

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. J. Schölmerich
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**PGE2 hemmt die Migration
intestinaler Myofibroblasten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martina Georgieva

2009

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. J. Schölmerich
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**PGE2 hemmt die Migration
intestinaler Myofibroblasten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martina Georgieva

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Frauke Bataille

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2010

Gewidmet meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.1.3	Aufbau der Darmwand.....	5
1.1.4	Krankheitsmanifestation.....	7
1.1.5	Klinischer Verlauf.....	9
1.1.6	Bisherige Möglichkeiten und Grenzen der Therapie.....	11
1.2	Komplikationen bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa.....	11
1.2.1	Gestörte Wundheilung und Bildung von Fisteln.....	11
1.2.2	Überschießende Wundheilung und Entstehung von Stenosen.....	14
1.3	Zelluläre Vermittler und Entstehung der Darmfibrosierung.....	18
1.3.1	Fibroblasten und Myofibroblasten.....	18
1.3.2	Zelltypen: Sternzellen, Knochenmarkstammzellen, zelluläre Transformation, Fibrozyten, Perizyten.....	19
1.3.3	Fibroblasten Proliferation.....	21
1.3.4	Migration von Fibroblasten.....	22
1.3.4.1	Morphologie sich bewegender Fibroblasten: Mikrospikes und Lamellipodien.....	24
1.3.4.2	Die Migration von Zellen ist Aktin-abhängig.....	27
1.4	Extrazelluläre Matrix, Fibronectin, Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren Bedeutung für die Zellmigration.....	30
1.4.1	Extrazelluläre Matrix (ECM).....	30
1.4.2	Fibronectin.....	31
1.4.3	Wachstumsfaktoren und Zytokine.....	32
1.4.4	Cyclisches Adenosinmonophosphat erhöhende Substanzen.....	34
1.4.4.1	Prostaglandin E2 (PGE2).....	34

Inhaltsverzeichnis

1.4.4.2 Forskolin.....	36
1.4.4.3 Phosphodiesterase - Hemmer.....	37
2 Arbeitsziele und Fragestellungen	
2.1 Bisherige Ergebnisse.....	38
2.2 Arbeitsziele.....	39
3 Materialien und Methoden	
3.1 Materialien und Geräte.....	41
3.1.1 Zellkultur.....	41
3.1.2 Immunhistochemie.....	42
3.1.2.1 Antikörper.....	42
3.1.2.2 Isotypkontrolle.....	43
3.1.3 Migrations-Assays in der modifizierten Boyden-Kammer.....	43
3.1.3.1 Zytokine, Gewebshormone, Phosphodiesterase-Inhibitoren.....	43
3.1.3.2 Extrazellulär-Matrix Protein.....	43
3.1.4 <i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i> (ELISAs).....	44
3.1.4.1 Cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) - <i>Enzyme-</i> <i>linked immunosorbent assays</i> (ELISA).....	44
3.1.5 Western Blot.....	44
3.1.5.1 Lysepuffer.....	44
3.1.5.2 Proteinbestimmung.....	44
3.1.5.3 Größenstandart.....	44
3.1.5.4 Runnig- und Transfer-Puffer.....	45
3.1.5.5 Waschpuffer.....	45
3.1.5.6 Detektion.....	45
3.1.5.7 Antikörper.....	45
3.1.5.8 Stripping.....	45
3.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	46
3.1.7 Geräte.....	47

Inhaltsverzeichnis

3.2 Methoden.....	48
3.2.1 Isolation und Kultur von primären humanen intestinalen Fibroblasten.....	48
3.2.2 Zellkultur.....	50
3.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl.....	50
3.2.2.2 Einfrieren der Zellen.....	52
3.2.2.3 Auftauen der Zellen.....	53
3.2.3 Charakterisierung von humanen intestinalen Fibroblasten.....	53
3.2.4 Migrations-Assay mit der modifizierten 48-Well-Boyden- Kammer.....	55
3.2.4.1 Prinzip des Migrations-Assay.....	55
3.2.4.2 Arbeitsschritte mit der modifizierten Boyden-Kammer..	55
3.2.4.3 Färben der migrierten Zellen auf der Membran.....	61
3.2.5 Nachweis von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mittels <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	63
3.2.5.1 Prinzip der <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	63
3.2.5.2 Stimulation von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) und anschließende Lyse der Zellen.....	64
3.2.5.3 Quantitative Bestimmung des zellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) – Gehalts.....	64
3.2.6 Nachweis von Prostaglandin E2 (PGE2) mittels <i>enzyme-linked</i> <i>immunosorbent assay</i> (ELISA).....	66
3.2.7 Western Blotting.....	66
3.2.7.1 Lyse der Fibroblasten.....	67
3.2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
3.2.7.3 Western Blot.....	69
3.2.8 Zellwanderung in das Wundareal.....	71
4 Ergebnisse	
4.1 Immunhistochemische Charakterisierung von humanen intestinalen Fibroblastenkulturen	72

Inhaltsverzeichnis

4.1.1 Anti-Vimentin Antikörper.....	72
4.1.2 Anti- α - <i>smooth-muscle</i> Antikörper.....	73
4.1.3 Anti-Desmin Antikörper.....	73
4.1.4 Zusammenfassung der immunhistochemischen Charakterisierung von humanen intestinalen Fibroblasten.....	73
4.2 Migrationsversuche mit der modifizierten 48- <i>Well</i> -Boyden-Kammer.....	74
4.2.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Fibronectin auf die Migration von Darmfibroblasten.....	75
4.2.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Prostaglandin E2 (PGE2) auf die Migration von Darmfibroblasten.....	76
4.2.3 <i>Checkerboard</i> -Analyse der Fibroblasten - Migration mit und ohne Prostaglandin E2 (PGE2).....	80
4.2.4. Prostaglandin E2 (PGE2) vermittelt seine Effekte über den EP-Rezeptor.....	83
4.2.4.1 Expression der EP-Rezeptoren.....	84
4.2.4.2 Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) zeigen unverändertes Migrationsverhalten bei der Stimulation von der EP1- und EP3- Rezeptoren.....	84
4.2.4.3 Der spezifische EP2-Rezeptor-Agonist Butaprost reduziert die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF).....	85
4.2.4.4 Der spezifische EP4-Rezeptor-Agonist ONO-AE1-329 reduziert die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF).....	86
4.2.5 Durch eine Blockierung der EP2- und EP4-Subtyp-Rezeptoren wurde die hemmende Wirkung von Prostaglandin E2 (PGE2) auf die Migration von Kontroll-Fibroblasten aufgehoben.....	87
4.2.6 Wirkung von intrazellulärem cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF).....	88
4.2.6.1 Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase...	89

Inhaltsverzeichnis

4.2.6.2 Die Phosphodiesterase-Hemmer Pentoxyphyllin und Rolipram.....	92
4.3 Quantitative Konzentrationsbestimmungen mittels <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	94
4.3.1 Prostaglandin E2 (PGE2) steigert die intrazelluläre cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration.....	94
4.3.2 IL-1 β und IFN- γ steigern die Prostaglandin E2 (PGE2) Konzentration in Zellüberständen.....	95
5 Diskussion	
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	97
5.2 Diskussion der Zellmigration und Versuchsaufbau.....	98
5.3 Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur.....	100
5.3.1 Fibronectin induzierte Migration und Prostaglandin E2 (PGE2)-induzierte Hemmung der Migration von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF).....	100
5.3.2 Prostaglandin E2 (PGE2) und die EP-Rezeptoren.....	103
5.3.3 Prostaglandin E2 (PGE2) reduziert die Migration von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF) über die EP2- und EP4-Rezeptoren.....	104
5.3.4 Anstieg der intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration reduziert das Migrationsverhalten von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF).....	106
5.3.5 Wachstumsfaktoren, Zytokine und Prostaglandin E2.....	109
5.4 Prostaglandin E2 (PGE2) und die Migration von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF).....	111
6 Zusammenfassung	114
7 Ausblick	117

Inhaltsverzeichnis

8	Literaturverzeichnis.....	119
9	Danksagung.....	134
10	Lebenslauf.....	136

Abkürzungen

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
cAMP	cyclisches 5'-Adenosin-Monophosphat
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonium]-1-Propansulfonat
CLPF	Colon Lamina Propria Fibroblasten
CU	Colitis Ulcerosa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extra cellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAK	Fokal Adhesion Kinase
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i>
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I</i>
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milli-Ampere
MC	Morbus Chron
Min	Minute (n)
mM	Milli-Molar
mV	Milli-Volt
MW	Mittelwert

Abkürzungen

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PGE2	Prostaglandin-E2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin / Streptomycin
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGF-β1	Trishydroxymethylaminomethan
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U/min	Umdrehungen/Minute

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Unter chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (engl.: inflammatory bowel disease, IBD) versteht man eine wiederkehrende (rezidivierende) oder kontinuierlich entzündliche Erkrankung des Darmes, die mit Verlust der mukosalen Integrität, verminderter Resorptionsleistung und verstärkter Sekretion bzw. Exkretion einhergehen. Die beiden bekanntesten Vertreter sind die Colitis Ulcerosa und der Morbus Crohn.

Die Colitis Ulcerosa befällt nur den Dickdarm (Colon) und geht mit der Bildung von Geschwüren (Ulcera) einher. Der Begriff „ulzerative Colitis“ wurde 1859 erstmals von Wilks und Moxon benutzt (Adler G., 1996). Eine Anwendung auf das Krankheitsbild, das heute als Colitis Ulcerosa verstanden wird, erfolgte jedoch erst im Verlauf der nächsten Jahrzehnte. Wenn die Erkrankung nur den Enddarm betrifft, wird sie auch Proktitis genannt (Proktos = Mastdarm).

Der Morbus Crohn, der alle Abschnitte des Verdauungskanals vom Mund bis zum After befallen kann, ist nach ihrem Entdecker, dem amerikanischen Gastroenterologen Burrill B. Crohn benannt. Der Morbus Crohn wurde 1932 von Crohn, Ginsburg und Oppenheimer als „Ileitis regionalis“ bezeichnet und zum ersten Mal als Krankheitsbild genau beschrieben. Je nachdem, welche Darmteile befallen sind, spricht man auch von Ileitis, Colitis, Ileocolitis und Enteritis Crohn (Schölmerich J., 2003).

Die Ätiologie beider Erkrankungen ist ungeklärt, wahrscheinlich spielt eine Kombination aus genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren eine Rolle (Bashour M., 2009; Baumgart DC., 2009).

1.1.1 Epidemiologie

Die höchste Inzidenz der CED wird in Nord-Amerika und (Nord-)Europa beobachtet, während in Süd-Amerika, Asien und Afrika wesentlich weniger Fälle vorkommen (allerdings mit steigender Tendenz). Inzidenz und Prävalenz von CED in Ländern der zweiten und dritten Welt scheinen wesentlich niedriger zu liegen. Hier ist zu bedenken, dass auch die diagnostischen Möglichkeiten schlechter sind und häufiger andere

medizinische Probleme im Vordergrund stehen, die das Ergebnis verfälschen können. Zusätzlich zu den geographischen werden auch ethnische Unterschiede beobachtet: in den USA sind Kaukasier deutlich häufiger betroffen als Afro-Amerikaner, letztere wiederum häufiger als Asiaten (Edwards et al., 2008).

Die Prävalenz (der Bestand an Erkrankten) von Morbus Crohn liegt in Deutschland bei etwa 40-50 pro 100.000 Einwohner, die Inzidenz bei etwa vier bis sechs Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohner. In den westlichen Industriestaaten insgesamt liegt die jährliche Anzahl von Neuerkrankungen von Morbus Crohn bei etwa 8 auf 100.000 Einwohner, die Prävalenz zwischen 12.2 und 22.4 auf 100.000 (Edwards et al., 2008).

Die Angaben zu Prävalenz und Inzidenz der Colitis Ulcerosa sind schwieriger zu interpretieren. Sie hängen entscheidend davon ab, inwieweit die Proktitis (die Entzündung des Enddarmes), in die Diagnose mit einbezogen wird (Adler G., 1996). Auch im Fall der Colitis Ulcerosa scheinen die höchsten Inzidenzraten in den Industrienationen mit 3 bis 7 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohnern zu bestehen. Die Zahlen für die Prävalenz der Colitis Ulcerosa schwanken zwischen 36.7 und 53.0 pro 100.000 Einwohner und Jahr (Edwards et al., 2008).

Der Erkrankungsgipfel beider Krankheiten liegt zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr, wobei auch Kinder und ältere Menschen betroffen sein können (Baumgart DC., 2009). Während der Morbus Crohn bei Frauen etwas häufiger als bei Männern auftritt (Shapiro W., 2008), sind bei der Colitis Ulcerosa beide Geschlechter den statistischen Angaben gemäß gleich häufig betroffen (Riemann J.F., 1996; Hartmann F., 1996).

Auch sozioökonomischen Faktoren können eine Rolle in der Ätiologie und Pathogenese spielen. Insbesondere scheinen höherer sozialer Status, verbesserte hygienische Bedingungen und die veränderten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten in den Städten der Industrienationen zu einer Steigerung von Inzidenz und Prävalenz der CED zu führen.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der CED ist bis heute nur teilweise verstanden. Wichtiger Risikofaktor sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis Ulcerosa ist eine positive Familienanamnese (Shapiro W., 2008). Zusammen mit Erkenntnissen aus belegten epidemiologischen und Zwillingsstudien ist der genetische Einfluss gut belegt. Monozygote Zwillinge zeigen eine Konkordanz von 6,3% für die Entwicklung von Colitis Ulcerosa und eine Konkordanz von 58,3% für die Entwicklung eines Morbus Crohn (Tysk et al., 1988). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass genetische Faktoren von großer Bedeutung für die Entwicklung eines Morbus Crohn sind. Durch Kopplungsstudien wurden die Risikoregionen auf den Chromosomen 12, 16 und weitere potentielle Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 11 identifiziert (Schreiber S., 1998). Neuere Untersuchungen zeigen bei 50% der Crohn-Patienten eine Mutation des NOD2/CARD15-Gens auf Chromosom 16 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001; Achkar et al., 2006). Die NOD2 Mutation wirkt laut Hypothese, amplifizierend auf Signale der TNF-Rezeptor Signal-Kaskade und damit entzündungsfördernd (Beutler B., 2001; Baumgart DC, 2009; Bashour M., 2009). Heterozygote Patienten mit NOD2 Mutation haben ein 2,5faches Risiko für Morbus Crohn, bei zwei Mutationen ist das Risiko 40fach, bei Homozygotie 100fach erhöht.

Trotz der Hinweise auf eine genetische Heterogenität ist anzunehmen, dass genetische Faktoren (wie HLA- DR or/and DQ) die Schwere oder die Ausdehnung der Erkrankung beeinflussen können (Toyoda et al., 1993; Nakajima et al., 1995; Satsangi et al., 1996; Neurath et al., 2000). HLA-B27 ist bei 75% der Patienten mit Morbus Crohn und begleitender ankylosierender Spondylitis positiv im Vergleich zu nur 8% bei der Normalbevölkerung (Greten H., 2005).

Umwelteinflüsse wie Ernährungsgewohnheiten, Infektionen und Rauchen spielen auch eine Rolle bei der Entstehung von CED. Rauchen ist ein wichtiger Risikofaktor für den aggressiven Krankheitsverlauf und das postoperative Rezidiv bei Morbus Crohn (Klein et al., 1998; Russel et al., 1998; Neurath et al., 2000; Edward V. Loftus, 2004). Bei Ex-Rauchern scheint das Risiko nicht erhöht zu sein. In anderen Studien zeigte das Rauchen bei Colitis Ulcerosa dagegen einen protektiven Effekt auf die Krankheitsmanifestation und die Schubfrequenz (Neurath et al., 2000).

Eine Appendektomie gilt in der Literatur mehrheitlich als protektiver Faktor für die Erkrankung an Colitis Ulcerosa (Andersson et al., 2001; Reif et al., 2001; Kurina et al., 2002; Edward V. Loftus, 2004). Eine vorausgegangene Appendektomie bewirkt zudem einen milderen Krankheitsverlauf mit geringerer Notwendigkeit der Immunsuppression und Proktocolektomie (Radford-Smith et al., 2002). Bei Patienten mit Morbus Crohn wird häufiger eine Appendektomie durchgeführt als bei Patienten ohne Morbus Crohn. Dies scheint aber eher durch die häufigere Gelegenheitsappendektomie bei operierten Patienten mit Morbus Crohn bedingt zu sein (Reif et al., 2001; Kurina et al., 2002).

Einige Medikamente wurden mit CED in Verbindung gebracht. Zum einen sind dies NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs), welche die Prostaglandinsynthese hemmen. Prostaglandine haben eine wichtige protektive Funktion in der normalen Immunregulation und Abwehr des Gastrointestinaltrakts. In einer Studie führte die Einnahme von NSAID zu einem signifikant höheren Risiko einer notfallmäßigen Aufnahme ins Krankenhaus mit der Diagnose einer Colitis aufgrund von CED (Kurina et al., 2002). Eine andere Studie zeigte, dass eine NSAID-Einnahme zur akuten Exazerbation der Krankheit bei CED-Patienten führte, welche sich vorher in Remission befanden (Reif et al., 2001).

