpha transgenic mice. *Regul Pept* 74, 105-112.
- Ahnfelt-Ronne, I., Nielsen, O. H., Bukhave, K., und Elmgreen, J. (1987). Sulfasalazine and its anti-inflammatory metabolite, 5-aminosalicylic acid: effect on arachidonic acid metabolism in human neutrophils, and free radical scavenging. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B, 918-922.
- Alavi, K., Schwartz, M., Prasad, R., und Palazzo, J. (2000). Novel use of hepatocyte growth factor in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118, A 2226
- Albers, T. M., Lomakina, I., und Moore, R. P. (1995). Fate of polarized membrane components and evidence for microvillus disassembly on migrating enterocytes during repair of native intestinal epithelium. *Lab Invest* 73, 139-148.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., und Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270, 27489-27494.
- Allison, M. C., Howatson, A. G., Torrance, C. J., Lee, F. D., und Russell, R. I. (1992). Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 327, 749-754.
- Anderson, J. M., Fanning, A. S., Lapierre, L., und Van Itallie, C. M. (1995). Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGuKs) of the tight junction. *Biochem Soc Trans* 23, 470-475.
- Anthony, A., Pounder, R. E., Dhillon, A. P., und Wakefield, A. J. (2000). Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 241-245.
- Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C., und Wilson, J. S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43, 128-133.
- Balda, M. S., Fallon, M. B., Van Itallie, C. M., und Anderson, J. M. (1992). Structure, regulation, and pathophysiology of tight junctions in the gastrointestinal tract. *Yale J Biol Med* 65, 725-735; discussion 737-740.
- Bamba, H., Ota, S., Kato, A., und Matsuzaki, F. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may delay the repair of gastric mucosa by suppressing prostaglandin-mediated increase of hepatocyte growth factor production. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 567-571.
- Bantel, H., Berg, C., Vieth, M., Stolte, M., Kruis, W., und Schulze-Osthoff, K. (2000). Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 95, 3452-3457.
- Barnard, J. A., Beauchamp, R. D., Coffey, R. J., und Moses, H. L. (1989). Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1578-1582.
- Barnard, J. A., Beauchamp, R. D., Russell, W. E., Dubois, R. N., und Coffey, R. J. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 108, 564-580.
- Barnes, C. J., Lee, M., Hardman, W. E., und Cameron, I. L. (1995). Aspirin, age, and proximity to lymphoid nodules influence cell proliferation parameters in rat colonic crypts. *Cell Prolif* 28, 59-71.

- Baron, J. A., and Greenberg, E. R. (1991). Could aspirin really prevent colon cancer? *N Engl J Med* 325, 1644-1646.
- Beer, H. D., Gassmann, M. G., Munz, B., Steiling, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., and Werner, S. (2000). Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5, 34-39.
- Bentzel, C. J., Fromm, M., Palant, C. E., and Hegel, U. (1987). Protamine alters structure and conductance of *Necturus* gallbladder tight junctions without major electrical effects on the apical cell membrane. *J Membr Biol* 95, 9-20.
- Berndt, A., Kosmehl, H., Mandel, U., Gabler, U., Luo, X., Celeda, D., Zardi, L., and Katenkamp, D. (1995). TGF beta and bFGF synthesis and localization in Dupuytren's disease (nodular palmar fibromatosis) relative to cellular activity, myofibroblast phenotype and oncofetal variants of fibronectin. *Histochem J* 27, 1014-1020.
- Berschneider, H. M., and Powell, D. W. (1992). Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J Clin Invest* 89, 484-489.
- Bertran, X., Mane, J., Fernandez-Banares, F., Castella, E., Bartoli, R., Ojanguren, I., Esteve, M., and Gassull, M. A. (1996). Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 38, 899-904.
- Bjarnason, I., Fehilly, B., Smethurst, P., Menzies, I. S., and Levi, A. J. (1991). Importance of local versus systemic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in increasing small intestinal permeability in man. *Gut* 32, 275-277.
- Bjarnason, I., Hayllar, J., MacPherson, A. J., and Russell, A. S. (1993). Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 104, 1832-1847.
- Bjarnason, I., O'Morain, C., Levi, A. J., and Peters, T. J. (1983). Absorption of 51chromium-labeled ethylenediaminetetraacetate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 85, 318-322.
- Bjarnason, I., Williams, P., Smethurst, P., Peters, T. J., and Levi, A. J. (1986). Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut* 27, 1292-1297.
- Bjarnason, I., Zanelli, G., Smith, T., Prouse, P., Williams, P., Smethurst, P., Delacey, G., Gumpel, M. J., and Levi, A. J. (1987). Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* 93, 480-489.
- Blikslager, A. T., Roberts, M. C., Rhoads, J. M., and Argenzio, R. A. (1997). Prostaglandins I2 and E2 have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum. *J Clin Invest* 100, 1928-1933.
- Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391, 285-288.
- Booth, C., and Potten, C. S. (1995). Effects of IL-11 on the growth of intestinal epithelial cells in vitro. *Cell Prolif* 28, 581-594.
- Border, W. A., and Noble, N. A. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331, 1286-1292.
- Botting, R. M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* 31 Suppl 5, S202-210.
- Bradbury, J. (1998). A two-pronged approach to the clinical use of HGF. *Lancet* 351, 272.
- Brzozowski, T., Konturek, P. C., Konturek, S. J., Schuppan, D., Drozdowicz, D., Kwiecien, S., Majka, J., Nakamura, T., and Hahn, E. (2001). Effect of local application of growth factors on gastric ulcer healing and mucosal expression of cyclooxygenase-1 and -2. *Digestion* 64, 15-29.

- Burns, A. R., Simon, S. I., Kukielka, G. L., Rowen, J. L., Lu, H., Mendoza, L. H., Brown, E. S., Entman, M. L., and Smith, C. W. (1996). Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts. *J Immunol* *156*, 3389-3401.
- Cereijido, M., Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R. G., Gallardo, J. M., Garcia-Villegas, R., and Valdes, J. (1993). The making of a tight junction. *J Cell Sci Suppl* *17*, 127-132.
- Chan, C. C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Ford-Hutchinson, A. W., Forrest, M. J., Gauthier, J. Y., *et al.* (1999). Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* *290*, 551-560.
- Cheatum, D. E., Arvanitakis, C., Gumpel, M., Stead, H., and Geis, G. S. (1999). An endoscopic study of gastroduodenal lesions induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Ther* *21*, 992-1003.
- Chen, K., Nezu, R., Wasa, M., Sando, K., Kamata, S., Takagi, Y., and Okada, A. (1999). Insulin-like growth factor-1 modulation of intestinal epithelial cell restitution. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* *23*, S89-92.
- Ciacci, C., Lind, S. E., and Podolsky, D. K. (1993a). Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* *105*, 93-101.
- Ciacci, C., Mahida, Y. R., Dignass, A., Koizumi, M., and Podolsky, D. K. (1993b). Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* *92*, 527-532.
- Citi, S. (1993). The molecular organization of tight junctions. *J Cell Biol* *121*, 485-489.
- Clark, K. E., Ryan, M. J., and Brody, M. J. (1973). Effects of prostaglandins E1 and F2alpha on uterine hemodynamics and motility. *Adv Biosci* *9*, 779-782.
- Coffey, R. J., Romano, M., and Goldenring, J. (1995). Roles for transforming growth factor-alpha in the stomach. *J Clin Gastroenterol* *21 Suppl 1*, S36-39.
- Cohn, S. M., Schloemann, S., Tessner, T., Seibert, K., and Stenson, W. F. (1997). Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest* *99*, 1367-1379.
- Covell, D. A., Jr., and Herring, S. W. (1995). Periosteal migration in the growing mandible: an animal model. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* *108*, 22-29.
- Cowin, A. J., Kallincos, N., Hatzirodos, N., Robertson, J. G., Pickering, K. J., Couper, J., and Belford, D. A. (2001). Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. *Cell Tissue Res* *306*, 239-250.
- Crowston, J. G., Salmon, M., Khaw, P. T., and Akbar, A. N. (1997). T-lymphocyte-fibroblast interactions. *Biochem Soc Trans* *25*, 529-531.
- Davies, G. R., Wilkie, M. E., and Rampton, D. S. (1993). Effects of metronidazole and misoprostol on indomethacin-induced changes in intestinal permeability. *Dig Dis Sci* *38*, 417-425.
- Delehedde, M., Sergeant, N., Lyon, M., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of rat mammary fibroblasts through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. *Eur J Biochem* *268*, 4423-4429.
- Dieckgraefe, B. K., Weems, D. M., Santoro, S. A., and Alpers, D. H. (1997). ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* *233*, 389-394.
- Dignass, A. U., Lynch-Devaney, K., and Podolsky, D. K. (1994a). Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* *202*, 701-709.
- Dignass, A. U., and Podolsky, D. K. (1993). Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* *105*, 1323-1332.

- Dignass, A. U., Stow, J. L., and Babyatsky, M. W. (1996). Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta. *Gut* 38, 687-693.
- Dignass, A. U., Tsunekawa, S., and Podolsky, D. K. (1994b). Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 106, 1254-1262.
- Donnellan, W. L., and Beal, J. M. (1966). Early pathologic changes in ulcerative colitis. Their relation to surgical complications. *Am J Surg* 111, 107-113.
- DuBois, R. N., Awad, J., Morrow, J., Roberts, L. J., 2nd, and Bishop, P. R. (1994a). Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest* 93, 493-498.
- DuBois, R. N., Tsujii, M., Bishop, P., Awad, J. A., Makita, K., and Lanahan, A. (1994b). Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 266, G822-827.
- Ducharme, F., Hicks, G., and Kakuma, R. (2002). Addition of anti-leukotriene agents to inhaled corticosteroids for chronic asthma (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev*, CD003133.
- Duleba, A. J., Pehlivan, T., Carbone, R., and Spaczynski, R. Z. (2001). Activin stimulates proliferation of rat ovarian thecal-interstitial cells. *Biol Reprod* 65, 704-709.
- Emami, S., Chastre, E., Nizard, S., Di Gioia, Y., Barbu, V., Taillemite, J. L., Ito, S., and Gespach, C. (1990). Immortalization and neoplastic transformation of fetal rat intestinal epithelial cells: morphological and cytogenetic analysis, (proto)oncogene expression and effect of gamma-interferon on cell growth. *Digestion* 46 Suppl 2, 74-91.
- Erickson, B. A., Longo, W. E., Panesar, N., Mazuski, J. E., and Kaminski, D. L. (1999). The effect of selective cyclooxygenase inhibitors on intestinal epithelial cell mitogenesis. *J Surg Res* 81, 101-107.
- Fantidis, P., Fernandez-Ortiz, A., Aragoncillo, P., Perez De Prada, T., Sanmartin, M., Lopez, J., Sabate, M., Escaned, J., Alfonso, F., Hernandez, R., *et al.* (2001). [Effect of cAMP on the function of endothelial cells and fibromuscular proliferation after the injury of the carotid and coronary arteries in a porcine model]. *Rev Esp Cardiol* 54, 981-989.
- Faussone Pellegrini, M. S., Cortesini, C., and Romagnoli, P. (1977). [Ultrastructure of the tunica muscularis of the cardiac portion of the human esophagus and stomach, with special reference to the so-called Cajal's interstitial cells]. *Arch Ital Anat Embriol* 82, 157-177.
- Feil, W., Klimesch, S., Karner, P., Wenzl, E., Starlinger, M., Lacy, E. R., and Schiessel, R. (1989a). Importance of an alkaline microenvironment for rapid restitution of the rabbit duodenal mucosa in vitro. *Gastroenterology* 97, 112-122.
- Feil, W., Lacy, E. R., Wong, Y. M., Burger, D., Wenzl, E., Starlinger, M., and Schiessel, R. (1989b). Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. *Gastroenterology* 97, 685-701.
- Feil, W., Wenzl, E., Vattay, P., Starlinger, M., Sogukoglu, T., and Schiessel, R. (1987). Repair of rabbit duodenal mucosa after acid injury in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 92, 1973-1986.
- Fiocchi, C. (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 273, G769-775.
- Forstermann, U., Boissel, J. P., and Kleinert, H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J* 12, 773-790.
- Friedman, S. L. (1997). Closing in on the signals of hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 112, 1406-1409.
- Fritsch, C., Simon-Assmann, P., Keding, M., and Evans, G. S. (1997). Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology* 112, 826-838.

- Fromm, M., Palant, C. E., Bentzel, C. J., und Hegel, U. (1985). Protamine reversibly decreases paracellular cation permeability in *Necturus* gallbladder. *J Membr Biol* 87, 141-150.
- Fromm, M., Tykocinski, M., Schulzke, J. D., Hegel, U., und Bentzel, C. J. (1990). pH dependence of protamine action on apical membrane permeability in *Necturus* gallbladder epithelium. *Biochim Biophys Acta* 1027, 179-184.
- Fukamachi, H., Ichinose, M., Tsukada, S., Kakei, N., Suzuki, T., Miki, K., Kurokawa, K., und Masui, T. (1994). Hepatocyte growth factor region specifically stimulates gastro-intestinal epithelial growth in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1445-1451.
- Gabbiani, G. (1996). The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 192, 708-711.
- Gao, M., Fan, S., Goldberg, I. D., Laterra, J., Kitsis, R. N., und Rosen, E. M. (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor blocks the mitochondrial pathway of apoptosis signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem* 276, 47257-47265.
- Ghatei, M. A., Goodlad, R. A., Taheri, S., Mandir, N., Brynes, A. E., Jordinson, M., und Bloom, S. R. (2001). Proglucagon-derived peptides in intestinal epithelial proliferation: glucagon-like peptide-2 is a major mediator of intestinal epithelial proliferation in rats. *Dig Dis Sci* 46, 1255-1263.
- Giardiello, F. M., Hamilton, S. R., Krush, A. J., Piantadosi, S., Hyland, L. M., Celano, P., Booker, S. V., Robinson, C. R., und Offerhaus, G. J. (1993). Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 328, 1313-1316.
- Ginty, D. D., Osborne, D. L., und Seidel, E. R. (1989). Putrescine stimulates DNA synthesis in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 257, G145-150.
- Giovannucci, E., Egan, K. M., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., und Speizer, F. E. (1995). Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333, 609-614.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., und Willett, W. C. (1994). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 121, 241-246.
- Göke, M., Kanai, M., und Podolsky, D. K. (1998). Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 274, G809-818.
- Goke, M., und Podolsky, D. K. (1996). Regulation of the mucosal epithelial barrier. *Baillieres Clin Gastroenterol* 10, 393-405.
- Graham, D. Y., und Smith, J. L. (1988). Gastrointestinal complications of chronic NSAID therapy. *Am J Gastroenterol* 83, 1081-1084.
- Greenberg, E. R., Baron, J. A., Freeman, D. H., Jr., Mandel, J. S., und Haile, R. (1993). Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The Polyp Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst* 85, 912-916.
- Griffin, M. R., Piper, J. M., Daugherty, J. R., Snowden, M., und Ray, W. A. (1991). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and increased risk for peptic ulcer disease in elderly persons. *Ann Intern Med* 114, 257-263.
- Guevara, N. V., Kim, H. S., Antonova, E. I., und Chan, L. (1999). The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5, 335-339.
- Gumbiner, B. (1987). Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 253, C749-758.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Guo, Y. S., Narayan, S., Yallampalli, C., und Singh, P. (1992). Characterization of insulinlike growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 102, 1101-1108.
- Haffen, K., Kedinger, M., und Simon-Assmann, P. (1987). Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6, 14-23.