Früher vermutete Zusammenhänge mit einer spezifischen Ernährung, wie etwa vermehrter Gebrauch von raffinierten Zuckersorten bei Morbus-Crohn-Patienten, werden heute als sekundär erachtet, da viele Morbus-Crohn-Patienten aufgrund der Entzündungen im Dünndarm eine generell verminderte Resorption und damit eine schlechtere Nahrungsverwertung aufweisen (Wikipedia).

Einen weiteren Faktor bei der Entstehung CED stellt höchstwahrscheinlich das Zusammenspiel von mikrobieller Darmflora und intestinalem Immunsystem dar: die Abwehr des Gastrointestinaltraktes steht vor der schwierigen Aufgabe, auf pathogene Substanzen zu reagieren und gleichzeitig Antigene aus der Nahrung sowie die physiologische Bakterienflora zu tolerieren.

Durch den ständigen Kontakt der Lamina propria mit Antigenen wird beim Gesunden eine milde, genau regulierte chronische Entzündung aufrechterhalten. Kommt es zu einer Permeabilitätsstörung des Darmepithels, so gerät die Regulation vor dem Hintergrund einer genetischen Disposition und unter Einfluss von exogenen Faktoren aus dem Gleichgewicht. Dies kann in eine CED münden. Für eine Immungenese mag das gute therapeutische Ansprechen auf Cortikoide und Azathioprin sowie häufig eindrucksvolle Remission unter Nahrungskarenz sprechen (Greten H., 2005). Die

Dysregulation der lokalen Immunreaktion hat einen wichtigen Einfluss auf den Unterhalt und die Chronifizierung der Entzündungsreaktionen (Monteleone et al., 2002).

Wahrscheinlich müssen genetische Faktoren mit Umweltfaktoren zusammentreffen, damit sich eine CED manifestiert.

1.1.3 Aufbau der Darmwand

Zum besseren Verständnis der folgenden Abschnitte soll hier der Aufbau der Darmwand näher beschrieben werden (Abbildung 1.1).

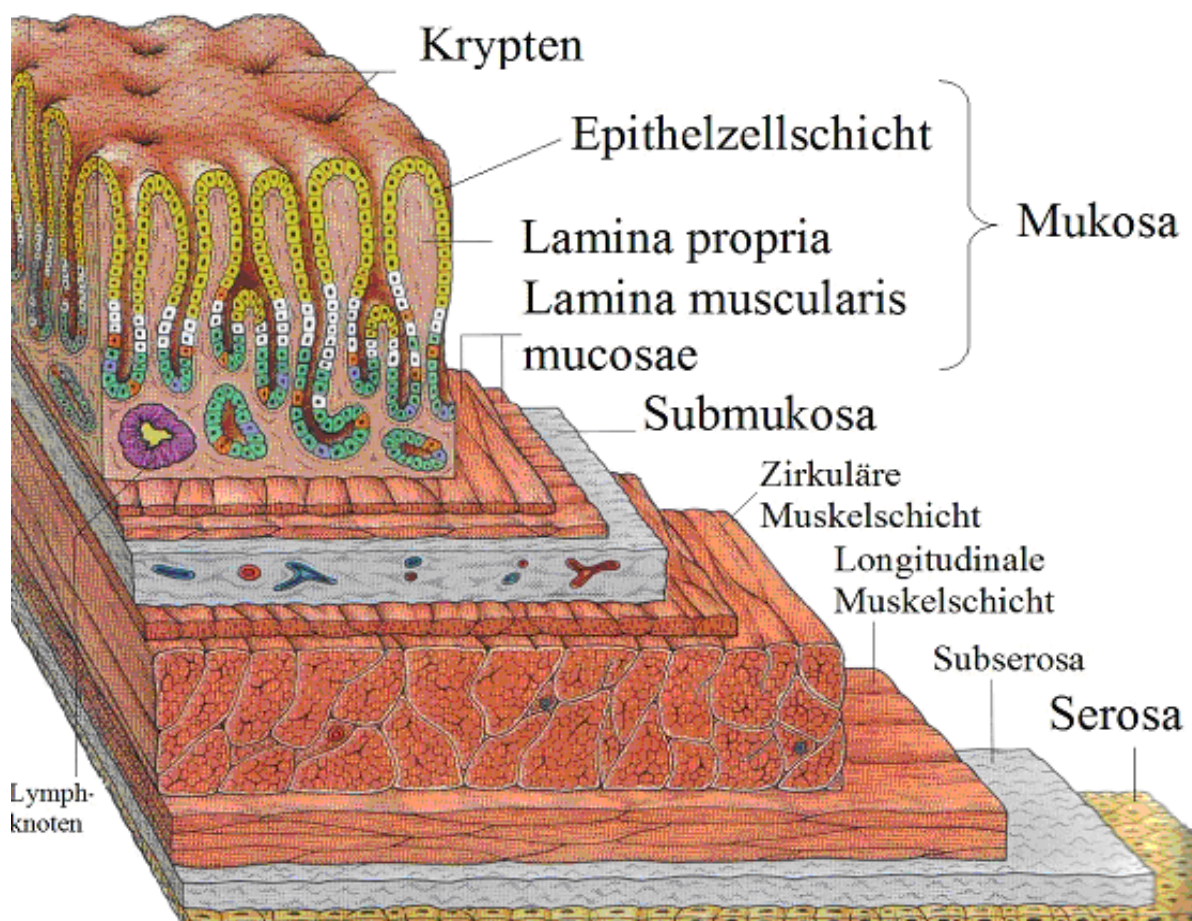


Abbildung 1.1

Aufbau der Darmwand (Smith T., 1997)

Die Darmwand setzt sich von innen nach außen aus folgenden Schichten zusammen: Tunica mucosa (Schleimhaut) bestehend aus drei dünnen Schichten Lamina epithelialis mucosae (kurz: Epithel), Lamina propria mucosae (kurz: Propria) und Lamina muscularis mucosae (kurz: Muscularis mucosae), Tela submucosa (kurz: Submukosa), Tunica muscularis (kurz: Muscularis) bestehend aus zwei Muskelschichten Stratum circulare bzw. Stratum anulare (Ringmuskelschicht) und Stratum longitudinale (Längsmuskelschicht) und Tunica adventitia (kurz: Adventitia).

Zum Darmlumen wird die Mukosa von Epithelzellen bedeckt, die auf einer Basalmembran fixiert sind. Den größten Teil der Mukosa stellt die Lamina propria dar, die aus Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Kapillaren und extrazellulärer Matrix besteht. An die Lamina propria schließt sich die Muscularis mucosae an, die die Mukosa von der Submukosa trennt. Die Muscularis mucosae ist eine etwa 5-Zellen-dicke Schicht von glatten Muskelzellen, die Muskelzellverbände verlaufen sowohl längst als auch quer. Die Lamina muscularis mucosae sorgt für die Feinadaptation der Darmsoberfläche und verändert durch Kontraktion die Höhe des Faltenreliefs (z.B. Plicae gastricae = Schleimhautfalten des Magens oder Plicae circulares = Schleimhautfalten des Dünndarms). Dadurch trägt sie zur Peristaltik des Darmes bei.

Die Submukosa ist eine Bindegewebsschicht oder loses Maschenwerk aus dünnen Kollagenfibrillen, das Mukosa und Muscularis propria verbindet. Sie führt Blutgefäße, Lymphbahnen und Nervenästchen zur Muscularis.

Die Muscularis besteht aus dick gepackten glatten Muskelzellen, quer und längst verlaufend angeordnet, umgeben von dünnen Kollagenfibrillen. Diese Fibrillen verbinden sich zu Kollagenfasern und bilden die intramuskulären Septae aus.

Die äußerste Schicht der Darmwand, die Serosa, besteht aus einschichtigem Plattenepithel (Mesothel), das sie zum Peritoneum abgrenzt.

Die vorherrschenden Bindegewebsproteine im Darm sind Kollagene und sie werden von den mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten produziert. Analysen des Kollagentyps im intestinalen Muskel zeigen, dass die Kollagentypen I und III überwiegen (Graham M.F., 1995).

1.1.4. Krankheitsmanifestation

Morbus Crohn ist charakterisiert durch einen häufigen oder vorwiegenden Befall des terminalen Ileums, sowie einen segmentalen, diskontinuierlichen Befall aller Abschnitte des Gastrointestinaltraktes, vom Mund bis zum Enddarm, während die Colitis Ulcerosa auf das Colon beschränkt bleibt und üblicherweise die stärkste Aktivität im Rektum aufweist (Adler, 1996; Bashour M., 2009), (Abbildung 1.2).

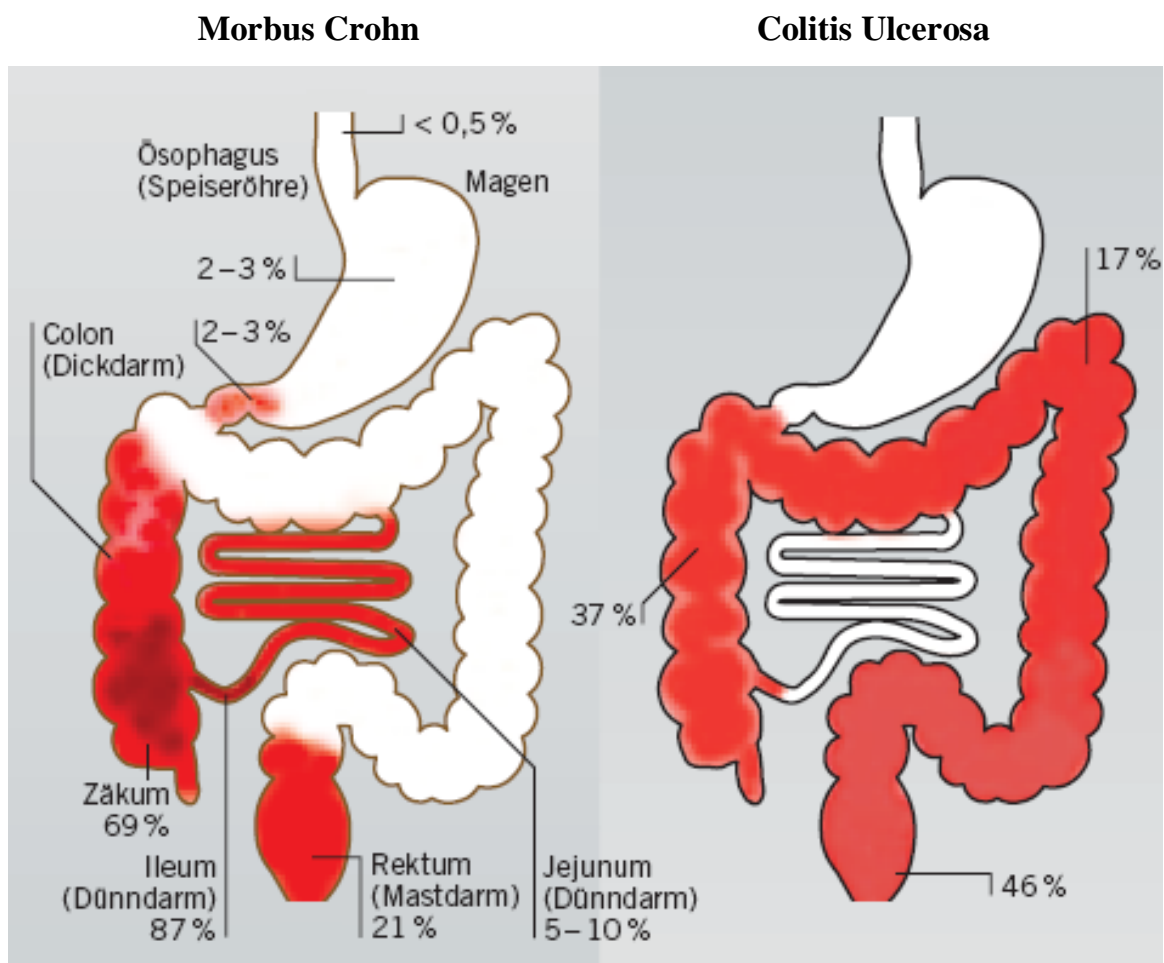
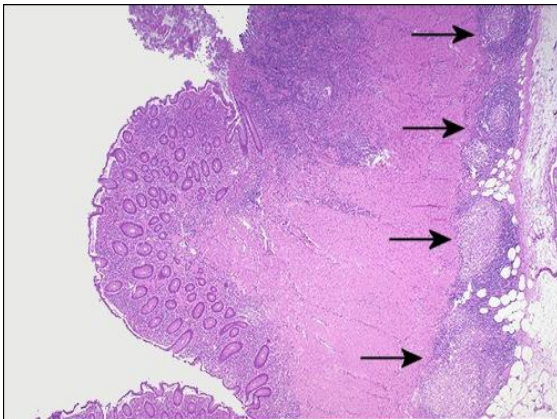


Abbildung 1.2

Lokalisation und Häufigkeit der Entzündungsherde beim Morbus Crohn (verteilt über den Gastrointestinaltrakt, links) und bei Colitis Ulcerosa (deutlich beschränkt auf den Dickdarm, rechts), (Forschung aktuell, Frankfurt 2004, 1)

Beide Erkrankungen zeigen typische Zeichen einer Entzündung der intestinalen Mukosa mit Entzündungszellinfiltraten. Bei Morbus Crohn sind diese jedoch granulomatös und erstrecken sich durch alle Wandschichten mit Einbeziehung von Muscularis und auch Serosa (Abbildung 1.3), bei der Colitis ist die Entzündung auf die Mukosa beschränkt (Abbildung 1.4).

Morbus Crohn:



Colitis Ulcerosa:

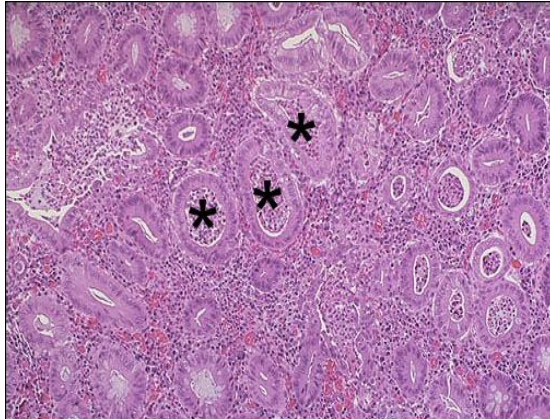


Abbildung 1.3: Entzündliche Infiltration der gesamten Darmwand. Im Bereich der Serosa sind einige nicht-verkäsende Granulome (->) zu erkennen.

Abbildung 1.4: Entzündliches Infiltrat (*) aus neutrophilen Granulozyten innerhalb der Krypten („Kryptenabszeß“). Beachte die gestörte Architektur der Krypten.

(WebPath: The Internet Pathology Laboratory for Medical Education, Florida State University College of Medicine.
<http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>.)

	Morbus Crohn	Colitis Ulcerosa
Lokalisation bevorzugte Lok.	gesamter GI-Trakt (Abb. 1.2) Ileum, Ileocolon, Colon (spart Rektum aus)	auf das Colon begrenzt (Abb. 1.2) Rektum, später gesamtes Colon (spart Dünndarm aus)
Verteilung	segmental oder diffus	diffus
Ausbreitung	diskontinuierlich („skip lesions“)	kontinuierlich
Wandschichten	alle (transmural)	auf Mukosa begrenzt
Karzinomrisiko	leicht erhöht	erhöht
sonst. Kennzeichen	Aphthen, Granulome, Fistelgänge, Strikturen, „Pflastersteinrelief“	Ulzerationen, Pseudopolypen, Kryptenarchitektur, Kryptenabszesse

Tabelle 1.1

Pathologie von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa

1.1.5 Klinischer Verlauf

Die klinischen Symptome sind bedingt durch die chronisch entzündlichen Veränderungen (Verlust der Mukosa-Integrität) und deren Folgen an der Darmwand (Ulzerationen, Strikturen, Abszesse), (Burke et al., 2007).

In Abhängigkeit von der Lokalisation sind die Symptome bei Morbus Crohn variabel. Es treten Malabsorptionsstörungen mit krampfartigen abdominellen Schmerzen und Diarrhöen mit bis zu fünfzehn Stuhlgänge am Tag auf, häufig ohne Blutbeimengungen. Daneben wird aber auch Obstipation beschrieben. Typisch sind perianale Veränderungen wie Abszesse, Fisteln und Rhagaden (Shapiro W., 2008; Bashour M., 2009).

Hauptsymptome bei Colitis Ulcerosa sind blutig-schleimige Diarrhöen, die nicht immer mit Schmerzen verbunden sein müssen. Häufig treten rektale Blutungen und Tenesmen auf, aber keine perianale Veränderungen.

Beide Erkrankungen führen häufig zu Gewichtsabnahme und Mangelernährung.

Typische Symptome bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa:

Symptom	Morbus Crohn	Colitis Ulcerosa
Bauchschmerzen	70-80 %	70-80 %
Durchfall	70-90 %	80-90 %
Darmblutung	20-25 %	90-100 %
Analfistel	10-40 %	0-5 %
Gewichtsverlust	50-60 %	20-40 %
Fieber	25-40 %	10-20 %
Anämie	25-85 %	20-50 %

Beide Erkrankungen können sich auch extraintestinal manifestieren und dort Komplikationen verursachen (Baumgart DC., 2009): in Leber und den Gallenwegen (primär sklerosierende Cholangitis, Gallensteine), Dermatopathien (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, v. a. bei Morbus Crohn), Gelenkbeteiligung (Arthritis, Spondylarthritis), Augenbeteiligung (Uveitis, Iritis), Urogenitaltrakt (Glomerulonephritis, Harnwegsinfekte), subfebrile Temperaturen u. a. (Shapiro W., 2008; Bashour M., 2009).