- Hahn, U., Schuppan, D., Hahn, E. G., Merker, H. J., and Riecken, E. O. (1987). Intestinal cells produce basement membrane proteins in vitro. *Gut* 28, 143-151.
- Halttunen, T., Marttinen, A., Rantala, I., Kainulainen, H., and Maki, M. (1996). Fibroblasts and transforming growth factor beta induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology* 111, 1252-1262.
- Hammerbeck, D. M., and Brown, D. R. (1996). Presence of immunocytes and sulfidopeptide leukotrienes in the inflamed guinea pig distal colon. *Inflammation* 20, 413-425.
- Hellerbrand, Wang, S. C., Tsukamoto, H., Brenner, D. A., and Rippe, R. A. (1996). Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 24, 670-676.
- Hendriks, C. (1971). Effect of PGE 2 and PGF 2 alpha on uterine contractility. *Ann N Y Acad Sci* 180, 528-530.
- Hinterleitner, T. A., Saada, J. I., Berschneider, H. M., Powell, D. W., and Valentich, J. D. (1996). IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl-secretion in T84 cells. *Am J Physiol* 271, C1262-1268.
- Hirokawa, M., Miura, S., Shigematsu, T., Yoshida, H., Hokari, R., Higuchi, H., Kurose, I., Kimura, H., Saito, H., Nakaki, T., and Ishii, H. (1997). Pressure stimulates proliferation and DNA synthesis in rat intestinal epithelial cells. *Life Sci* 61, 667-672.
- Hogaboam, C. M., Smith, R. E., and Kunkel, S. L. (1998). Dynamic interactions between lung fibroblasts and leukocytes: implications for fibrotic lung disease. *Proc Assoc Am Physicians* 110, 313-320.
- Hollande, F., Blanc, E. M., Bali, J. P., Whitehead, R. H., Pelegrin, A., Baldwin, G. S., and Choquet, A. (2001). HGF regulates tight junctions in new nontumorigenic gastric epithelial cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G910-921.
- Hollander, D., Vadheim, C. M., Brettholz, E., Petersen, G. M., Delahunty, T., and Rotter, J. I. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 105, 883-885.
- Horie-Sakata, K., Shimada, T., Hiraishi, H., and Terano, A. (1998). Role of cyclooxygenase 2 in hepatocyte growth factor-mediated gastric epithelial restitution. *J Clin Gastroenterol* 27 Suppl 1, S40-46.
- Housley, R. M., Morris, C. F., Boyle, W., Ring, B., Biltz, R., Tarpley, J. E., Aukerman, S. L., Devine, P. L., Whitehead, R. H., and Pierce, G. F. (1994). Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 94, 1764-1777.
- Hubner, G., Alzheimer, C., and Werner, S. (1999). Activin: a novel player in tissue repair processes. *Histol Histopathol* 14, 295-304.
- Husain, S. S., Szabo, I. L., Pai, R., Soreghan, B., Jones, M. K., and Tarnawski, A. S. (2001). MAPK (ERK2) kinase--a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth. *Life Sci* 69, 3045-3054.
- Igawa, T., Kanda, S., Kanetake, H., Saitoh, Y., Ichihara, A., Tomita, Y., and Nakamura, T. (1991). Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 831-838.
- Jasleen, J., Shimoda, N., Shen, E. R., Tavakkolizadeh, A., Whang, E. E., Jacobs, D. O., Zinner, M. J., and Ashley, S. W. (2000). Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* 90, 13-18.
- Jenkins, R. T., Goodacre, R. L., Rooney, P. J., Bienenstock, J., Sivakumaran, T., and Walker, W. H. (1986). Studies of intestinal permeability in inflammatory diseases using polyethylene glycol 400. *Clin Biochem* 19, 298-302.
- Jenkins, R. T., Ramage, J. K., Jones, D. B., Collins, S. M., Goodacre, R. L., and Hunt, R. H. (1988). Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. *Clin Invest Med* 11, 151-155.

- Jiang, W. G., and Hiscox, S. (1997). Hepatocyte growth factor/scatter factor, a cytokine playing multiple and converse roles. *Histol Histopathol* *12*, 537-555.
- Jiang, W. G., Martin, T. A., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Mansel, R. E. (1999). Hepatocyte growth factor/scatter factor decreases the expression of occludin and transendothelial resistance (TER) and increases paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* *181*, 319-329.
- Jimenez, P., Lanas, A., Piazuelo, E., and Esteva, F. (1998). Effect of growth factors and prostaglandin E2 on restitution and proliferation of rabbit esophageal epithelial cells. *Dig Dis Sci* *43*, 2309-2316.
- Jones, M. K., Sasaki, E., Halter, F., Pai, R., Nakamura, T., Arakawa, T., Kuroki, T., and Tarnawski, A. S. (1999). HGF triggers activation of the COX-2 gene in rat gastric epithelial cells: action mediated through the ERK2 signaling pathway. *Faseb J* *13*, 2186-2194.
- Joyce, N. C., Haire, M. F., and Palade, G. E. (1987). Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology* *92*, 68-81.
- Kaiser, G. C., and Polk, D. B. (1997). Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* *112*, 1231-1240.
- Kang, S. G., Chung, H., Yoo, Y. D., Lee, J. G., Choi, Y. I., and Yu, Y. S. (2001). Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: apoptosis and cell cycle arrest. *Curr Eye Res* *22*, 174-181.
- Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J., Riendeau, D., Mancini, J., Evans, J., and O'Neill, G. (1996). Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* *111*, 445-454.
- Karmali, R. A. (1983). Prostaglandins and cancer. *CA Cancer J Clin* *33*, 322-332.
- Katz, K. D., Hollander, D., Vadheim, C. M., McElree, C., Delahunty, T., Dadufalza, V. D., Krugliak, P., and Rotter, J. I. (1989). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* *97*, 927-931.
- Kaufmann, H. J., and Taubin, H. L. (1987). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* *107*, 513-516.
- Kaye, G. I., Lane, N., and Pascal, R. R. (1968). Colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. II. Fine structural aspects of normal rabbit and human colon. *Gastroenterology* *54*, 852-865.
- Kedinger, M., Simon-Assmann, P., Alexandre, E., and Haffen, K. (1987). Importance of a fibroblastic support for in vitro differentiation of intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids. *Cell Differ* *20*, 171-182.
- Kitta, K., Day, R. M., Ikeda, T., and Suzuki, Y. J. (2001). Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* *31*, 902-910.
- Knittel, T., Aurisch, S., Neubauer, K., Eichhorst, S., and Ramadori, G. (1996). Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol* *149*, 449-462.
- Kohnen, G., Kertschanska, S., Demir, R., and Kaufmann, P. (1996). Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* *105*, 415-429.
- Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., and Herschman, H. R. (1991). TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* *266*, 12866-12872.
- Kurokawa, M., Lynch, K., and Podolsky, D. K. (1987). Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* *142*, 775-782.
- Labayle, D., Fischer, D., Vielh, P., Drouhin, F., Pariente, A., Bories, C., Duhamel, O., Troussset, M., and Attali, P. (1991). Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* *101*, 635-639.

- Ladenheim, J., Garcia, G., Titzer, D., Herzenberg, H., Lavori, P., Edson, R., and Omary, M. B. (1995). Effect of sulindac on sporadic colonic polyps. *Gastroenterology* 108, 1083-1087.
- Langman, M. J. (1989). Epidemiologic evidence on the association between peptic ulceration and antiinflammatory drug use. *Gastroenterology* 96, 640-646.
- Lauritsen, K., Laursen, L. S., Kjeldsen, J., Bukhave, K., Hansen, T. K., and Rask-Madsen, J. (1995). Effects of mesalazine on the formation of lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Adv Exp Med Biol* 371B, 1301-1306.
- Leahy, K. M., Ornberg, R. L., Wang, Y., Zweifel, B. S., Koki, A. T., and Masferrer, J. L. (2002). Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 62, 625-631.
- Lipkin, M., and Newmark, H. (1985). Effect of added dietary calcium on colonic epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer. *N Engl J Med* 313, 1381-1384.
- Logan, R. F., Little, J., Hawtin, P. G., and Hardcastle, J. D. (1993). Effect of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas: case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. *Bmj* 307, 285-289.
- Lu, L., Reinach, P. S., and Kao, W. W. (2001). Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med* (Maywood) 226, 653-664.
- Luk, G. D., and Baylin, S. B. (1984). Inhibition of intestinal epithelial DNA synthesis and adaptive hyperplasia after jejunectomy in the rat by suppression of polyamine biosynthesis. *J Clin Invest* 74, 698-704.
- Lupton, J. R., Coder, D. M., and Jacobs, L. R. (1985). Influence of luminal pH on rat large bowel epithelial cell cycle. *Am J Physiol* 249, G382-388.
- Lupulescu, A. (1978). Enhancement of carcinogenesis by prostaglandins in male albino Swiss mice. *J Natl Cancer Inst* 61, 97-106.
- Madara, J. L. (1988). Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell* 53, 497-498.
- Madara, J. L. (1989). Loosening tight junctions. Lessons from the intestine. *J Clin Invest* 83, 1089-1094.
- Madara, J. L. (1991). Epithelial: Biological principles of organization *Textbook of Gastroenterology*, 102-118 (Philadelphia).
- Mahida, Y. R., Beltinger, J., Makh, S., Göke, M., Gray, T., Podolsky, D. K., and Hawkey, C. J. (1997). Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol* 273, G1341-1348.
- Mahida, Y. R., Lamming, C. E., Gallagher, A., Hawthorne, A. B., and Hawkey, C. J. (1991). 5-Aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 32, 50-54.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Marchbank, T., Westley, B. R., May, F. E., Calnan, D. P., and Playford, R. J. (1998). Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* 185, 153-158.
- Marcus, A. J. (1995). Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer. *N Engl J Med* 333, 656-658.
- Marnett, L. J. (1992). Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 52, 5575-5589.
- Marra, F., Gentilini, A., Pinzani, M., Choudhury, G. G., Parola, M., Herbst, H., Dianzani, M. U., Laffi, G., Abboud, H. E., and Gentilini, P. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 112, 1297-1306.

- Marra, F., Grandaliano, G., Valente, A. J., und Abboud, H. E. (1995). Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology* 22, 780-787.
- Mason, R. J., McCormick-Shannon, K., Rubin, J. S., Nakamura, T., und Leslie, C. C. (1996). Hepatocyte growth factor is a mitogen for alveolar type II cells in rat lavage fluid. *Am J Physiol* 271, L46-53.
- Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K., und Nakamura, T. (1991). Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Exp Cell Res* 196, 114-120.
- McCarthy, D. M. (1989). Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced ulcers: management by traditional therapies. *Gastroenterology* 96, 662-674.
- McCormack, S. A., Blanner, P. M., Zimmerman, B. J., Ray, R., Poppleton, H. M., Patel, T. B., und Johnson, L. R. (1998). Polyamine deficiency alters EGF receptor distribution and signaling effectiveness in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 274, C192-205.
- McKaig, B. C., Makh, S. S., Hawkey, C. J., Podolsky, D. K., und Mahida, Y. R. (1999). Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am J Physiol* 276, G1087-1093.
- Mereto, E., Frenchia, L., und Ghia, M. (1994). Effect of aspirin on incidence and growth of aberrant crypt foci induced in the rat colon by 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett* 76, 5-9.
- Mifflin, R. C., Saada, J. I., Di Mari, J. F., Adegboyega, P. A., Valentich, J. D., und Powell, D. W. (2002). Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C824-834.
- Mildner, M., Eckhart, L., Lengauer, B., und Tschachler, E. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits UVB-induced apoptosis of human keratinocytes but not of keratinocyte-derived cell lines via the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *J Biol Chem* 277, 14146-14152.
- Miles, A. M., und Grisham, M. B. (1995). Antioxidant properties of 5-aminosalicylic acid: potential mechanism for its protective effect in ulcerative colitis. *Adv Exp Med Biol* 371B, 1317-1321.
- Moore, R., Carlson, S., und Madara, J. L. (1989). Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol* 257, G274-283.
- Muhl, H., und Pfeilschifter, J. (1996). Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1beta-stimulated rat mesangial cells. *Adv Exp Med Biol* 387, 199-202.
- Muto, S., Sato, Y., Umeki, Y., Yoshida, K., Yoshioka, T., Nishikawa, Y., Nakamura, T., Mori, M., Koyama, K., und Enomoto, K. (2000). HGF/SF-induced spreading of MDCK cells correlates with disappearance of barmotin/7H6, a tight junction-associated protein, from the cell membrane. *Cell Biol Int* 24, 439-446.
- Narisawa, T., Kusaka, H., Yamazaki, Y., Takahashi, M., Koyama, H., Koyama, K., Fukaura, Y., und Wakizaka, A. (1990). Relationship between blood plasma prostaglandin E2 and liver and lung metastases in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 33, 840-845.
- Navsaria, H. A., Kangesu, T., Manek, S., Green, C. J., und Leigh, I. M. (1994). An animal model to study the significance of dermis for grafting cultured keratinocytes on full thickness wounds. *Burns* 20 Suppl 1, S57-60.
- Neoptolemos, J. P., Husband, D., Imray, C., Rowley, S., und Lawson, N. (1991). Arachidonic acid and docosahexaenoic acid are increased in human colorectal cancer. *Gut* 32, 278-281.
- Nielsen, O. H., und Ahnfelt-Ronne, I. (1988). 4-Aminosalicylic acid, in contrast to 5-aminosalicylic acid, has no effect on arachidonic acid metabolism in human neutrophils, or on the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Pharmacol Toxicol* 62, 223-226.
- Nugent, K. P., Farmer, K. C., Spigelman, A. D., Williams, C. B., und Phillips, R. K. (1993). Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 80, 1618-1619.