Intestinale Komplikationen ergeben sich aus den entzündlichen Veränderungen der Darmwand. Bei Morbus Crohn können Stenosen, Perforation mit nachfolgender Peritonitis, Abszess und Fistel auftreten (Burke et al., 2007). Entzündliche Schwellungen der Darmschleimhaut oder narbige Strikturen können zu Subileus oder Ileussyndromatik führen.

Als Komplikationen bei Colitis Ulcerosa können auftreten: Blutungen, toxisches Megakolon, Perforation mit nachfolgender Peritonitis (Bashour M., 2009). Bei langem Krankheitsverlauf mit aktiver Entzündung ist nach Jahrzehnten mit der Ausbildung von Dysplasien der Epithelzellen und schließlich mit einer malignen Entartung zu rechnen (häufig multifokal, spät diagnostizierbar und mit schlechter Prognose).

Der Verlauf, die Ausdehnung und der Schweregrad der beiden Erkrankungen sind sehr unterschiedlich und nicht vorhersehbar. In der Mehrzahl der Fälle werden mehr oder minder lange Remissionsphasen von akuten Schüben unterbrochen. Bei etwa 20-30% der Patienten findet sich ein chronisch aktiver Verlauf (Adler, 1996).

1.1.6 Bisherige Möglichkeiten und Grenzen der Therapie

Eine spezifische medikamentöse Therapie mit dem Ziel der Heilung ist für beide Erkrankungen nicht bekannt (Baumgart DC., 2009). Ziel der therapeutischen Maßnahmen ist bis heute die Dauer und Schwere eines entzündlichen Schubes zu reduzieren, Mangelzustände zu beheben und Rezidive zu verhindern. Die Auswahl richtet sich nach dem klinischen Schweregrad der Entzündung, der Lokalisation, dem Vorliegen von Komplikationen und dem Auftreten von Mangelerscheinungen.

Bei Morbus Crohn - einem komplexen Krankheitsbild gekennzeichnet durch verschiedene intestinale und extraintestinale Komplikationen - gelingt eine chirurgische Heilung nicht. Die Colitis Ulcerosa dagegen ist nur durch eine totale Proktocolectomie (operative Entfernung des Dick- und Dünndarms) heilbar (Herold G., 2006; Shapiro W., 2008; Slatter et al., 2008).

Chirurgische Therapie ist indiziert bei Versagen der medikamentösen Therapie und bei schweren Komplikationen (Prudhomme et al., 2003; Van Assche et al., 2004).

1.2 Komplikationen bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa

Wie zuvor beschrieben ist die entzündliche Darmerkrankung eine multifaktoriell bedingte Störung, die durch chronischen Schaden der intestinalen Epithelzellschicht und des tiefer liegenden Bindegewebes charakterisiert ist (Dammeier et al., 1998; Rieder et al., 2007). Unter normalen Verhältnissen kann die normale Gewebestruktur und Funktion wieder hergestellt werden. Der insuffiziente Heilungsprozess bei CED führt oft zu Komplikationen wie ausgedehnter Darmfibrosierung mit der Bildung von Stenosen oder die Entstehung von Fisteln (Pucilowska et al., 2000; Burke et al., 2007). Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von diesen Komplikationen spielt die Modulation der Funktion von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF).

1.2.1 Gestörte Wundheilung und Bildung von Fisteln

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa gehen oft mit Ulzerationen und großen Wundarealen einher (Lorenz, 1996). Die Wundheilung bei diesen Erkrankungen ist

gestört. Gerade nach einer Proktektomie (Entfernung des Rektums) (McGarity et al., 1976; Hartz et al., 1980; Waits et al., 1982; McLeod et al., 1983; Oakley et al., 1985; Tompkins et al., 1985) oder Proktocolektomie (Entfernung des Colons und des Rektums) (Hartz et al., 1980) ist eine langsame Heilung der Operationswunden nicht selten. Eine Folge der Wundheilungsstörung stellt die Fistelbildung dar. Eine Fistel (von lat. *fistula* = Pfeife, Röhre) ist eine nicht natürlich vorbestehende, röhren- oder röhrennetzartige Verbindung zwischen einem inneren Hohlorgan und anderen Organen oder der Körperoberfläche (Abbildung 1.5 und 1.6).

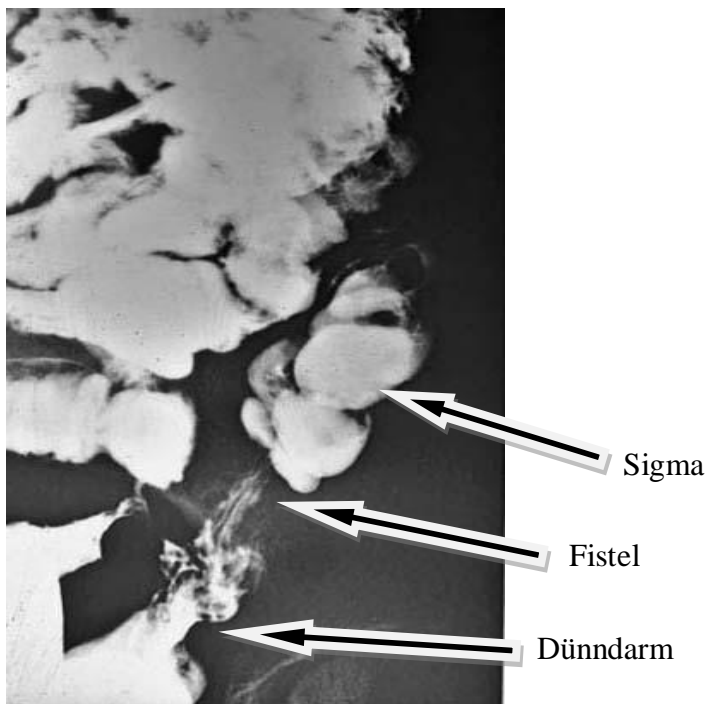


Abbildung 1.5

Sigma-Fistel (Dickdarmfistel) bei Morbus Crohn

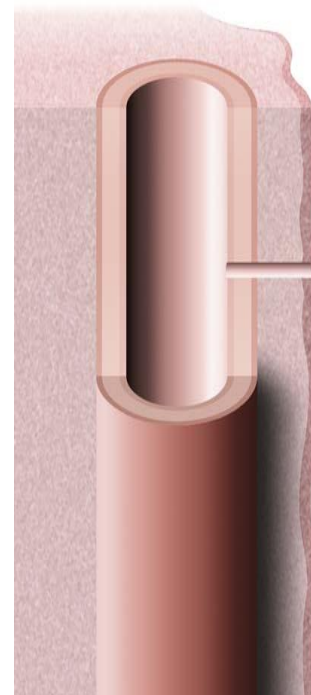


Abbildung 1.6

Schematische Darstellung einer Enterokutanen Fistel (zwischen Körper-Hohlraum und der Haut)

(Material zur Vorlesung "Einführung in die Radiologie - Anatomie in der Bildgebung" Prof. Dr. K.J. Klose: Medizinisches Zentrum für Radiologie, Klinik für Strahlendiagnostik, Klinikum der Philipps-Universität Marburg; <http://online-media.uni-marburg.de/radiologie/bilder/kap3/fistel.htm>).

Bei Morbus-Crohn-Patienten wird als Prädispositionsfaktor für die Entstehung von Fisteln die transmurale Entzündung aller Darmwandabschnitte beschrieben (Shapiro W., 2008; Bashour M., 2009; Nielsen et al., 2009). Die Inzidenz von Fisteln wird in der Literatur nach 10 Jahren mit 33% und nach 20 Jahren mit einem Anstieg bis auf 50% angegeben (Schwartz et al., 2002). Als Hauptproblem wird die Entstehung von Komplikationen betrachtet. Perianalfisteln und periproktitische Abszesse, die gelegentlich schon vor der ersten intestinalen Crohn-Manifestation auftreten können, sollen in 16% der Fälle bereits bei Krankheitsbeginn nachweisbar sein (Goebell H.S., 1997). Zur Entstehung von perianalen Fisteln gibt es verschiedene Hypothesen. Eine besagt, dass das Vorstadium einer Analfistel i. d. R. ein periproktaler Abszess ist, hervorgerufen von einer pyogenen (=eiterbildend) Entzündung im Anldrüsenbereich (Stelzner F., 1981; Hancke E., 1990). Begünstigende Faktoren für die eitrige Fortleitung einer solchen Infektion sind die nur gering anschwellfähige Haut des Analkanals, der dauerkontrahierte Schließmuskel und die damit insgesamt verhältnismäßig geringe Durchblutung des Gewebes in diesem Bereich (Stelzner F., 1981). Die zweite Hypothese vermutet, dass Fisteln als tiefe penetrierende Ulzeration im Anus oder Rektum beginnen. In die Ulzeration lagert sich mit der Zeit Kot ein, die während der Darmentleerung durch den intraluminalen Druck in das subkutane Gewebe gedrückt wird und so die Ulzeration zunimmt und Fisteln entstehen (Brenmoehl J., 2007).

Im Kontrast zur Häufigkeit des Auftretens von Fisteln bei Morbus Crohn steht der Mangel an effektiven konservativen und chirurgischen Therapiemöglichkeiten. Die Behandlungsoptionen hängen von den Symptomen, der Lokalisation und der Zahl der Fistel sowie von den schon bestehenden rektalen Komplikationen ab. Die inneren Fisteln, wie ileoileal oder ileocecal sind größtenteils asymptomatisch und erfordern chirurgische Behandlung. Im Vergleich dazu können die perianalen Fisteln, welche oft sehr schmerzhaft sind, zu einer Abszessentstehung führen (Nielsen et al., 2009). Nach Therapie mit dem anti-TNF- α Antikörper Infliximab – als bisher wirksamster konservativer Behandlung – kommt es bei 55% der Patienten zu einem vorübergehenden Fistelverschluss (im Vergleich zu 13% der Patienten, die Placebo erhalten) – die Wirkung dieser medikamentösen Therapie hält jedoch im Mittel nur über einen Zeitraum von drei Monaten an (Present et al., 1999). Ein Drittel aller Patienten mit Fisteln haben trotz maximaler konservativer Therapie klinisch rezidivierende Fisteln und bei lediglich einem weiteren Drittel ist eine dauerhafte Remission möglich. Bis zu

82% der symptomatischen Fisteln sowie die entstandenen Abszesse müssen deshalb im Verlauf chirurgisch behandelt werden.

Diese langwierigen Heilungsprozesse stellen für die behandelten Patienten eine hohe physische und psychologische Belastung dar. Neue Therapieansätze zur medikamentösen Behandlung von Fisteln und zur Verbesserung der postoperativen Wundheilung bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sind deshalb unbedingt notwendig. Dafür müssen allerdings erst die Mechanismen, die bei der Wundheilung eine Rolle spielen, untersucht und verstanden werden.

1.2.2 Überschießende Wundheilung und Entstehung von Stenosen

Eine häufige Komplikation bei Patienten mit Morbus Crohn und eher selten bei Colitis Ulcerosa ist die Entstehung von Darmstenosen. Bis zu 50% der Morbus Crohn Patienten sind davon betroffen. Unter dem Begriff Stenose versteht man eine, im Rahmen von Entzündungen auftretende Engstellung des Darmlumens, die bei lang andauernder Entzündung auch narbig fixiert sein kann. Deshalb ist bei vielen Betroffenen eine Operation trotz engmaschiger ärztlicher Betreuung und medikamentöser Behandlung unumgänglich.

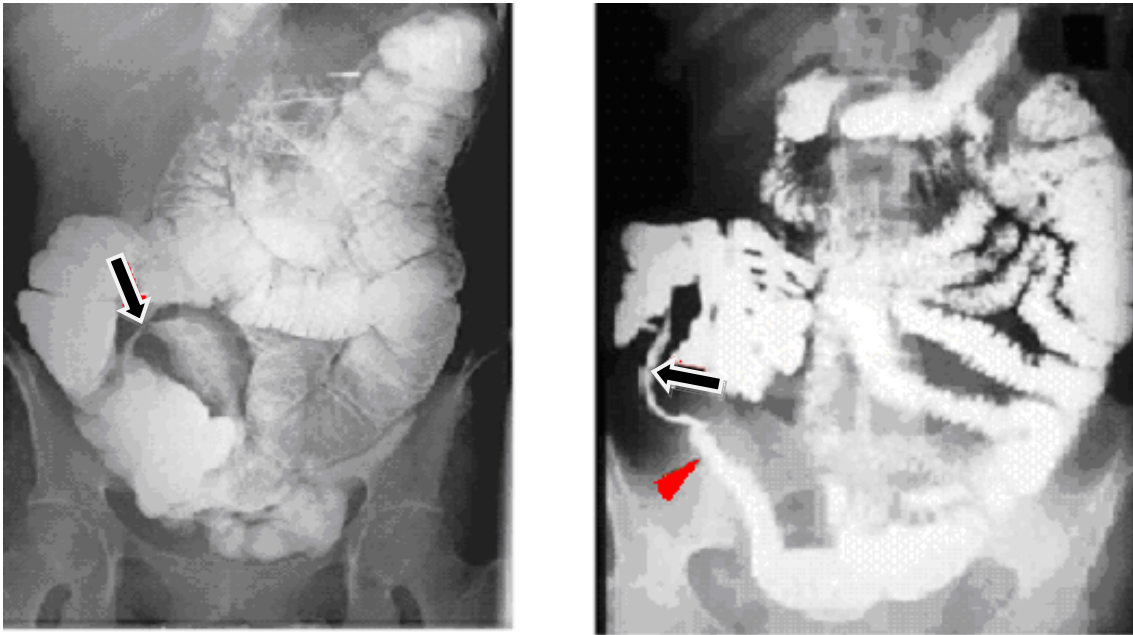


Abbildung 1.7

Links: Konventionelles Enteroklysma bei fortgeschrittenem Morbus Crohn mit „Pflasterstein-Relief“ im terminalen Ileum und kurzstreckig mäßiggradiger Stenose valvulär (Pfeil). Rechts: Monokontastdarstellung des Dünndarms bei Morbus Crohn mit langstreckiger Stenose des präterminalen Ileums (Pfeilspitze) und terminalen Ileums (Pfeil), klassische Ileitis terminalis (string sign) im Akutstadium. (Sailer et al., 2006; www.kup.at/gastroenterologie)

Die Ursache der Entstehung von Stenosen ist bislang weitgehend ungeklärt. Bekannt ist, dass Patienten mit einer Mutation im NOD 2-Gen ein erhöhtes Stenoserisiko zeigen und eher zu rezidivierenden Stenosen neigen (Louis et al., 2003; Alvarez-Lobos et al., 2005).

Die Bildung von Stenosen beruht auf einer Fibrose der Darmwand, zu der es als Folge einer überschießenden, gestörten Wundheilung kommt. Dies führt zu einer Veränderung der Darmarchitektur und somit zu einer Beeinträchtigung der Darmfunktion. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist eine chronische oder immer wiederkehrende Entzündung der intestinalen Mukosa, die mit Schädigungen des Gewebes einhergeht (Rogler et al., 2002). Dabei kommt es zur Migration und späteren Proliferation von mesenchymalen Zellen wahrscheinlich in der Submukosa, die bei Morbus Crohn

typischerweise stark entzündet sein kann. Der genaue Mechanismus, die Induktion und die Regulation der Migration dieser mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen) in Bereiche von Submukosa und auch Mukosa mit einer Gewebedestruktion oder einem Gewebedefekt ist bisher unzureichend bekannt. Um die Gewebedefekte zu verschließen, bilden die mesenchymalen Zellen dort vermehrt Kollagen. Dadurch kann es zu einer Kollagen- und mesenchymalen Zell-Anhäufung in der Mukosa kommen (Graham M.F., 1995; Burke et al., 2007). Fibroblasten, isoliert aus der Lamina propria von Morbus Crohn-Strikturen, produzieren mehr Kollagen Typ III im Vergleich zu isolierten Fibroblasten aus nichtstikturiertem oder normalem Darm (Stallmach et al., 1992).

Dieser Prozess findet in einem Hohlorgan statt. Der Darm wird durch die Verdickung aller Schichten sowie erschwerte oder fehlende Beweglichkeit der Mukosa undurchgängig (Abbildung 1.8).