- Ohneda, K., Ulshen, M. H., Fuller, C. R., AJ, D. E., and Lund, P. K. (1997). Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* *112*, 444-454.
- Ohshima, M., Nishiyama, T., Yamazaki, Y., Yokosuka, R., Maeno, M., and Otsuka, K. (2000). Hepatocyte growth factor is a predominant chemoattractant for gingival epithelial cells produced by radicular cyst-derived fibroblast-like cells. *J Oral Sci* *42*, 101-106.
- Olaison, G., Leandersson, P., Sjodahl, R., and Tagesson, C. (1988). Intestinal permeability to polyethyleneglycol 600 in Crohn's disease. Peroperative determination in a defined segment of the small intestine. *Gut* *29*, 196-199.
- Olaison, G., Sjodahl, R., Leandersson, P., and Tagesson, C. (1989). Abnormal intestinal permeability pattern in colonic Crohn's disease. Absorption of low molecular weight polyethylene glycols after oral or colonic load. *Scand J Gastroenterol* *24*, 571-576.
- Olaison, G., Sjodahl, R., and Tagesson, C. (1987). Decreased gastrointestinal absorption of peroral polyethyleneglycols (PEG 1000) in Crohn's disease. A sign of jejunal abnormality. *Acta Chir Scand* *153*, 373-377.
- Pang, G., Couch, L., Batey, R., Clancy, R., and Cripps, A. (1994). GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol* *96*, 437-443.
- Panja, A., Goldberg, S., Eckmann, L., Krishen, P., and Mayer, L. (1998). The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J Immunol* *161*, 3675-3684.
- Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., Manolagas, S. C., and Chrousos, G. P. (1998). The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* *128*, 127-137.
- Park, J. H., McCusker, R. H., Vanderhoof, J. A., Mohammadpour, H., Harty, R. F., and MacDonald, R. G. (1992). Secretion of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 by intestinal epithelial (IEC-6) cells: implications for autocrine growth regulation. *Endocrinology* *131*, 1359-1368.
- Parnes, S. M. (2002). The role of leukotriene inhibitors in allergic rhinitis and paranasal sinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* *2*, 239-244.
- Pasricha, P. J., Bedi, A., O'Connor, K., Rashid, A., Akhtar, A. J., Zahurak, M. L., Piantadosi, S., Hamilton, S. R., and Giardiello, F. M. (1995). The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* *109*, 994-998.
- Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., *et al.* (1997). Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* *40*, 1347-1365.
- Perdikis, D. A., Davies, R., Zhuravkov, A., Brenner, B., Etter, L., and Basson, M. D. (1998). Differential effects of mucosal pH on human (Caco-2) intestinal epithelial cell motility, proliferation, and differentiation. *Dig Dis Sci* *43*, 1537-1546.
- Peskar, B. M., Maricic, N., Gretzera, B., Schuligoi, R., and Schmassmann, A. (2001). Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci* *69*, 2993-3003.
- Plateroti, M., Rubin, D. C., Duluc, I., Singh, R., Foltzer-Jourdainne, C., Freund, J. N., and Kedinger, M. (1998). Subepithelial fibroblast cell lines from different levels of gut axis display regional characteristics. *Am J Physiol* *274*, G945-954.
- Podolsky, D. K. (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* *277*, G495-499.

- Podolsky, D. K., and Babyatsky, M. W. (1995). Growth and development of the gastrointestinal tract. In *Textbook of Gastroenterology*, T. Yamada, ed. (Philadelphia, JB Lippincott), pp. 546-577.
- Potten, C. S., Kellett, M., Roberts, S. A., Rew, D. A., and Wilson, G. D. (1992). Measurement of *in vivo* proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* 33, 71-78.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., and West, A. B. (1999a). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277, C1-9.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., and West, A. B. (1999b). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 277, C183-201.
- Prat, M., Narsimhan, R. P., Crepaldi, T., Nicotra, M. R., Natali, P. G., and Comoglio, P. M. (1991). The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer* 49, 323-328.
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Schwartz, L. W., and Simon, P. L. (1992). Effect of aminophenols (5-ASA and 4-ASA) on colonic interleukin-1 generation. *Gut* 33, 929-932.
- Racine-Samson, L., Rockey, D. C., and Bissell, D. M. (1997). The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts *in vivo* and in primary culture. *J Biol Chem* 272, 30911-30917.
- Reddy, B. S., Rao, C. V., Rivenson, A., and Kelloff, G. (1993). Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 14, 1493-1497.
- Reddy, B. S., Tokumo, K., Kulkarni, N., Aligia, C., and Kelloff, G. (1992). Inhibition of colon carcinogenesis by prostaglandin synthesis inhibitors and related compounds. *Carcinogenesis* 13, 1019-1023.
- Richards, A. J., Enders, G. C., and Resnick, J. L. (1999). Activin and TGFbeta limit murine primordial germ cell proliferation. *Dev Biol* 207, 470-475.
- Rigas, B., Goldman, I. S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 122, 518-523.
- Rigau, J., Pique, J. M., Rubio, E., Planas, R., Tarrech, J. M., and Bordas, J. M. (1991). Effects of long-term sulindac therapy on colonic polyposis. *Ann Intern Med* 115, 952-954.
- Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C., and Hanchar, A. J. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77, 433-443.
- Roberts, A. I., Nadler, S. C., and Ebert, E. C. (1997). Mesenchymal cells stimulate human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 113, 144-150.
- Rorke, S., Jennison, S., Jeffs, J. A., Sampson, A. P., Arshad, H., and Holgate, S. T. (2002). Role of cysteinyl leukotrienes in adenosine 5'-monophosphate induced bronchoconstriction in asthma. *Thorax* 57, 323-327.
- Rosenberg, I. M., Göke, M., Kanai, M., Reinecker, H. C., and Podolsky, D. K. (1997). Epithelial cell kinase-B61: an autocrine loop modulating intestinal epithelial migration and barrier function. *Am J Physiol* 273, G824-832.
- Rosenberg, L., Palmer, J. R., Zauber, A. G., Warshauer, M. E., Stolley, P. D., and Shapiro, S. (1991). A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 83, 355-358.
- Ruemmele, F. M., Gurbindo, C., Mansour, A. M., Marchand, R., Levy, E., and Seidman, E. G. (1998). Effects of interferon gamma on growth, apoptosis, and MHC class II expression of immature rat intestinal crypt (IEC-6) cells. *J Cell Physiol* 176, 120-126.
- Rutten, M. J., and Ito, S. (1983). Morphology and electrophysiology of guinea pig gastric mucosal repair *in vitro*. *Am J Physiol* 244, G171-182.
- Sanders, K. M. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111, 492-515.

- Santoro, M. G., Philpott, G. W., and Jaffe, B. M. (1976). Inhibition of tumour growth in vivo and in vitro by prostaglandin E. *Nature* 263, 777-779.
- Sato, Y., and Rifkin, D. B. (1989). Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109, 309-315.
- Schmassmann, A., Stettler, C., Poulsom, R., Tarasova, N., Hirschi, C., Flogerzi, B., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Halter, F. (1997). Roles of hepatocyte growth factor and its receptor Met during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 113, 1858-1872.
- Schmidt, C., Baumeister, B., Kipnowski, J., Schiermeyer-Dunkhase, B., and Vetter, H. (1996). Alteration of prostaglandin E2 and leukotriene B4 synthesis in chronic inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 43, 1508-1512.
- Schmitt-Graff, A., Desmouliere, A., and Gabbiani, G. (1994). Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 425, 3-24.
- Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Teclé, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., *et al.* (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 5, 810-816.
- Sheng, G. G., Shao, J., Sheng, H., Hooton, E. B., Isakson, P. C., Morrow, J. D., Coffey, R. J., Jr., DuBois, R. N., and Beauchamp, R. D. (1997). A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 113, 1883-1891.
- Shigematsu, T., Miura, S., Hirokawa, M., Hokari, R., Higuchi, H., Watanabe, N., Tsuzuki, Y., Kimura, H., Tada, S., Nakatsumi, R. C., *et al.* (1998). Induction of endothelin-1 synthesis by IL-2 and its modulation of rat intestinal epithelial cell growth. *Am J Physiol* 275, G556-563.
- Shimada, T., Hiraishi, H., and Terano, A. (2000). Hepatocyte growth factor protects gastric epithelial cells against ceramide-induced apoptosis through induction of cyclooxygenase-2. *Life Sci* 68, 539-546.
- Shimao, Y., Nabeshima, K., Inoue, T., and Kono, M. (1999). Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF-beta1. *Int J Cancer* 82, 449-458.
- Silverstein, F. E., Faich, G., Goldstein, J. L., Simon, L. S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N. M., Stenson, W. F., *et al.* (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* 284, 1247-1255.
- Simmons, J. G., Pucilowska, J. B., and Lund, P. K. (1999). Autocrine and paracrine actions of intestinal fibroblast-derived insulin-like growth factors. *Am J Physiol* 276, G817-827.
- Simo, P., Bouziges, F., Lissitzky, J. C., Sorokin, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1992a). Dual and asynchronous deposition of laminin chains at the epithelial-mesenchymal interface in the gut. *Gastroenterology* 102, 1835-1845.
- Simo, P., Simon-Assmann, P., Arnold, C., and Kedinger, M. (1992b). Mesenchyme-mediated effect of dexamethasone on laminin in cocultures of embryonic gut epithelial cells and mesenchyme-derived cells. *J Cell Sci* 101, 161-171.
- Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V., and Simo, P. (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* 51, 883-900.
- Skinner, S. A., Penney, A. G., and O'Brien, P. E. (1991). Sulindac inhibits the rate of growth and appearance of colon tumors in the rat. *Arch Surg* 126, 1094-1096.
- Smale, S., Tibble, J., Sigthorsson, G., and Bjarnason, I. (2001). Epidemiology and differential diagnosis of NSAID-induced injury to the mucosa of the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15, 723-738.

- Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M., und Birchmeier, C. (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123, 223-235.
- Sonoyama, K., Rutatip, S., und Kasai, T. (2000). Gene expression of activin, activin receptors, and follistatin in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G89-97.
- Spagnesi, M. T., Tonelli, F., Dolara, P., Caderni, G., Valanzano, R., Anastasi, A., und Bianchini, F. (1994). Rectal proliferation and polyp occurrence in patients with familial adenomatous polyposis after sulindac treatment. *Gastroenterology* 106, 362-366.
- Sprenger, H., Kaufmann, A., Garn, H., Lahme, B., Gemsa, D., und Gressner, A. M. (1997). Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 113, 277-285.
- Stallmach, A., Hahn, U., Merker, H. J., Hahn, E. G., und Riecken, E. O. (1989). Differentiation of rat intestinal epithelial cells is induced by organotypic mesenchymal cells in vitro. *Gut* 30, 959-970.
- Stallmach, A., Schuppan, D., Riese, H. H., Matthes, H., und Riecken, E. O. (1992). Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 102, 1920-1929.
- Stein, J., Zeuzem, S., Uphoff, K., und Laube, H. (1994). Effects of prostaglandins and indomethacin on gastric emptying in the rat. *Prostaglandins* 47, 31-40.
- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., *et al.* (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342, 1946-1952.
- Stella, M. C., und Comoglio, P. M. (1999). HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1357-1362.
- Strong, S. A., Pizarro, T. T., Klein, J. S., Cominelli, F., und Fiocchi, C. (1998). Proinflammatory cytokines differentially modulate their own expression in human intestinal mucosal mesenchymal cells. *Gastroenterology* 114, 1244-1256.
- Suemori, S., Ciacci, C., und Podolsky, D. K. (1991). Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines. *J Clin Invest* 87, 2216-2221.
- Sun, Z., Wang, X., Wallen, R., Deng, X., Du, X., Hallberg, E., und Andersson, R. (1998). The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand J Gastroenterol* 33, 415-422.
- Suzuki, T., Hashikawa, T., Takano, S., und Hayashi, A. (1975). [Effect of prostaglandin E1 on the isolated stomach, small intestine, bronchus and uterus of experimental animals and its intestinal effect in vivo]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 71, 109-122.
- Takahashi, M., Ota, S., Hata, Y., Mikami, Y., Azuma, N., Nakamura, T., Terano, A., und Omata, M. (1996). Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach. *J Clin Invest* 98, 2604-2611.
- Takahashi, M., Ota, S., Shimada, T., Hamada, E., Kawabe, T., Okudaira, T., Matsumura, M., Kaneko, N., Terano, A., Nakamura, T., und *et al.* (1995). Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture. *J Clin Invest* 95, 1994-2003.
- Tamai, H., Kachur, J. F., Grisham, M. B., und Gaginella, T. S. (1991). Scavenging effect of 5-aminosalicylic acid on neutrophil-derived oxidants. Possible contribution to the mechanism of action in inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 41, 1001-1006.
- Tamura, M., Arakaki, N., Tsubouchi, H., Takada, H., und Daikuhara, Y. (1993). Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 alpha and -1 beta and tumor necrosis factor-alpha by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 268, 8140-8145.