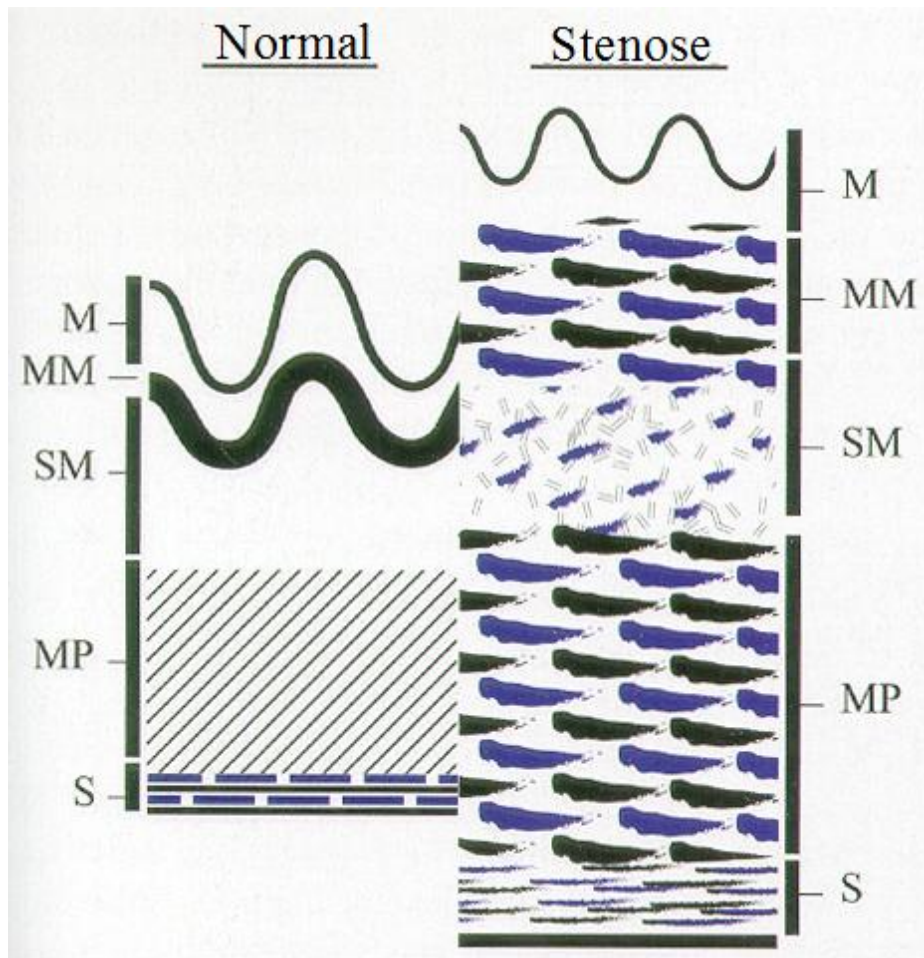


Abbildung 1.8

Die Rolle des submukosalen Kollagens in Bezug auf die Beweglichkeit der Mukosa über die Muscularis. Die stenotierten Darmabschnitte zeigen eine verstärkte Kollageneinlagerung in der Submukosa und verdickte Muskelschichten, die wahrscheinlich auf Zellproliferation und Hypertrophie zurückzuführen sind. M=Mukosa; MM=Muscularis Mukosa; SM=Submukosa; MP=Muscularis Propria; S=Serosa (Burke et al., 2007)

Wie bei der Heilung von Hautverbrennungen erfährt das reparierte Gewebe eine Kontraktion, wenn in den Heilungsprozess mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten und Muskelzellen involviert sind. Mögliche Erklärung dafür ist, dass sowohl glatte Muskelzellen als auch Fibroblasten die fremde Matrix, auf der sie wachsen, kontrahieren können. Im vernarbten Darm kann diese Kontraktion von Matrix und mesenchymalen Zellen zur Verschlimmerung einer Stenose führen (Graham M.F., 1995).

1.3 Zelluläre Vermittler und Entstehung der Darmfibrosierung

Der humane Darm ist dadurch gekennzeichnet, dass das Darmlumen nur eine einlagige Epithelschicht als selektiver Barriere aufweist. Dieses Epithel muss einerseits die Passage potentiell toxischer/pathogener Substanzen in den Wirt verhindern, andererseits aber die digestiv-resorptive Nahrungsassimilation erlauben. Die luminale Flora scheint bei CED zur Entstehung der chronischen Darmentzündung beizutragen. Die Translokation luminaler Bakterien(produkte) in das während der Entzündung beeinträchtigte (sub)epitheliale Gewebe kann eine Vielzahl von Signalwegen induzieren, welche die Darmentzündung fördern und aufrechterhalten können (Abbildung 1.9).

Die Fibrose der Darmwand stellt eine ernsthafte Komplikation der CED dar. Sie kommt zustande durch die Reaktion des Darmgewebes auf die von der chronischen Entzündung verursachten Schäden. Der Mechanismus der Darmfibrose ist sowohl kompliziert als auch dynamisch. Es sind verschiedene Zelltypen, unterschiedliche Zellereignisse und viele lösliche Faktoren beteiligt (Rieder et al., 2009). Das Verständnis dieser Mechanismen ist notwendig um Wege zur Vermeidung der Entstehung der Darmfibrose, zur Entdeckung von frühen Anzeichen der Fibrose, zur Einschätzung des Risikos nachfolgender Komplikationen sowie zur Entwicklung möglicher Therapien zu finden.

1.3.1 Fibroblasten und Myofibroblasten

Im menschlichen Körper kommen die Fibroblasten und die Myofibroblasten in allen Organen vor. Sie gehören zur Familie der Bindegewebszellen und sind für das architektonische Gerüst des Körpers von großer Bedeutung. Sie sind wichtige Strukturgeber und üben eine wichtige Stützfunktion aus. Fibroblasten und Myofibroblasten, beides Zellen mesenchymalen Ursprungs, werden auch als hauptverantwortliche Zellen für die Darmfibrose betrachtet, die für die Bildung von mehreren extrazellulären Matrixproteinen (ECM) verantwortlich sind, unter denen das Kollagen den größten Anteil einnimmt. Als zellulären Ursprung für die vermehrte Bildung von extrazellulären Matrixproteinen vermuten Powell et al. aktivierte α -SMA-

positive Myofibroblasten (Powell et al., 1999a). Aus welchem mesenchymalen Zelltyp des Darms diese Myofibroblasten entstehen, ist bisher weitgehend ungeklärt. Drei mesenchymale Zellarten im Intestinum lassen sich auf Grund immunhistochemischer Färbereigenschaften mit Antikörpern gegen Vimentin (V), ein Intermediärfilament-Protein des Zytoskeletts und α -smooth muscle actin (α -SMA, Glattmuskelaktin) (A) unterscheiden: Fibroblasten (V+/A-), glatte Muskelzellen (V-/A+) der Muscularis mucosae und Muskularis propria und die so genannte intestinalen subepithelialen Myofibroblasten (ISEMF) (V+/A+), die in der Nachbarschaft zum Epithel gelegen sind (Pucilowska et al., 2000; Powell et al., 1999a). Es ist noch unklar, ob die Myofibroblasten von den ISEMFs stammen oder ob sie transdifferenzierte Fibroblasten oder glatte Muskelzellen darstellen (Powell et al., 1999b). In dieser Arbeit wird der Begriff „Fibroblast“ für alle Bindegewebszellen mesenchymalen Ursprungs verwendet.

1.3.2 Zelltypen: Sternzellen, Knochenmarkstammzellen, zelluläre Transformation, Fibrozyten, Perizyten

Über die Herkunft intestinaler Fibroblasten ist bisher wenig bekannt. Bekannte Quellen sind Sternzellen und Knochenmarkstammzellen (Rieder F., Fiocchi C., 2008). Sternzellen aus der intestinalen Mukosa von CED-Patienten, die sich während des Entzündungsprozess zu α -SMA-positiven Myofibroblasten differenzieren, zeigen eine erhöhte Proliferationsrate und sezernieren mehr Kollagen Typ III im Vergleich zu Kontrollen (Rieder F., Fiocchi C., 2009). Während diese Prozesse kursiv bei der Wundheilung wichtig sind, um die Funktion des gesamten Organs zu erhalten, schädigen sie den Darm umso stärker, je länger die Entzündung anhält und je häufiger sie vorkommen. So kommt es schließlich zur Bildung einer Darmfibrose.

Adulte Stammzellen des Knochenmarks sind undifferenzierte Zellen, die in vielen Organen und Geweben, z.B. Knochenmark, Blut, Leber, Gehirn, Haut, Darm, Bauchspeicheldrüse, Skelettmuskel und Auge vorkommen. Sie sind fähig, sich einerseits selbst ein Leben lang zu erneuern und andererseits zu spezialisierten Zellen des jeweiligen Gewebes zu differenzieren. Es ist bekannt, dass in entzündetem Darmgewebe die Stammzellen sich sowohl im menschlichen als auch im tierischen Organismus zu Fibroblasten differenzieren können (Lin et al., 2008). Studien zeigen,

dass sich die transplantierten Stammzellen bei Trinitrobenzol-Schwefelsäure - induzierter Colitis zu funktionsfähigen Fibroblasten differenzieren. Mit steigender Entzündung nimmt die Anzahl der Zellen zu, um das geschädigte Gewebe zu reparieren (Brittan et al., 1984-1995; Bamba et al., 2006).

In den Wundarealen können die Fibroblasten auch aus anderen Quellen wie den zirkulierenden Fibrozyten, Perizyten, und den Epithelzellen und Endothelzellen entstehen. Über diese genauen Mechanismen ist noch wenig bekannt.

Fibrozyte sind mesenchymale Zellvorläufer des Knochenmarks. Sie sind spindelförmig und weisen lange verzweigte Zellfortsätze auf. Sie exprimieren hämatopoetische (CD14, CD15) und mesenchymale Zellmarker (CD34), können sich bei den Entzündungsprozessen kursiv in Fibroblasten umwandeln, die dann Proteine wie Kollagen Typ I, III und α -SMA produzieren um die geschädigten Gewebe zu reparieren (Quan et al., 2004; Bellini et al., 2007). Während der Entzündung wandern die Fibrozyten direkt ins gereizte Gewebe, differenzieren sich zu mesenchymalen Zellen und produzieren dann ECM Proteine (Kuwana et al., 2003; Gordon et al., 2005).

Perizyten sind mesenchymale Zellen, die der Außenwand von Kapillaren anliegen und mit Fortsätzen das Gefäß umspannen. Die kapillaren Perizyten stabilisieren die Kapillarstruktur und spielen eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) (Gerhardt et al., 2003). Zudem können sich die Perizyten bei Entzündungen in Fibroblasten umwandeln und zur Bildung einer entzündungsassoziierten Fibrose beitragen. In der Hautwundheilung lösen sich die Perizyten von Kapillaren, wandern in das geschädigte Gewebe und differenzieren sich in Kollagen produzierende Fibroblasten (Sundberg et al., 1996). Die Beteiligung der Perizyten an Entzündungen macht ihren Beitrag an der Darmfibrose sehr wahrscheinlich.

Die oben genannten Mechanismen, die zu Darmfibrose führen, beinhalten Fibroblasten, die aus mesenchymalen Zellen entstanden sind. Untersuchungsergebnisse zeigen, dass für die Entstehung der Darmfibrose nicht unbedingt mesenchymale Zellen nötig sind. Überall im Körper können Fibroblasten durch die Transformation von Zellen erzeugt werden, die nicht mesenchymalen Ursprungs sind. Ein Beispiel dafür ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ein Prozess, der zur Gewebefibrose beiträgt. EMT ist in zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse involviert (z.B. embryonale Entwicklung, entzündliche oder neoplastische Prozesse) und wird durch dramatische Änderungen in Zellphänotyp und Funktion charakterisiert (Kalluri et al., 2003). Dieser

Mechanismus beschreibt den Übergang einer primär epithelialen Zelle in eine Zelle mit mesenchymalen Eigenschaften. Die epitheliale Zelle nimmt eine spindelförmige Morphologie an, verliert typische epitheliale Zellmarker, exprimiert dann typische Fibroblasten Zellmarker wie fibroblast-spezifisches Protein (FSP)-1, α -SMA, Vimentin, und entwickelt die Fähigkeit, Kollagen und Fibronectin zu produzieren. Zudem verändert sie die Fähigkeit der Zelle zur Migration und Infiltration. Zellen nach EMT, sind widerstandsfähiger gegen Apoptose und zeigen eine erniedrigte Mitoserate (Kalluri et al., 2003; Lee et al., 2006). EMT trägt zur Bildung von Organfibrose in verschiedenen Geweben bei.

Eine ähnliche Form der Transformation, relevant für die Entstehung einer Organfibrose, ist die endothelial-mesenchymale-Transition (EndoMT). Untersuchungsergebnisse zeigen die Transformation von erwachsenen endothelialen Zellen in glatte Muskelzellen kursiv (Frid et al., 2002). Über die EMT und EndoMT bei CED ist nur wenig bekannt. Aus der Tatsache, dass die für die Transformation notwendigen Mediatoren (z.B. TGF- β 1 und entzündliche Zytokine) auch im gereizten Darmgewebe vorhanden sind, und dass eine morphologische und funktionelle Ähnlichkeit zwischen dem Herz und dem Darmgefäßsystem besteht, ist es sehr wahrscheinlich, dass EMT und EndoMT bei CED stattfinden.

1.3.3 Fibroblasten Proliferation

Die Hauptmechanismen, die verantwortlich sind für die Entstehung von Darmfibrose sind das Wachstum und die Proliferation von Fibroblasten. Bekannt ist, dass die aus der Mukosa von entzündlichen oder fibrosierten Darmanteile von CED-Patienten isolierten Fibroblasten eine schnellere Proliferation zeigen als Fibroblasten aus normaler Darmmukosa (Lawrance et al., 2001a; McKaig et al., 2002). Für die Fibroblastenproliferation spielen unterschiedliche Faktoren eine wichtige Rolle. Während der Wundheilung oder im Entzündungsprozess werden verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z.B. der platelet-derived growth factor (PDGF), der basic fibroblast growth factor (bFGF) sowie proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β und TNF- α freigesetzt, die die Fibroblastenproliferation modulieren (McGarity et al., 1976). Die meisten Untersuchungsergebnisse zeigen in der

Wachstumsrate kursiv keine Unterschiede zwischen den Fibroblasten von CED-Patienten und denen aus der gesunden Mukosa nach Aktivierung mit den oben genannten Wachstumsfaktoren. Im Rahmen der Entzündung entsteht auch das Gewebehormon Prostaglandin E2 (PGE2), durch Cyclooxygenasen und nachfolgenden Prostaglandin-Synthasen aus der Arachidonsäure, welcher die Fibroblasten Proliferation und die Kontraktion von ECM hemmen kann (Kohyama et al., 2001). PGE2 wird in der Mukosa von Patienten mit CED in erhöhter Konzentration gefunden (Schmidt et al., 1996; Wiercinska-Drapalo et al., 1999).

Neben den Wachstumsfaktoren und Zytokinen ist bei aktiver Entzündung in der Darmmukosa eine erhöhte Zahl von Entzündungszellen wie eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und T-Zellen zu finden. Vermutlich kann ein direkter Zell-Zell Kontakt mit diesen entzündlichen Zellen die Fibroblastenproliferation kursiv stimulieren (Berton et al., 2000; Xu et al., 2004), (Abbildung 1.9).

1.3.4 Migration von Fibroblasten

Die Migration von mesenchymalen Zellen aus dem umliegenden unverletzten Gewebe in Bereiche einer Gewebedestruktion oder eines Gewebedefektes ist ein essentieller Schritt im Wundheilungsprozess. In der frühen Phase der Wundheilung wird das geschädigte Bindegewebe durch intensive Abbauprodukte entfernt. Durch die Abbauprodukte und die Sekretion verschiedener Moleküle bei der Entzündung entstehen chemotaktische Gradienten, die die Modulation von Fibroblasten und deren Migration in das Wundgebiet induzieren. Fibroblasten, die in das Granulationsgewebe einwandern, stammen vermutlich aus allen Darmschichten, einschließlich Mukosa, Submukosa und Muscularis. Nach der Aktivierung verändern sich die Fibroblasten während ihrer Wanderung in die Wunde phänotypisch. Diese gerichtete Wanderung der Fibroblasten entlang eines chemotaktischen Gradienten ist eng mit einer zyklischen Anheftung und Ablösung der Adhäsionsmoleküle von Proteinen der extrazellulären Matrix verbunden (Goris R.J.H., 1997). Wenn die Entzündung nachlässt, bilden sich die chemotaktischen Gradienten zurück, was zu einer Beendigung der mesenchymal Zellwanderung führt (Rieder et al., 2008).

Entscheidender Faktor im Wundheilungsprozess sind die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte. Diese Kommunikationsprozesse werden über Adhäsionsmoleküle vermittelt, deren Expression zum einen durch ihre Liganden und zum anderen durch ein suppressiv oder stimulierend wirkendes Zytokinmilieu reguliert wird. Die Adhäsionsmoleküle übertragen auch Signale in das Zellinnere, wodurch eine Kommunikation mit dem Zellkern ermöglicht wird, die häufig mit einer Aktivierung oder Deaktivierung der entsprechenden Zellen verbunden ist (Goris R.J.H., 1997).

Im Darm wird die Migration von mesenchymalen Zellen durch autokrine und parakrine Prozesse reguliert. Fibronectin, ein von Fibroblasten sezerniertes Protein der extrazellulären Matrix, ist essentiell für die Migration von intestinalen Mesenchymzellen. Auch andere Faktoren der Darmmukosa wie platelet-derived growth factor PDGF-A, PDGF-B, Insulin growth factor-I (IGF-I) und epithelial growth factor (EGF) können die Migration erhöhen, diese sind jedoch von Fibronectin abhängig (Leeb et al., 2002; 2004). Im Gegensatz dazu zeigen die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interferon (IFN)- γ eine Hemmung der Migration und scheinen an der Fibroblasten Retention bei CED beizutragen (Leeb et al., 2003), (Abbildung 1.9).