- Taniguchi, T., Tsukada, H., Nakamura, H., Kodama, M., Fukuda, K., Tominaga, M., and Seino, Y. (1997). Effects of a thromboxane A2 receptor antagonist in an animal model of inflammatory bowel disease. *Digestion* 58, 476-478.
- Thuneberg, L. (1982). Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 71, 1-130.
- Tomasek, J. J., Haaksma, C. J., Eddy, R. J., and Vaughan, M. B. (1992). Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. *Anat Rec* 232, 359-368.
- Tutton, P. J., and Barkla, D. H. (1980). Influence of prostaglandin analogues on epithelial cell proliferation and xenograft growth. *Br J Cancer* 41, 47-51.
- Uribe, A., Johansson, C., and Rubio, C. (1987). Cell proliferation of the rat gastrointestinal mucosa after treatment with E2 prostaglandins and indomethacin. *Digestion* 36, 238-245.
- Valentich, J. D., Popov, V., Saada, J. I., and Powell, D. W. (1997). Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* 272, C1513-1524.
- Vande Woude, G. F., Jeffers, M., Cortner, J., Alvord, G., Tsarfaty, I., and Resau, J. (1997). Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis. *Ciba Found Symp* 212, 119-130; discussion 130-112, 148-154.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231, 232-235.
- Varilek, G. W., Neil, G. A., and Bishop, W. P. (1994). Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation. *Am J Physiol* 267, G1101-1107.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., and Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269, 5241-5248.
- Waddell, W. R., Ganser, G. F., Cerise, E. J., and Loughry, R. W. (1989). Sulindac for polyposis of the colon. *Am J Surg* 157, 175-179.
- Wallace, J. L., McKnight, W., Asfaha, S., and Liu, D. Y. (1998). Reduction of acute and reactivated colitis in rats by an inhibitor of neutrophil activation. *Am J Physiol* 274, G802-808.
- Waller, D. A., Thomas, N. W., and Self, T. J. (1988). Epithelial restitution in the large intestine of the rat following insult with bile salts. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 414, 77-81.
- Wang, X., DeFrances, M. C., Dai, Y., Pediaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G. K., and Zarnegar, R. (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 9, 411-421.
- Weiser, M. M. (1973). Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *J Biol Chem* 248, 2536-2541.
- Weiser, M. M., Sykes, D. E., and Killen, P. D. (1990). Rat intestinal basement membrane synthesis. Epithelial versus nonepithelial contributions. *Lab Invest* 62, 325-330.
- Wheeler, E. E., and Challacombe, D. N. (1997). The trophic action of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin on human duodenal mucosa cultured in vitro. *Gut* 40, 57-60.
- Wilborn, J., Crofford, L. J., Burdick, M. D., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., and Peters-Golden, M. (1995). Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95, 1861-1868.
- Willoughby, D. A., Moore, A. R., and Colville-Nash, P. R. (2000). COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355, 646-648.
- Wilson, A. J., and Gibson, P. R. (1997a). Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. *Clin Sci (Colch)* 93, 97-108.
- Wilson, A. J., and Gibson, P. R. (1997b). Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro. *Gastroenterology* 113, 487-496.

- Xian, C. J., Cool, J. C., Howarth, G. S., and Read, L. C. (2002). Effects of TGF-alpha gene knockout on epithelial cell kinetics and repair of methotrexate-induced damage in mouse small intestine. *J Cell Physiol* *191*, 105-115.
- Xiao, G. H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G. F., and Testa, J. R. (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 247-252.
- Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., and Simmons, D. L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 2692-2696.
- Yamaguchi, A., Ishida, T., Nishimura, G., Katoh, M., and Miyazaki, I. (1991). Investigation of colonic prostaglandins in carcinogenesis in the rat colon. *Dis Colon Rectum* *34*, 572-576.
- Youngman, K. R., Simon, P. L., West, G. A., Cominelli, F., Rachmilewitz, D., Klein, J. S., and Fiocchi, C. (1993). Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* *104*, 749-758.
- Zarif, A., Eiznhamer, D., Callaghan, C., Doria, M. I., Broutman, L., and Keshavarzian, A. (1996). The effect of a selective 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, on tissue damage in acute colonic inflammation in rats. *Inflammation* *20*, 217-227.
- Zarnegar, R. (1995). Regulation of HGF and HGFR gene expression. *Exs* *74*, 33-49.
- Zeitz M, James SP, and W, S. (1986). Die Funktion des gastrointestinalen Immunsystems in der Abwehr enteropathogener Bakterien. *Z Gastroenterol* *24* (Suppl 3): 43-52).
- Zushi, S., Shinomura, Y., Kiyohara, T., Minami, T., Sugimachi, M., Higashimoto, Y., Kanayama, S., and Matsuzawa, Y. (1996). Role of prostaglandins in intestinal epithelial restitution stimulated by growth factors. *Am J Physiol* *270*, G757-762.

7. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
5-ASA	5-Aminosalicylsäure =Mesalazin
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (base-pairs)
BSA	Bovines serum albumin
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
COX	Cyclooxygenase
cpm	Signale pro Minute (counts per minute)
C _T	cycle threshold
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth-Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales bovines serum
FGF	Fibroblast Growth-Factor
g	Schwerebeschleunigung oder Gramm
GAPDH	Gyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hanks balanced salt solution
HGF	Hepatocyte Growth-Factor
HISMF	humane intestinale subepitheliale Myofibroblasten
HPETE	Hydroxyeikosatetraensäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth-Factor
IL	Interleukin
IU	international units

kb	Kilobasenpaare (kilo base-pairs)
kDa	Kilo Dalton
KGF	Keratinocyte Growth-Factor
K0	Kontrolle
LT	Leukotrien
M	molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP kinase kinase
MEM	minimal essential Eagle Medium
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz (Phosphate-buffered saline)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PG	Prostaglandin
PI ₃ -Kinase	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
(m)RNA	(messenger)Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-gekoppelte Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
SEM	Standard error of the mean
SSC	Natriumcitratsalz-Puffer (Saline-Sodium-Citrate buffer)
TGF	Transforming Growth-Factor
TNF	Tumor Nekrose-Factor
TX	Thromboxan

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael P. Manns danke ich für die großzügige Bereitstellung von Material und Arbeitsplatz im Labor der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich für seine nette Unterstützung vor und während des Promotionsverfahrens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Göke für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung dieser Arbeit und für die vielen anregenden Diskussionen.

Ich danke Herrn Dr. Christian Liedtke, der mir mit seinen fundierten molekularbiologischen Kenntnissen bei methodischen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinen Laborkollegen, insbesondere Thomas Caspritz, Silvia Gongoll, Rüdiger Hoppe, Ingo Lopez-Schmidt, Niklas Schmitt, Sebastian Schroll und Maike Veen, danke ich für die überaus gute Kameradschaft innerhalb und auch außerhalb des Labores.

Herrn Dr. Christian Wilhelm und Herrn Dr. Mario von Depka danke ich für die Einweisung und die Erlaubnis der Mitbenutzung des Taq-Man Gerätes der Abteilung Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Klempnauer danke ich für die Überlassung operativ gewonnener Resektate.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 280 (Projekt A17, Projektleiter PD Dr. M.Göke) diese Arbeit finanziell unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die ständige Unterstützung und für ihr Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Publikationen:

Originalarbeiten (in Vorbereitung)

Felgenhauer, K., Schroll, S., Liedtke, C., Manns, M.P., Göke, M.: Non steroidal antiinflammatory drugs decrease myofibroblast stimulated intestinal epithelial restitution and proliferation *in vitro* (Manuskript in Vorbereitung).

Göke, M., Felgenhauer, K., Manns, M.P.: Proinflammatory cytokines enhance hepatocyte growth factor mediated myofibroblast stimulation of intestinal epithelial migration and proliferation via PI₃ & Erk signaling pathways. (Manuskript in Vorbereitung).

Abstrakts

Göke, M., Felgenhauer, K., Gongoll, S., Hoppe, R., Veen, M., Caspritz, T., Bleck, J.S., Wagner, S., Lopez Schmidt, I., Manns, M.P.: Differential Regulation of hepatocyte growth factor (HGF) expression in intestinal myofibroblasts and upregulation of the HGF receptor c-Met in wounded intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000, 118: A547.

Göke, M., Felgenhauer, K., Gongoll, S., Hoppe, R., Schmitz, F., Veen, M., Caspritz, T., Manns, M.P.: Zytokinregulation der HGF-Expression in humanen intestinalen Myofibroblasten und Hochregulation des HGF-Rezeptors c-Met in verwundeten Darmepithelzellen. *Z. Gastroenterol.* 2000, 38:A344.

Felgenhauer, K., Manns, M.P., Göke, M.: Proinflammatory cytokines enhance hepatocyte growth factor mediated myofibroblast stimulation of intestinal epithelial migration and proliferation via PI₃ & Erk signaling pathways. *Gastroenterology* 2001, 120:A125.

Neumann, A., Depka von, M., Wilhelm, C., Felgenhauer, K., Caspritz, T., Hoppe, R., Ganser, A., Manns, M.P., Göke, M.: Thrombin enhances migration of intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2001, 120: A504.

Felgenhauer, K., Manns, M.P., Göke, M.: Migrations- und proliferationsfördernde Effekte von Myofibroblasten auf Darmepithelzellen werden durch proinflammatorische Zytokine verstärkt und sind durch Erk-Kinasen und PI₃-Kinase vermittelt. *Z. Gastroenterol.* 2001, 39: A625.

Felgenhauer, K., Schroll, S., Liedtke, Ch., Manns, MP., Göke, M.: NSAIDs inhibit colon myofibroblast stimulated intestinaal epithelial repair mechanismen. *Gastroenterology* 2002, accepted.

Leeb, SN., Felgenhauer, K., Göke, M., Falk, W., Schölmerich, J., Gelbmann, CM., Rogler, G.: Differences in expression and phosphorylation kinetics of FAK and ERK between control and Crohn's disease myofibroblasts during migration. Gastroenterology 2002, accepted.

Posterpräsentationen

Göke, M., Felgenhauer, K., Gongoll, S., Hoppe, R., Veen, M., Caspritz, T., Bleck, J.S., Wagner, S., Lopez Schmidt, I., Manns, M.P.: Differential Regulation of hepatocyte growth factor (HGF) expression in intestinal myofibroblasts and upregulation of the HGF receptor c-Met in wounded intestinal epithelial cells. Digestive Disease Week (DDW). San Diego, USA, 21.-24. Mai 2000.

Göke, M., Felgenhauer, K., Gongoll, S., Hoppe, R., Schmitz, F., Veen, M., Caspritz, T., Manns, M.P.: Zytokinregulation der HGF-Expression in humanen intestinalen Myofibroblasten und Hochregulation des HGF-Rezeptors c-Met in verwundeten Darmepithelzellen. 55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Hamburg, 13.-16. September 2000.

Neumann, A., Depka von, M., Wilhelm, C., Felgenhauer, K., Caspritz, T., Hoppe, R., Ganser, A., Manns, M.P., Göke, M.: Thrombin enhances migration of intestinal epithelial cells. Digestive Disease Week (DDW). Atlanta, USA, 20.-23. Mai 2001.

Felgenhauer, K., Schroll, S., Liedtke, Ch., Manns, MP., Göke, M.: NSAIDs inhibit colon myofibroblast stimulated intestinal epithelial repair mechanisms. Digestive Disease Week (DDW). San Francisco, USA, 19.-22. Mai 2002.

Leeb, SN., Felgenhauer, K., Göke, M., Falk, W., Schölmerich, J., Gelbmann, CM., Rogler, G.: Differences in expression and phosphorylation kinetics of FAK and ERK between control and Crohn's disease myofibroblasts during migration. Digestive Disease Week (DDW). San Francisco, USA, 19.-22. Mai 2002.

Vorträge

Felgenhauer, K., Manns, M.P., Göke, M.: Migrations- und proliferationsfördernde Effekte von Myofibroblasten auf Darmepithelzellen werden durch proinflammatorische Zytokine verstärkt und sind durch Erk-Kinasen und PI₃-Kinase vermittelt. 56. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Münster, 12.-15. September 2001.

Felgenhauer, K., Göke, M., Manns, M.P.: Proinflammatory cytokines enhance hepatocyte growth factor mediated myofibroblast stimulation of intestinal epithelial migration and proliferation via PI₃& Erk signaling pathways. Digestive Disease Week (DDW). Atlanta, USA, 20.-23. Mai 2001

Felgenhauer, K.: Bedeutung intestinaler Myofibroblasten für epitheliale Wundheilungsprozesse des Darms.
Gastroenterologisches Kolloquium, Medizinische Hochschule Hannover, 08. Mai 2001

Preise

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2000, Hamburg, 13.-16. September 2000.

Göke, M., Felgenhauer, K., Gongoll, S., Hoppe, R., Schmitz., F., Veen, M., Caspritz, T., Manns, M.P.: Zytokinregulation der HGF-Expression in humanen intestinalen Myofibroblasten und Hochregulation des HGF-Rezeptors c-Met in verwundeten Darmepithelzellen.

Preis und Präsidentenvortrag der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2001, Münster, 12.-15. September 2001.

Felgenhauer, K., Manns, M.P., Göke, M.: Migrations- und proliferationsfördernde Effekte von Myofibroblasten auf Darmepithelzellen werden durch proinflammatorische Zytokine verstärkt und sind durch Erk-Kinasen und PI₃-Kinase vermittelt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Name:	Katja Felgenhauer
	geboren am:	17. Dezember 1971 in Laatzen
	Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	1978-1982	Grundschule Pattensen
	1982-1984	Orientierungsstufe Pattensen
	1984-1991	Gymnasium Sarstedt
		Abschluss mit dem Abitur am 31.05.1991
Studium:	10/1991-05/1997	Pharmazie an der Technischen Universität Braunschweig Abschluss des Pharmaziestudiums mit dem 2.Staatsexamen im Mai 1997
	06/1997-11/1997	Pharmaziepraktikum bei der Firma Astra; Abteilung für Pharmazeutische Technologie in Södertälje, Schweden.
	12/1997-05/1998	Pharmaziepraktikum in der Marienapotheke Hannover
	24.06.1998	Erlangung der Approbation als Apothekerin
Anstellung als Apothekerin:	06/1998-06/1999	Angestellte Apothekerin in der Aegidienapotheke in Hannover
Promotion:	seit 07/1999	wissenschaftliche Angestellte an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abt. Gastroenterologie, Hepatology und Endokrinologie Prof. Dr. Michael P. Manns Arbeitsgruppe PD Dr. Michael Göke

Hannover, den 28.04.2002

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Bedeutung intestinaler Myofibroblasten für epitheliale Wundheilungsprozesse des Darms und deren Modulation durch Cyclooxygenase-Inhibitoren

nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Außerdem erkläre ich an Eides statt, dass die zugrundeliegenden Ergebnisse nicht anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet worden sind. Veröffentlichungen, die sich aus der Dissertation ergeben haben, sind in der Publikationsliste aufgelistet.

Hannover, April 2002

Katja Felgenhauer