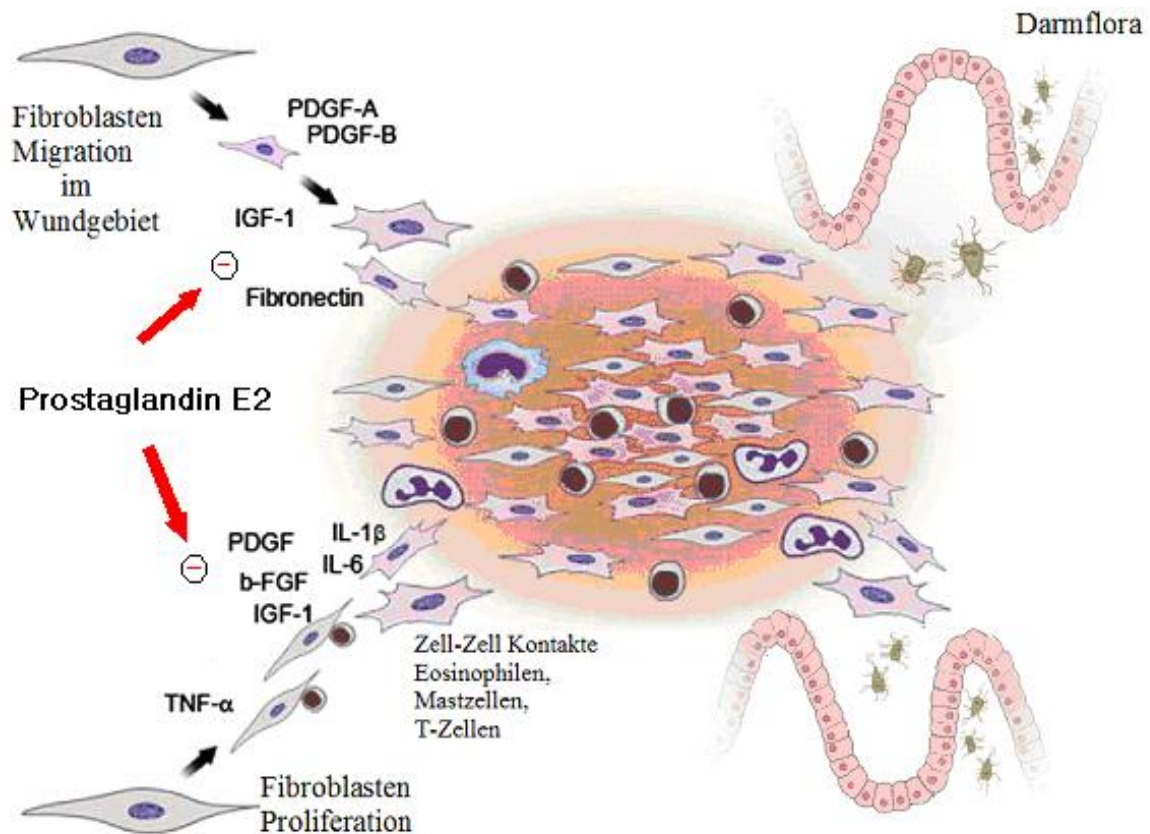


Abbildung 1.9

Verschiedener Ursprung von mesenchymalen Zellen bei der Darmfibrose. Der Fibroblast kann zur Darmfibrose durch Migration in das entzündete Gebiet oder zur Proliferation von lokalen Fibroblasten führen. Die Darmflora, Gewebehormone und die Entzündungszellen können dazu beitragen. (Rieder et al., 2008)

1.3.4.1 Morphologie sich bewegender Fibroblasten: Mikrospiques und Lamellipodien

Die Fibroblasten wandern durch das Ausstrecken von Lamellipodien und Mikrospiques in regelmäßigen Abständen. Die Lamellipodien sind dünne, flächige Fortsätze, die aus einem dichten Geflecht von Aktin-Filamenten bestehen. Die Mikrospiques sind dünne, steife Auswüchse mit einem Durchmesser von ca. 0,1 μm und einer Länge von 5-10 μm , in deren Innerem lockere Bündel aus etwa 20 Aktin-Filamenten liegen (Alberts, 1997a).

Die Aktin-Filamente im Lamellipodium erscheinen auch in anderen Bereichen der Zellrinde. Ein großer Teil dieser Filamente erstreckt sich nach außen, während das Plus-Ende im Leitsaum plasmamembranständig ist (Abbildung 1.10).

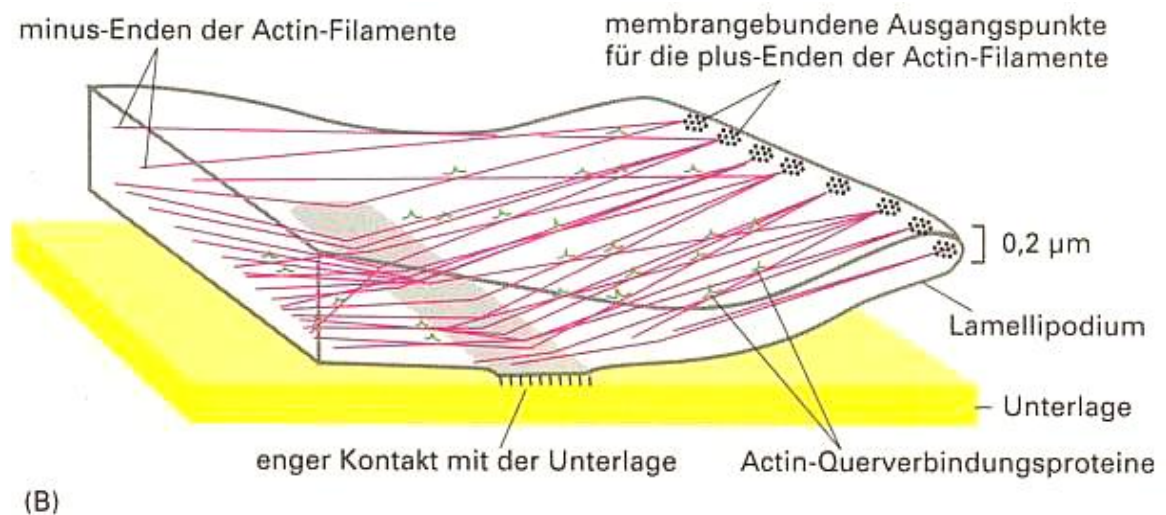
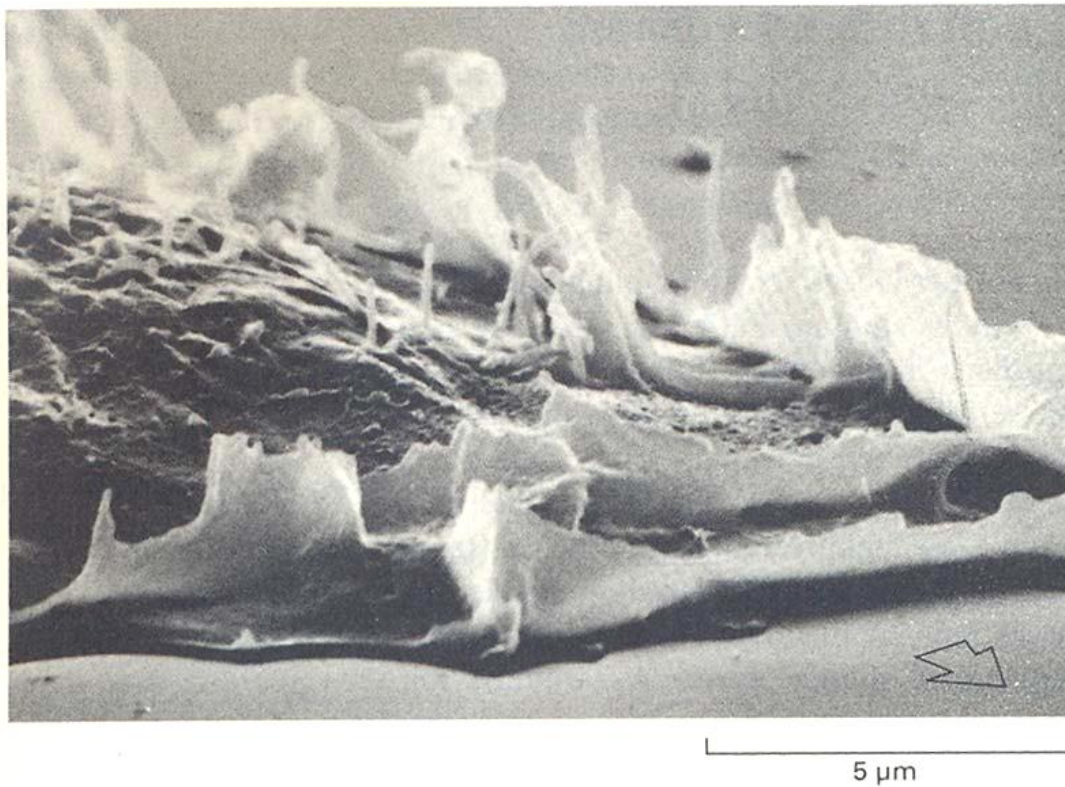


Abbildung 1.10

Schematische Darstellung der Aktin-Filamente (rot) in einem Lamellipodium (Alberts, 1997a)

Das Lamellipodium verhält sich als Struktureinheit: wenn es sich an der Unterlage nicht festheften kann, klappt es meistens schnell als „Kräuselung“ über die Zelle nach hinten (Abbildung 1.11).

**Abbildung 1.11**

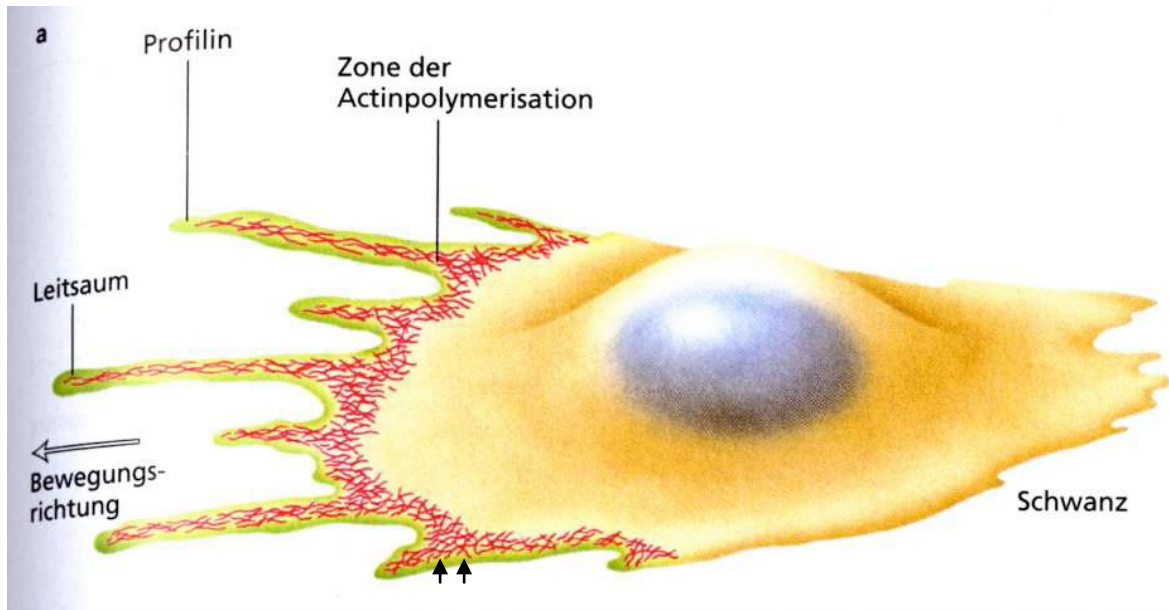
Elektronenmikroskopische Aufnahme eines in der Pfeilrichtung wandernden Fibroblasten. Während der Vorwärtsbewegung der Zelle gleiten Lamellipodien und Mikrospikes, die nicht an der Kulturschale festhaften, über die Oberfläche der Zelle nach hinten. Diese Bewegung wird „Kräuslung“ genannt. (Alberts, 1997b)

Lamellipodien und Mikrospikes können sich sehr schnell bilden und wieder verschwinden. Sie entstehen wahrscheinlich durch örtlich begrenzte Polymerisation von Aktin an der Plasmamembran, wobei sich die Plasmamembran schnell nach außen wölbt, ohne zu zerreißen (Alberts, 1997a).

1.3.4.2 Die Migration von Zellen ist Aktin-abhängig

Die Bewegung von Zellen ist ein Phänomen, das sich auf molekularer Ebene schwer erklären lässt, da sich die verschiedenen Teile der Zelle gleichzeitig - ohne erkennbare Bewegungsorganelle wie beispielsweise eine Flagelle bei Einzeller - verändern.

Die Vorwärtsbewegung der tierischen Zelle beruht auf vielen Aktinumlagerungen. Die genaue Beobachtung der Aktin-Filamente im Leitsaum zeigt eine ununterbrochene Wanderung des Aktins durch die Zelle nach hinten von 1 μm je Minute. Im Zellinneren hingegen wird Aktin fortlaufend depolymerisiert. Möglicherweise werden im Leitsaum neben der Bildung von neuen Filamenten auch Monomere angefügt, so dass sich die Filamente verlängern (Alberts, 1997c). Das Aktin lagert sich unter anderem zu Lamellipodien und Mikrospikes zusammen, es verbindet sich mit Fokalkontakten oder bildet Stressfasern. Die Stressfasern ziehen an der extrazellulären Matrix oder einer anderen Zelle, damit sich ein Fibroblast bewegen kann. Dabei muss die Stressfaser an der richtigen Stelle fest in der Plasmamembran mit Hilfe von Transmembranverbindungsproteinen zwischen zellinneren Aktin-Filamenten und extrazellulärer Matrix verankert sein. Durch die Fokalkontakte wird der etwa 50 nm breite Spalt zwischen dem größten Teil der Fibroblasten-Oberfläche und der Unterlage auf etwa 10-15 nm verringert (Abbildung 1.12).



Fokalkontakte

Abbildung 1.12

Bildung von Aktin-Filamenten am Leitsaum wandernder Zellen. (Lodish et al., 2004)

Stark vereinfacht kann man die Bewegung von Zellen in drei Einzelvorgänge unterteilen (Abbildung 1.13):

- Die Ausstülpung: wahrscheinlich durch Polymerisation von Aktin am Leitsaum werden die Lamellipodien und Mikrospikes aus der vorderen Seite der Zelle nach vorne über das Substrat herausgestreckt.
- Die Anheftung: spezialisierte Anheftungsstrukturen sind in Gewebekultur-Fibroblasten mit dem Ende der Stressfasern assoziiert. Transmembranrezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix verbinden die Plasmamembran mit der Unterlage und Aktin-Filamente im Zytoplasma der Stressfasern treten über Aktin-bindende Proteine mit den zytoplasmatischen Domänen dieser Rezeptoren in Wechselwirkung. Damit sich die Zelle vorwärts bewegen kann, müssen die Kontakte zwischen Zelle und Unterlage ständig neu hergestellt und gelöst werden.
- Der Zug: Bewegung der Zellkörper vorwärts. Der Vorderteil der Zelle zieht sich wahrscheinlich aktiv wie eine Muskelfaser zusammen und der Zellkern und die Hauptmenge des Zytoplasmas werden passiv hinterher gezogen. Eine andere

Theorie besagt, dass sich die Aktin-haltige Zellrinde durch Polymerisation der Aktin - Filamente vorwärts schiebt, so dass in der Zellrinde eine Spannung entsteht. Dadurch entsteht eine Kontraktionskraft, die die hinteren Teile der Zelle nachzieht (Alberts, 1997d).

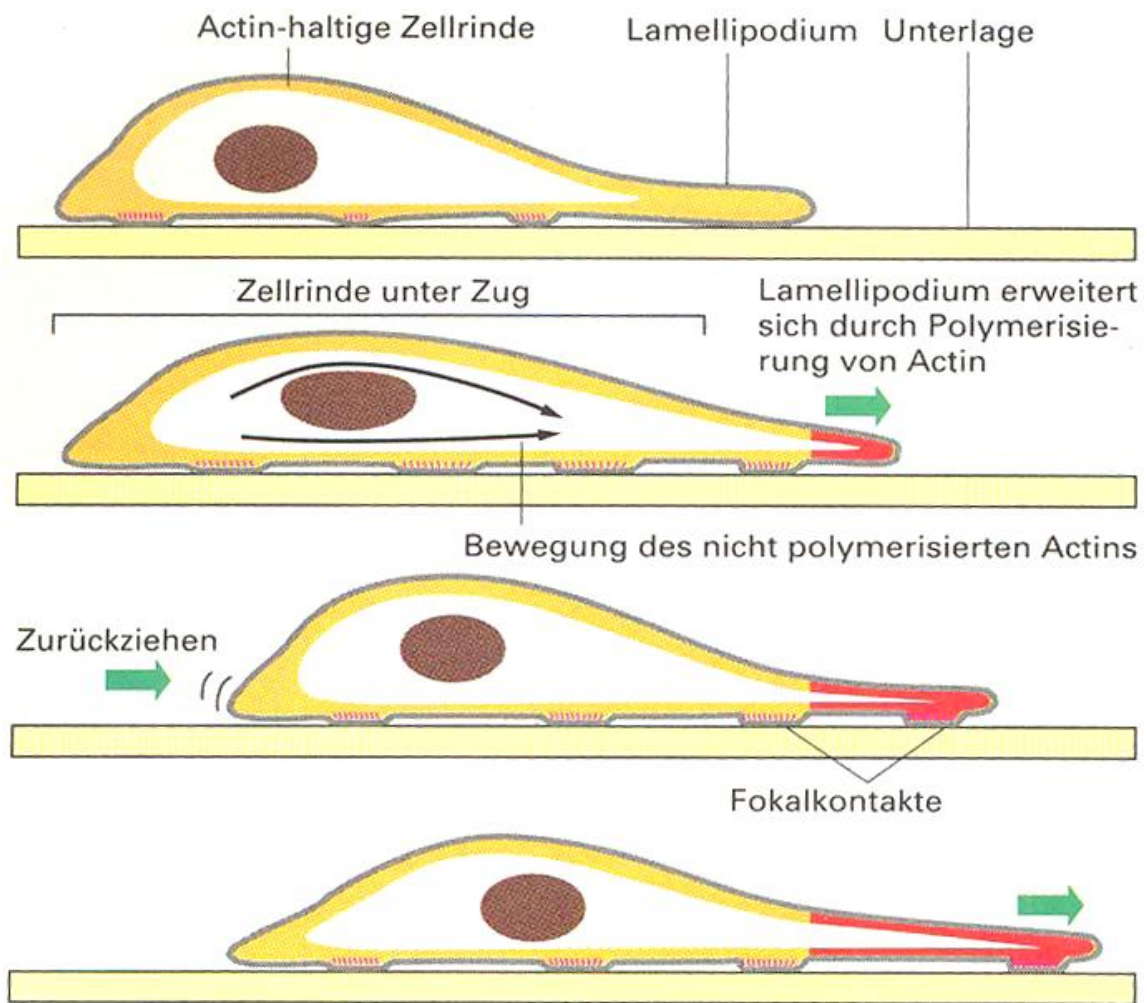


Abbildung 1.13

Modell für die Fortbewegung der Zelle. Die Aktin-haltige Zellrinde dehnt sich durch Aktin-abhängige Ausstülpung und feste Anheftung eines Lamellipodiums am Leitsaum. Die Zelle wird durch die entstehende Zugkraft nach vorne gezogen. Es entstehen neue Fokalkontakte, während sich alte auflösen. Die Zelle kann sich vorwärts bewegen, indem sich dieser Kreislauf ständig wiederholt. Das neu polymerisierte Aktin in der Zellrinde ist rot hervorgehoben. (Alberts, 1997d)

1.4 Extrazelluläre Matrix, Fibronectin, Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren Bedeutung für die Zellmigration

Möglicherweise wird die Migration von intestinalen Myofibroblasten durch verschiedene Faktoren moduliert, die während des Wundheilungs- und Entzündungsprozesses, von intestinalen Fibroblasten, Myofibroblasten und anderen Zellen verstärkt sezerniert werden können. In den folgenden Abschnitten soll näher auf die migrationsbeeinflussenden Faktoren wie Fibronectin, Wachstumsfaktoren und Zytokine eingegangen werden, deren migrationsmodulierende Funktion in dieser Arbeit untersucht wurde.

1.4.1 Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die ECM ist ein azelluläres Netzwerk, das zwischen den Zellen im sogenannten Interzellularraum liegt. Dieser setzt sich aus diversen Komponenten zusammen, die in zwei große Gruppen eingeteilt werden: 1. faserige Bestandteile und 2. Flüssigkeit mit den darin gelösten Substanzen. Den mengenmäßig größten Anteil stellen dabei - neben Wasser - verschiedene Proteine, Proteoglykane und Polysaccharide. Innerhalb der Gruppe der Proteine der ECM nimmt Fibronectin, als ein starker Promotor der Zellmigration, eine wichtige Rolle ein. Daneben kommen Nährstoffe (z.B. Aminosäuren, Glukose), Gewebshormone sowie Elektrolyte vor. Die ECM dient der strukturellen Gewebeintegrität, jedoch konnte auch eine aktivierende und modulierende Potenz auf Immun- und Nicht- Immunzellen nachgewiesen werden (Pakianathan et al., 1995). Die Migration von Fibroblasten in und durch die ECM ist ein wichtiger Teil der initialen Phase der Wundheilung (Nedelec et al., 2000). Die übermäßige Anhäufung von ECM Proteinen ist eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung einer Darmfibrose und die Bildung von Strikturen, die nicht nur einen rein passiven Prozess darstellen. Die ECM selbst sendet Signale an Immun- und Nichtimmunzellen und ist ein aktiver endogener Induktor einer Darmentzündung. Ein Beispiel für diese Funktion stellt das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure dar. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Hyaluronsäure als langkettiges, lineares Polysaccharid vor, das während der Entzündung in kleine Fragmente geteilt wird. Diese binden und aktivieren dann die

Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 und triggern dadurch das angeborene Immunsystem (Jiang et al., 2005). Die ECM kann Signalproteine wie Zytokine und Chemokine speichern, die dann Signale an das Immunsystem senden können (Schor et al., 2000). Untersuchungsergebnisse zeigen eine Verbindung und Interaktion zwischen TNF- α , (einem wichtigen Entzündungsmediator von CED) und Fibronectin und Laminin (Alon et al., 1994) sowie weitere Wechselwirkungen zwischen TNF- α und anderen Bestandteilen der ECM (Vaday et al., 2000).

1.4.2 Fibronectin

Fibronectin (FN) ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das in vielen physiologischen Abläufen, unter anderem in der Gewebsreparatur, in der Migration und der Adhäsion von Zellen sowie während der embryonalen Entwicklung und der Hämostase eine wichtige Rolle spielt.

Fibronectin ist ein Heterodimer aus zwei stabförmigen Polypeptidketten, welche nahe am C-terminalen Ende durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Dieses dimere Matrixprotein mit den strukturellen Typen I, II, III Domänen kann an Zellen, Kollagen, Proteoglykane, Oberflächenrezeptoren und Fibrin binden (Hynes R.O., 1985; 1990). Bisher wurden mehr als 20 verschiedene Isoformen gefunden, die durch alternatives Spleißen der mRNA eines einzigen Gens erzeugt werden. FN wird von unterschiedlichen Zellen produziert. Das lösliche Plasma-Fibronectin wird vor allem in der Leber synthetisiert und ins Blutplasma abgegeben. Dort spielt es eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Blutgerinnung wo FN in das Fibrin-Gerinnel eingebaut wird, um so durch Bindung von Keratinozyten, Fibroblasten und Zellen des Immunsystems die Gewebsregeneration zu beschleunigen. Eine zellassozierte Form des FN, auch zelluläres FN genannt, wird an der Oberfläche von Zellen wie Fibroblasten, Epithelzellen und Makrophagen synthetisiert und wird in der Extrazellulärmatrix als unlösliches Fibronectin-Filament abgelagert. Dieses FN besitzt einerseits eine Art Brückenfunktion zwischen Kollagenfibrillen und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix, andererseits dient es als Adhäsionsmolekül für verschiedene Zellen während diese wandern. Eine kontrollierte Proteolyse von gebundenem FN durch Metalloproteinasen kann die Zell-Migration stark erleichtern. Möglicherweise fördert

FN die Zellwanderung, weil es den Zellen hilft, sich an die Matrix zu heften. Damit sich die Zellen auf der Matrix anheften können, ohne dass sie immobilisiert werden, muss diese Wirkung genau dosiert sein (Alberts, 1997e).

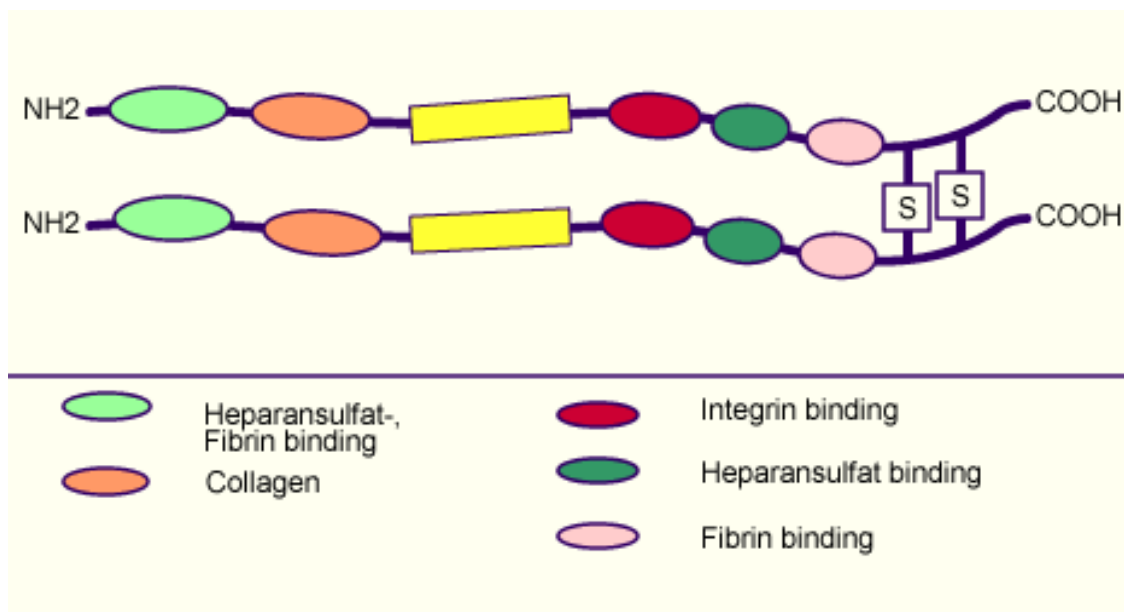


Abbildung 1.14

Schematische Darstellung des FN, ein Dimer mit vielen Variationen. Jede Kette besteht aus etwa 2500 Aminosäuren. (unifr.ch/anatomy/elearningfree/.../sfa/popup_sfa/d-fibronectin.php).

1.4.3 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Wachstumsfaktoren sind wichtige und potente Regulatoren der Migration von Fibroblasten. Sie werden entweder von vielen verschiedenen Zellen sezerniert oder sie sind membranständig. Sie können die Veränderung des Phänotyps von Zellen steuern, um eine Gewebeneubildung im Rahmen der Morphogenese oder Wundheilung hervorzurufen (Xu et al., 1996). Wachstumsfaktoren modulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Im Gastrointestinaltrakt spielen sie eine wichtige Rolle bei Abwehrmechanismen und Entzündungsprozessen in dem sie sowohl für die Ablagerung von extrazellulärer Matrix, als auch für deren Degradierung verantwortlich sind

(Dignass et al., 2001). Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Darm vorhanden ist und somit ein kompliziertes Netzwerk von vielen interagierenden Faktoren existiert (Ito et al., 1990; Chowdhury et al., 1996; Grimm et al., 1996; Lawrance et al., 2001a, b; Zimmermann et al., 2001).

Nach neueren Untersuchungsergebnissen erhöhen PDGF-AB, IGF-I, EGF und TGF- β 1 die Migrationsfähigkeit von intestinalen Myofibroblasten (Leeb et al., 2002; Brenmoehl, 2007). Dadurch wird die Entstehung von Stenosen begünstigt (McKaig et al., 2003).

Die Zytokine sind Proteine, die regulierende Funktion für das Wachstum, die Differenzierung und die Proliferation von Körperzellen ausüben. Einige Zytokine werden dementsprechend als Wachstumsfaktoren bezeichnet, andere spielen eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen und können dann als Mediatoren bezeichnet werden. Man unterscheidet im Wesentlichen fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen spielt das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukinen (IL-1 β , IL-6, IL-8) (Schreiber et al., 1991; Parronchi et al., 1997; Schreiber, 1999) und antiinflammatorischen Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) eine entscheidende Rolle (Nielsen et al., 1996; Nikolaus et al., 1998) und sorgt trotz ständiger Besiedlung des Darmes durch Bakterien für eine normale intestinale Immunregulation. Hier steht neben der Wundheilung, vor allem die krankhafte Veränderung von Gewebe im Vordergrund, wie zum Beispiel die Bildung von Stenosen, Fisteln und Ulzerationen. Bei CED werden während der Wundheilung oder auch im Entzündungsprozess TNF und IFN- γ von mononukleären Zellen sezerniert. IFN- γ hat eine immunstimulierende, vor allem antivirale und antitumorale Wirkung und ist fähig, die Makrophagen zu aktivieren. Vor allem bei Morbus Crohn Patienten scheint IFN- γ erhöht exprimiert zu sein (Braegger et al., 1994; Camoglio et al., 1998). Interferone gelten hauptsächlich als Inhibitoren der Zellbewegung (Brouty-Boye et al., 1980).

IFN- γ und IL-1 β sind wichtige entzündliche Mediatoren bei CED, die im Verlauf des Entzündungsprozesses verstärkt exprimiert und sezerniert werden (Stallmach et al., 1992; Autschbach et al., 2002).

1.4.4 Cyclisches Adenosinmonophosphat erhöhende Substanzen

1.4.4.1 Prostaglandin E2 (PGE2)

Prostaglandine gehören zu der Gruppe der Gewebshormone. Die Biosynthese dieser lokal wirksamen Gewebshormone kann hormonell oder durch Wachstumsfaktoren induziert werden (Smith W.L., 1989). Sie entstehen durch Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) und nachfolgenden verschiedenen Prostaglandin-Synthasen aus der Dihomogammalinolensäure (DGLA), der Arachidonsäure oder der Eicosapentaensäure. Sie kommen mit unterschiedlicher Zusammensetzung und Funktion überall im Organismus vor. Unterschieden werden die verschiedenen Unterformen nach Struktur, Synthese, Vorkommen, Wirkung und Regulation: Prostaglandin H₂ (PGH₂), Prostaglandin I₂ (PGI₂, auch Prostacyclin genannt), Prostaglandin F₂ (PGF₂), Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Tromboxan. PGE₂ wird durch die Prostaglandin-E-Synthase aus Prostaglandin H₂ synthetisiert und ist zusammen mit PGI₂ das Hauptprostaglandin, welches in das Entzündungsgeschehen involviert ist.

Bekannt ist, dass PGE₂ und zum Teil auch PGD₂ verschiedene Funktionen von Fibroblasten inklusiv Proliferation, Produktion von Kollagen Typ I und ECM sowie die Migration in der Lunge hemmen kann (Fine et al., 1987; Kohyama et al., 2002a; Huang et al., 2007). Untersuchungsergebnisse zeigen auch eine erhöhte Konzentration von PGE₂ sowohl bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen als auch in der intestinalen Mukosa von CED Patienten (Schmidt et al., 1996; Wiercinska-Drapalo et al., 1999;). PGE₂ wird als dominierendes Prostaglandin bei CED betrachtet. Die Prostaglandinrezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Insgesamt wurden 4 Subtypen des EP-Rezeptor identifiziert: EP1 bis EP4, die an verschiedene Signalwege gekoppelt sind (Tabelle 1.2).

Rezeptor	Signalweg	Liganden	G-Protein-Familie
EP1	IP3 ↑	PGE2	Gq
EP2	cAMP ↑	PGE2	Gs
EP3 (Subtypen I-VIII)	cAMP ↓ IP3 ↑	PGE2	Gi, Gq
EP4	cAMP ↑	PGE2	Gs

Tabelle 1.2

Einteilung und Charakteristika der EP-Rezeptoren. (cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, IP3: Inositol-1,4,5- Triphosphat)

Die Wirkung von PGE2 wird vermittelt entweder durch einen Anstieg oder Abfall von cAMP oder durch eine Aktivierung der Proteinkinase C, die wiederum Phosphatidylinosindiphosphat in Inositoltriphosphat und Diacylglycerin spaltet und letztendlich zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Abbildung 1.17). Die Bindung an EP2- oder EP4-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase mit cAMP-Anstieg. Eine Bindung an einen EP3-Rezeptor führt zu einem Abfall der Adenylatcyclase, eine Bindung an einen EP1-Rezeptor führt zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Über die Wirkung von PGE2 auf die Migration von Fibroblasten sowie über die Bedeutung der daran beteiligten Rezeptoren und Mechanismen, ist nur wenig bekannt. Untersuchungsergebnisse mit Lungenfibroblasten zeigen, dass PGE2 die Fibroblasten Proliferation, Migration, Kollagen Typ I- und ECM-Produktion hemmt (Fine et al., 1987, 1989; Skold et al., 1999; Kohyama et al., 2002a; Moore et al., 2005; Huang et al., 2007). Zudem wurde auch die Chemotaxis bei humanen fetalen Lungenfibroblasten gehemmt (Kohyama et al., 2001). Auf die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäße wurde ebenfalls eine inhibitorische Wirkung von PGE2 beschrieben (Pasricha et al., 1992; Goncharova et al., 2003).

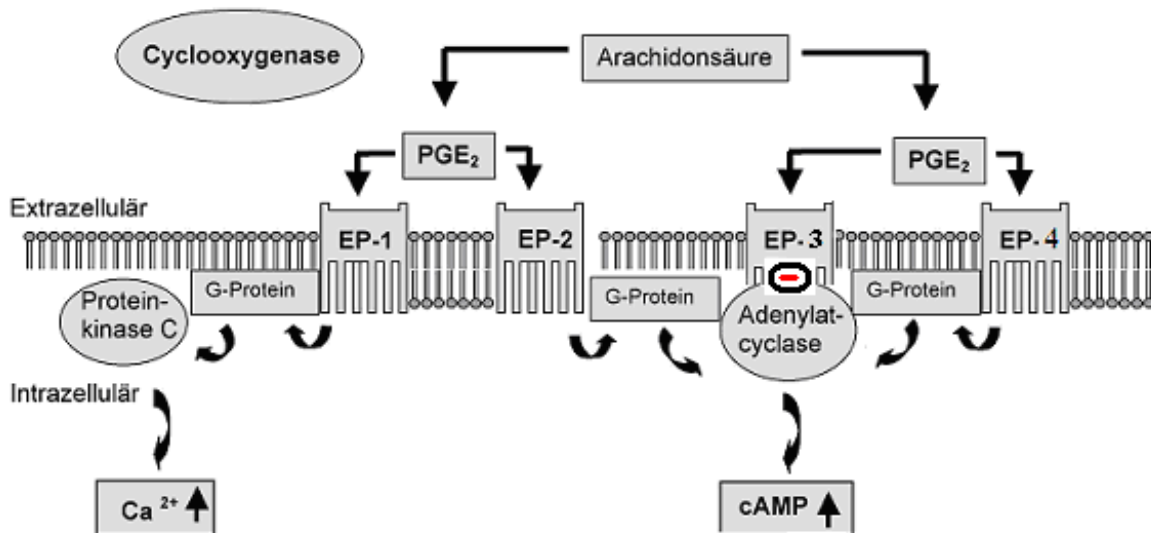


Abbildung 1.15

Schematische Darstellung der Prostaglandinfreisetzung durch Cyclooxygenase sowie der Signaltransduktion: EP-1 Rezeptorstimulation führt zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums, während eine EP-2 und EP-4 Rezeptorstimulation zu einer Akkumulation von cAMP führt. EP-3 Rezeptorstimulation führt zu einem Abfall der Adenylatcyclase. (Brochhausen C., 2005; <http://www-klinik.uni-mainz.de/Pathologie>)

1.4.4.2 Forskolin

Forskolin ist in Harfenkraut (*Coleus forskohlii*, Buntnessel) enthalten und zählt zu den einfachen Lipiden. Forskolin ist ein bekannter Stimulator der Adenylatcyclase. Durch die Aktivierung der Adenylatcyclase wird zelluläres ATP (Adenosintri-phosphat) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt und der intrazelluläre Spiegel von cAMP steigt. In den Untersuchungen mit humanen fetalen Lungenfibroblasten konnte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus durch Forskolin beobachtet werden (Kohyama et al., 2001).

1.4.4.3 Phosphodiesterase - Hemmer

Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), als „second messenger“ ist ein intrazellulärer Vermittler der Wirkung vieler Hormone. Eine erhöhte Konzentration von cAMP bewirkt eine Phosphorylierung der Proteinkinase A, die zu vielfältigen Auswirkungen – mit Modulation der Aktivität von Immun- und Nicht-Immunzellen – führt. Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration wird durch die Aktivität der Phosphodiesterase (PDE) begrenzt, die cAMP zu 5'Adenosin-Monophosphat (AMP) abbaut. Durch Hemmung der Phosphodiesterasen wird die Hydrolyse verhindert und die intrazellulären cAMP-Spiegel steigen.

Die beiden PDE-Inhibitoren Pentoxifyllin und Rolipram gehören zu den insgesamt elf bekannten Klassen der PDF (Beavo et al., 1995; Fawcett et al., 2000). Pentoxifyllin hemmt die PDE Typ 1-5. Rolipram, ein 4-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy-phenyl)-2-pyrrolidon, gehört zu der Gruppe der spezifischen PDE Typ-4 Hemmer (Sommer et al., 1995). Die Isoenzyme PDE Typen 1-3 und PDE Typ-5 werden nicht beeinflusst. Die Wirkung auf die PDE Typen 6-11 ist bisher nicht untersucht.

Ergebnisse mit mesenchymalen Zellen pulmonalen oder renalen Ursprungs zeigen, dass die meisten Effekte der PDE Typ-4 Inhibitoren – wie z.B. antiproliferative Wirkung, verminderte Chemotaxis und Fähigkeit zur Kontraktion von Kollagengelen - durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung vermittelt werden (Kohyama et al., 2002b; Lin et al., 2005). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die meisten Effekte der PDE Typ-4 Inhibitoren durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung vermittelt werden.

Bisher gibt es kaum Publikationen über die Wirkung der spezifischen Suppression der PDE Typ-4 auf intestinale Fibroblasten und deren Migration. In vivo wurde die Wirkung der spezifischen Hemmung der PDE in einer Vielzahl von Tiermodellen und humanen Studien über Asthma und Multiple Sklerose (Dinter et al., 2000; Karish et al., 2006) untersucht. Der entzündungshemmenden Wirkung der Phosphodiesterase-Inhibitoren macht den Einsatz dieser Substanzklasse bei CED sinnvoll.

2 Arbeitsziele und Fragestellungen

2.1 Bisherige Ergebnisse

Die Regulation der Migration von Fibroblasten ist ein wichtiger Faktor der intestinalen Wundheilung. Einer Schädigung des Gewebes folgt eine Reparatur mit Entzündung, Gewebeneubildung und Narbenbildung (Postlethwaite et al., 1987). Die gerichtete Migration von mesenchymalen Zellen aus dem umliegenden unverletzten Gewebe in Bereich einer Gewebedestruktion oder eines Gewebedefektes ist ein essentieller Schritt im Wundheilungsprozess. Die Differenzierung und Aktivierung von mesenchymalen Zellen in Fibroblasten ist dabei ein wichtiger Faktor. Unter normalen Verhältnissen können die geschädigte Gewebestruktur und die Funktion wieder hergestellt werden. Der insuffiziente Heilungsprozess sowie die chronische oder immer wiederkehrende Entzündung der intestinalen Mukosa bei CED führt durch vermehrtes Kollagen und mesenchymale Zell-Anhäufung zu überschießender Wundheilung und oft zu Komplikationen wie ausgedehnter Darmfibrose, Stenosen- und Fistelbildung (Pucilowska et al., 2000).

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium von humanen CLPF die Migration von CLPF in der modifizierten Boyden Kammer induzieren kann, so wie es andere Gruppen zuvor schon mit humanen Hautfibroblasten zeigen konnten (Mensing et al., 1983; Albini et al., 1988; Heckmann et al., 1993). Das von den CLPF sezernierte Fibronectin konnte im konditionierten Medium als Migration induzierender Faktor ermittelt werden (Leeb et al., 2004). Bei Fibroblasten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen korrelierte das Migrationsverhalten mit der Fibronectinexpression. Durch Hemmung bzw. Stimulation der Zellmigration mit den Zytokinen IFN- γ und TNF bzw. dem Wachstumsfaktor TGF-1 β konnte eine jeweilig verminderte bzw. gesteigerte Fibronectinexpression erzielt werden (Brenmoehl et al., 2007). Durch TNF und IFN- γ lässt sich eine ähnliche dauerhaft reduzierte Migration bei CLPF von gesunden Patienten induzieren (Leeb et al., 2003).

Eine differenzierte Migration der CLPF konnte auch bei CED gezeigt werden. Intestinale Fibroblasten aus der Mukosa von Morbus Crohn-Patienten weisen ein im

Vergleich zu Kontroll-Myofibroblasten signifikant reduziertes Migrationsverhalten auf (Leeb et al., 2003). Es konnte noch gezeigt werden, dass CLPF, die aus Fisteln von Morbus Crohn-Patienten isoliert wurden, im Vergleich zu einfach entzündeten CLPF von Morbus Crohn-Patienten weniger und CLPF, die aus Stenosearealen isoliert wurden, mehr migrierten (Meier et al., 2003). Als Grund hierfür ist eine reduzierte Phosphorylierung der *Focal-Adhesion-Kinase* (FAK) anzusehen (Leeb et al., 2003).

2.2 Arbeitsziele

In den vorangegangenen Migrationsversuchen konnte ein Unterschied zwischen den Fibroblasten aus gesunden und Morbus Crohn-Darmabschnitten gezeigt werden. Diese Veränderung, sowie jene der vermehrten Proliferation, Kontraktilität und die gesteigerte Synthese von extrazellulären Matrix-Komponenten weisen auf eine zum Teil nicht reversible Differenzierung der Fibroblasten in einen krankheitsspezifischen Phänotyp hin. Prostaglandin E2 (PGE2) ist ein Gewebshormon, welches bei Entzündungen aus Arachidonsäure entsteht. PGE2 wird in erhöhten Konzentrationen sowohl bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen als auch in der intestinalen Mukosa von CED Patienten gefunden (Schmidt et al., 1996; Wiercinska-Drapalo et al., 1999). Somit stellte sich die Frage, welchen Effekt PGE2 auf die CLPF Migration hat.

- Mit Migrationsversuchen, mit der Hilfe der modifizierten 48-Well Boyden Kammer, sollten untersucht werden:
 1. die Migrationsinduktion durch Fibronectin in verschiedenen Konzentrationen bei Kontroll-CLPF
 2. das Migrationsverhalten von Kontroll-CLPF und Morbus Crohn Fibroblasten unter PGE2 Einfluss in verschiedenen Konzentrationen
 3. ob PGE2 eine Wirkung auf die chemotaktische und/oder chemokinetische Migration von Kontroll-CLPF zeigt
 4. die beteiligten Rezeptoren
 5. andere cAMP erhöhenden Substanzen: Forskolin, PDE-Hemmer.

- Mit ELISA sollte gemessen werden:
 1. die normale intrazelluläre cAMP-Konzentration von Kontroll-CLPF und nach einer Vorinkubation der Gleichen mit PGE2
 2. der spontane PGE2-Gehalt in Zellüberständen von den Kontroll-CLPF und nach Zellaktivierung durch vorherige Stimulation mit Entzündungsmediatoren.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Zellkultur

- | | |
|---|----------------------------|
| • Amphotericin B | Biochrom, Berlin |
| • <i>Bovine</i> Serum Albumin (BSA) | Biomol, Hamburg |
| • Ciprofloxacin, Ciprobay 200 | Bayer, Leverkusen |
| • Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| • DNase 1 | Boehringer, Mannheim |
| • <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) 4,5 g/l High Glucose | PAA Laboratories, Pasching |
| • Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| • Fetales Kälberserum (FCS) | PAN System, Aidenbach |
| • Gentamycin | PAA Laboratories, Pasching |
| • <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> ohne Ca ²⁺ and Mg ²⁺ | PAA Laboratories, Cölbe |
| • Hyaluronidase | Sigma – Aldrich, USA |
| • Kollagenase | Sigma – Aldrich, USA |
| • MEM – Vitaminen 100x | PAA Laboratories, Pasching |
| • Natriumpyruvat | PAA Laboratories, Pasching |
| • Nicht essentielle Aminosäuren | PAA Laboratories, Pasching |
| • Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium, Magnesium | PAA Laboratories, Pasching |
| • Penicillin/Steptomycin- Mischung | PAA Laboratories, Pasching |
| • Trypanblau | Biochrom, Berlin |
| • Trypsin ohne EDTA 10x | PAA Laboratories, Pasching |

3.1.2 Immunhistochemie

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| • Universal DAKO-APAAP-Kit | Dako Diagnostik GmbH, Hamburg |
| • <i>Bovine</i> Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| • Aceton | Merck, Darmstadt |
| • Glycerol | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |
| • Mayer´s Hematoxylin-Solution | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| • Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| • Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| • Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) | Merck, Darmstadt |

3.1.2.1 Antikörper

Für Charakterisierung von CLPF:

- | | |
|--|--------------------------------|
| • anti-Fibroblasten Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon AS02 | Dianova, Hamburg |
| • anti- α -Smooth Muscle Actin Antikörper (Maus anti-human; 1:25), Klon 1A4 | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |
| • anti-Vimentin Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon Vim 3B4 | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |
| • anti-Vinculin Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon V284 | Dianova, Hamburg |
| • anti-Myosin Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon SMMS-1 | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |
| • anti-Desmin Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon D33 | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |

Als T- und B-Zellmarker:

- | | |
|---|--------------------------------|
| • anti-CD3 Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon T3-4B5 | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |
| • anti-CD19 Antikörper (Maus anti-human 1:25), Klon HD37 | Dako Diagnostika GmbH, Hamburg |

Als Makrophagen und Leukozyten Marker:

- anti-CD68 Antikörper (Maus anti-human 1:1500), Klon KP1 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
- anti-CD45 Antikörper (Maus anti-human; 1:100), Klon HI30 Pharmingen, San Diego, CA

Als Epithelial-Zellmarker:

- Cytokeratin 18 Antikörper (Maus anti-human; unverdünnt), Klon DC19 Coulter-Immunotech, Krefeld

3.1.2.2 Isotypkontrolle

- Maus IgG1, κ (MOPC 21) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Maus IgG2a, κ (MOPC-141) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Maus IgG3, κ (FLOPC-21) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

3.1.3 Migrations-Assays in der modifizierten Boyden-Kammer

3.1.3.1 Zytokine, Gewebshormone, Phosphodiesterase-Inhibitoren

- Interleukin IL-1 β R&D Systems, USA
- Prostaglandin E2 Cayman Chemical, USA
- Pentoxyphyllin Sigma – Aldrich, USA
- Rolipram Sigma – Aldrich, USA

3.1.3.2 Extrazellulär-Matrix Protein

- Fibronectin Roche Applied Science, Penzberg

3.1.4 *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs)

3.1.4.1 Cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) - *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA)

- Salzsäure Merck, Darmstadt
- cAMP ELISA Kit Caymac Chemical Company, USA

3.1.5 Western Blot

3.1.5.1 Lysepuffer

- N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure] (HEPES) Merck, Darmstadt
- 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonium]-1-Propansulfonat (CHAPS) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Complete Tablets Proteinase Inhibitor Cocktail Boehringer, Mannheim
- Dithiothreitol (DTT) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Natriumvanadat (Na_3VO_4) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
- Saccharose Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

3.1.5.2 Proteinbestimmung

- BioRad-Protein-Assay Biorad, München

3.1.5.3 Größenstandart

- Rainbow markers Amersham Life Science, Braunschweig

3.1.5.4 Running- und Transfer-Puffer

- Running-Buffer 10x Invitrogen, Karlsruhe
- Transfer-Buffer 10x Invitrogen, Karlsruhe
- Methanol Merck, Darmstadt

3.1.5.5 Waschpuffer

- Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) Merck, Darmstadt
- Salzsäure Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid Merck, Darmstadt
- Tween 20 Merck, Darmstadt

3.1.5.6 Detektion

- Ponceau S Fluka, Buchs
- ECL-Plus Amersham Life Science,
Braunschweig

3.1.5.7 Antikörper

- anti-EP1, anti-EP2, anti-EP3, anti-EP4 Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Antikörper
- Anti-Aktin Antikörper (Maus anti-human) Santa Cruz Biotechnology,
Heidelberg

3.1.5.8 Stripping

- Re-Blot Plus, Western Blot Recycling Kit Chemicon International, Hofheim

3.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

- Cell Scraper Costar, Mexico
- Combitips plus (5 ml, 10 ml, 20 ml) Eppendorf, Hamburg
- Deckgläser 24x60 mm Laborcenter, Nürnberg
- Einmal-Pipetten, steril Costar, Cambridge/ USA
- Gel-Kassette Invitrogen, Karlsruhe
- Gel-Kämme Invitrogen, Karlsruhe
- Handschuhe Peha-Soft Hartmann, Heidenheim
- Hyperfilm ECL Amersham Life Science, Braunschweig
- Immersionsöl Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim
- Kanülen Becton-Dickinson, San Jose/USA
- Lab Tek Chamber Slides Nunc, Wiesbaden
- Multiwell (6-Well) Falcon, USA
- Mikrotiterplatten (96-Well) Caymac Chemical Company, USA
- Multipipette plus Eppendorf, Hamburg
- Objektträger 76x26 mm Laborcenter, Nürnberg
- Parafilm 4 IN.X 250 FT. Roll, Menasha
- Parafilm 2 IN.X 250 FT. Roll, USA
- Pasteurpipetten VWR, Darmstadt
- Pinzetten Labor Schubert & Weiß, Iphofen
- Petrischalen 100x20 Falcon, England
- Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) Costar Corning, USA
- Pipettenspitzen Sarstedt, Nürnberg
- Polycarbonatmembranen, 25x80 mm Gerbu Biotechnik, Gaiberg
(12 µm Poren)
- Memfil (12 µm Poren) Membra Pure, Bodenheim
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml) Eppendorf, Belgien
- Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml) Falcon, Heidelberg
- Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml) Beston-Dickinson, San Jose/USA

- Steriflip Vakuum-Filtereinheiten mit Auffanggefäß Millipore, Billerica USA
- Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm²) Costar Corning, England, USA

3.1.7 Geräte

- Analysewaage, *sartorius analytic A 120 S* Sartorius, Göttingen
- Autoklav Spa, Fedegari, Italien
- Biofuge, Fresco Heraeus, Osterode
- Brutschrank Haraeus, Nürnberg
- Digitale Bildverarbeitungsanlage Visitron System, München
- Eismaschine Ziegra, Isernhagen
- ELISA- *Reader* MWG Biotech, Denkendorf
- Entwickler AGFA, München
- Filmkassette Olympus, Stuttgart
- Laborwaage Sartorius, Göttingen
- Magnetrührer Heidolph, Kehlheim
- Microcentrifuge National Labnet Company, USA
- Mikroskop Olympus, Freiburg
- Mikroskop Leica, Bensheim
- Millipore Wasserfiltrationsanlage Millipore, Eschhorn
- *Modified Boyden Chamber* Receptor Technologies Ltd., Adderbury/GB
- Neubauer Zählkammer *Improved* Blaubrand, Wertheim
- *Pipetboy acu* IBS Integra Biosciences, Fernwald
- Pipetten Eppendorf, Hamburg
- Reagenzglas-Rotator Heidolph, Kehlheim
- Schüttelgerät Burgwedel Scientific Industries Bohemia, USA
- Sonorex Ultraschallbad Bandelin, Berlin
- Sterilbank, *Lamin Air* Heraeus, Hanau
- Tischzentrifuge 5415 C Eppendorf, Hamburg

- Vortex - Mixer Heidolph, Kehlheim
- Wasserbad, Liquitherm FV Labora Mannheim, Mannheim
- Xcell II Blot Module Invitrogen, Karlsruhe
- Zentrifuge, Megafuge 1,0 R Heraeus, Nürnberg

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation und Kultur von primären humanen intestinalen Fibroblasten

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden mit primären intestinalen Fibroblasten der Lamina propria des Colons durchgeführt. Es wurden Fibroblastenkulturen aus dem intestinalen Mukosa von Kontrollpatienten isoliert. Für einige Kontrollversuche wurden Fibroblastenkulturen von Morbus Crohn–Patienten aus entzündetem Darm, bei denen Stenosen und Fisteln auftraten, verwendet. Die Zellen wurden aus endoskopischen Biopsien oder chirurgischen Resektaten von gesunden Patienten bei Routineendoskopien oder Entfernung eines colorektalen Karzinoms, bzw. von Patienten mit Morbus Crohn, hier aus gesunden und entzündeten Arealen der Colonschleimhaut, gewonnen. Die Patientengeschichte und die Medikation sowie eine Evaluation der Biopsien wurden durch einen erfahrenen Pathologen aufgezeichnet.

Die Isolation der CLPF erfolgte aus zerkleinerten Mukosastreifen oder direkt aus Biopsaten über einen Kollagenaseverdau: mindestens 6 Mukosastücke (je ca. 1 mm² groß) wurden in 10 ml Hank´s Solution mit 40 µl 0,5 M EDTA 20 Minuten lang bei 37°C geschüttelt. Der Überstand von abgelösten Epithelzellen wurde verworfen. Anschließend wurden je 3 Biopsien in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem 700 µl PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺, 250 µl Kollagenase I (4 mg/ml), 30 µl DNase (10 mg/ml) und 20 µl Hyaluronidase (100 mg/ml) vorgelegt waren. Nach 30-minütigem Schütteln bei 37°C wurde der Überstand verworfen und der Kollagenaseverdau durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Durch wiederholtes Zentrifugieren (Biofuge pico, 5 min mit 3500 rpm bei RT) und Resuspension wurden die isolierten Zellen mit Medium gewaschen. Zum Schluss wurden sie in steriles Medium in eine sterile 25 cm² Flasche überführt. Nichtadhärente Zellen wurden beim Waschen entfernt und die verbleibende Kultur mittels Immunocytochemie charakterisiert.

Wenn die Fibroblasten konfluent gewachsen waren, wurden sie mittels Trypsin (0,5% Trypsin in PBS) abgelöst. Nach Sedimentation durch Zentrifugation (Magafuge, 1200 rpm, 5 min, RT) wurden die Fibroblasten in Petrischalen (100x200 mm) in einem Inkubator mit 10%iger CO₂-Atmosphäre und 37°C Temperatur weiterkultiviert. Die Zellen wurden im Abstand von 3-4 Tagen mit neuem Zellkulturmedium versorgt. Sobald die Zellen dicht genug gewachsen waren, wurden sie mit einer 0,5%iger Trypsinlösung (ohne EDTA) bei 37°C ca. 10-15 min lang in den Brutschrank gelegt und danach durch leichtes Klopfen und durch Zugabe von Zellkulturmedium vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Megafuge, 1200 rpm, 10 min, RT) sedimentiert, mit Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 in neue sterile 75 cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Fibroblasten wurden ab der 3. bis zur 10. Passage für die nachfolgenden Versuche verwendet.

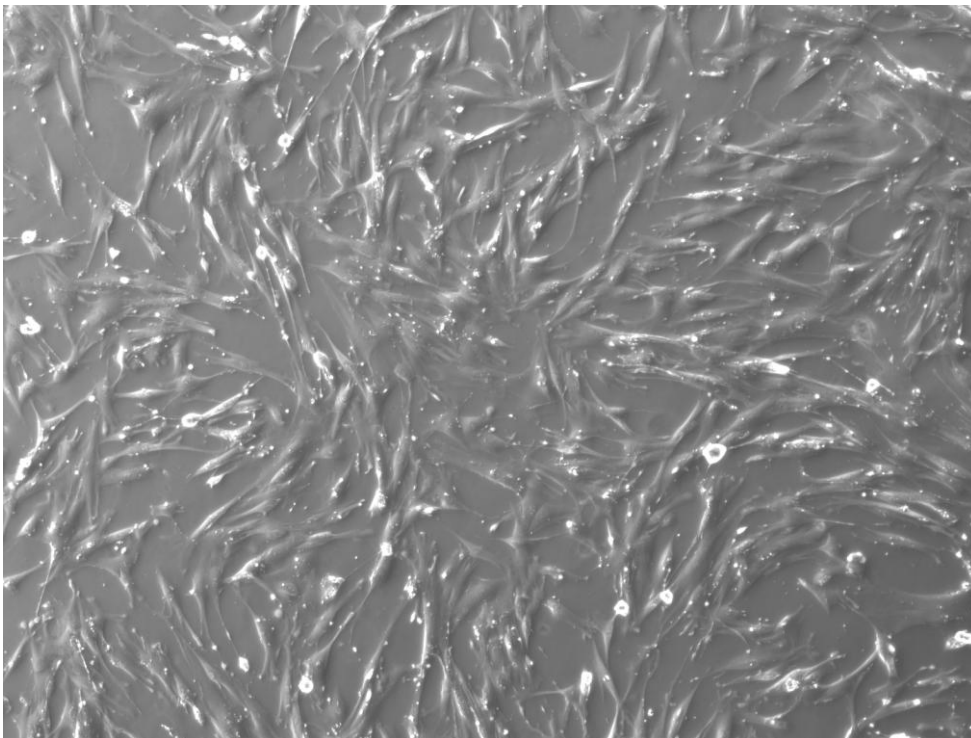


Abbildung 3.1

Konfluente primäre intestinale Fibroblasten unter Mikroskop Olympus, 20-fache Vergrößerung

Zusammensetzung des verwendeten Fibroblastenmediums:

- 500 ml *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* (DMEM), *high glucose* 4,5 g/ml
- 50 ml Fetales Kälberserum (FCS)
- 5 ml Vitamine (MEM-Vitamine), 100x
- 5 ml Nicht essentielle Aminosäuren (NEA), 1%
- 5 ml Natriumpyruvat, 100 mM
- 5 ml Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep), 10 mg/ml
- 2 ml Ciprofloxacin (Cyprobay), 2 mg/ml
- 0,5 ml Gentamycin, 50 mg/ml
- 0,5 ml Amphotericin B, 1 mg/ml

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mittels modifizierter Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Neubauer-Zählkammer ist eine ca. 3 cm x 8 cm große und ca. 5 mm dicke Glasplatte mit eingezätzten, quadratischen Feldern (Abbildung 3.2). Die genaue Höhe der Kammer, 0,1 mm, wird durch ein plangeschliffenes, geeichtes Glasdeckplättchen festgelegt, welches auf zwei eingeschliffenen Glasstegen auf der Zählkammer liegt. In der Mitte zwischen den beiden Stegen befinden sich zwei getrennte Zählfelder mit dem Liniennetz.

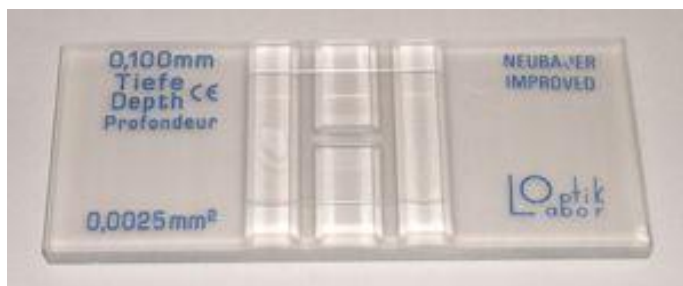


Abbildung 3.2

Neubauer improved-Zählkammer mit aufgelegtem Deckglas

Das Zählgitter besteht aus 3x3 Großquadraten von je 1mm Kantenlänge und somit einer Fläche von je 1 mm². Das Zentrum des kreuzförmig verstärkten Glasgraveurs ist das Thoma-Netz (Abbildung 3.3). Das zentrale Großquadrat ist bei der *Neubauer improved*-Zählkammer wiederum in 5x5 kleinere Gruppenquadrate mit je 0,2 mm Kantenlänge unterteilt. Die Fläche eines solchen Gruppenquadrats ist damit 0,04 mm². Die Zellen wurden in den vier sich diagonal gegenüberliegenden, nicht vom Thoma-Netz durchgezogenen Großquadraten, gezählt.

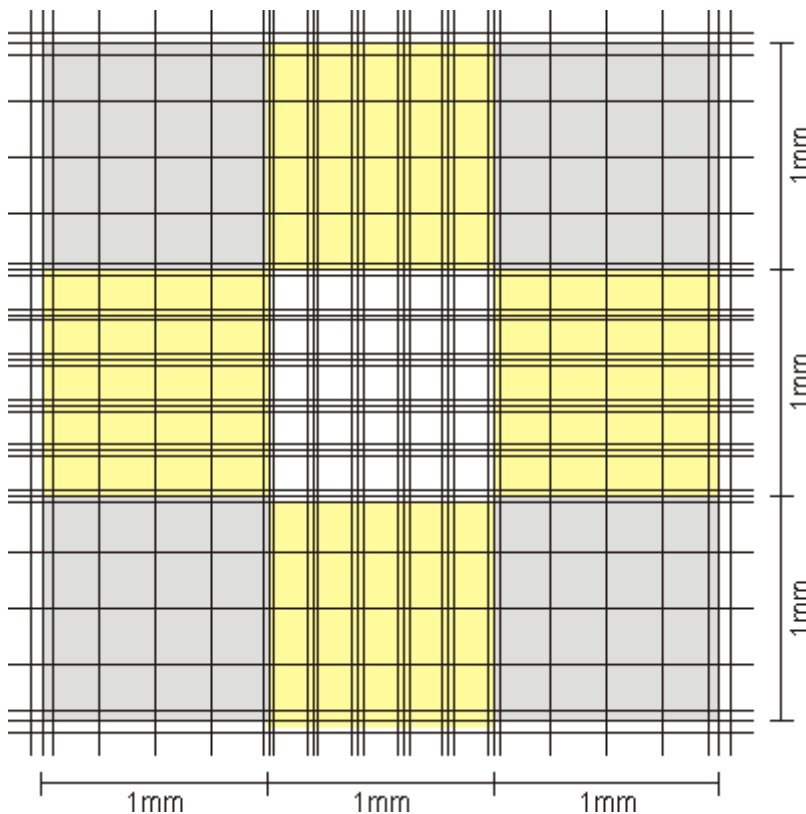


Abbildung 3.3

Aufbau des Zählfeldes bei der *Neubauer improved* – Zählkammer (Laborwissen, <http://www.mta-labor.info>)

Die auszuzählende Zellsuspension, 1:1 Trypanblau und Zellen, wurde bei aufgelegtem Deckgläschen seitlich aufpipettiert und saugt sich durch die Kapillarkraft in die Kammer. Die eigentliche Auszählung erfolgt dann unter dem Lichtmikroskop.

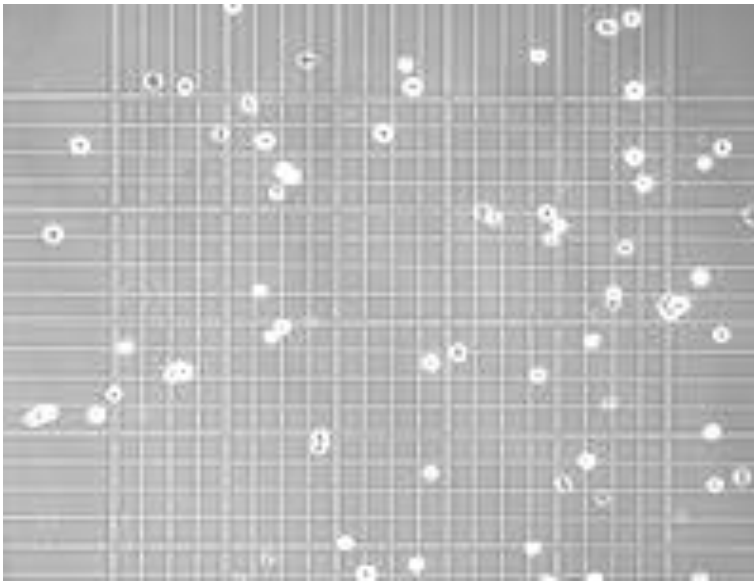


Abbildung 3.4

Zellen unter Lichtmikroskop, 40-fache Vergrößerung

Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich nach der folgenden Formel:

Gezählte Zellen		Zellen
Anzahl der ausgezählten Großquadrate	x Verdünnungsstufe x 10 ⁴ =	ml

3.2.2.2 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Einfriermedium verwendet. Der Unterschied zum üblicherweise zur Kultur der Zellen verwendeten Medium ist, dass das Einfriermedium einen FCS-Gehalt von 20% und einen DMSO- Gehalt von 10% enthält. Die Zellen wurden abtrypsiniert und zentrifugiert (Megafuge 1200 rpm, 5 min, RT). Schließlich wurden sie gezählt und mit Einfriermedium resuspendiert, ungefähr 1x10⁶ Zellen/ml. Die Zellsuspension wurde in die Einfrierröhrchen gefüllt, danach sofort in eine spezielle Einfrierbox gestellt und bei -80°C eingefroren.

In dieser Spezialbox senkte sich die Innentemperatur um 1°C pro Minute.

Für die Langzeitlagerung wurden die Einfrierröhrchen in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C aufbewahrt.

3.2.2.3 Auftauen der Zellen

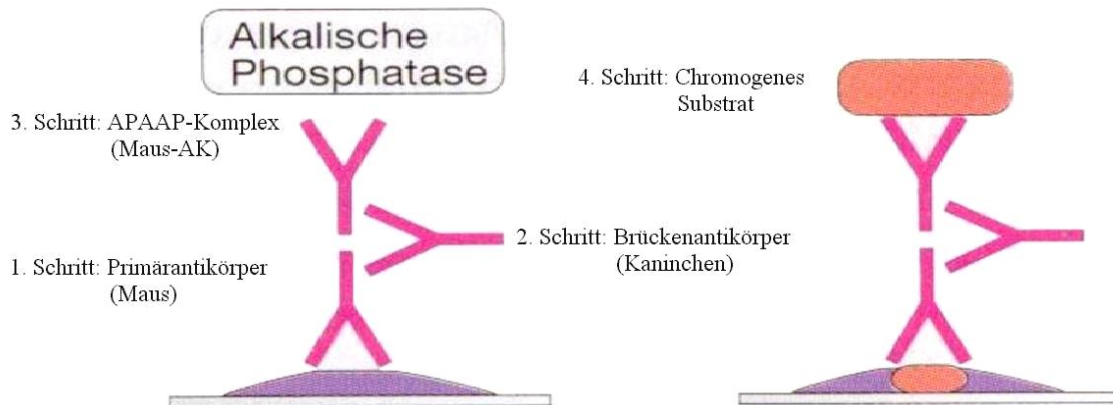
Das eingefrorene Röhrchen wurde zum Auftauen kurzzeitig im Wasserbad bei 37°C gelegt. Schließlich wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß, mit vorgelegtem, erwärmtem 9 ml Medium überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (Megafuge 1200 rpm, 5 min, RT). Das bei Raumtemperatur für die Zellen toxisch wirkende DMSO wurde abgesaugt. Die Zellen wurden im frisch vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine sterile 25 cm² Kulturflasche überführt.

3.2.3 Charakterisierung von humanen intestinalen Fibroblasten

In Vorarbeiten wurden die primären intestinalen Fibroblasten von der Lamina propria des Colons nach der Isolation mittels Immunocytochemie untersucht, und somit nachgewiesen, dass es sich wirklich um diesen Zelltyp handelt. Für diese immunocytochemische Charakterisierung von CLPF wurden 20.000 Zellen auf das LabTek Chamber Slide System (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Die Zellen wurden mit eiskaltem Azeton fixiert. Alle immunocytochemischen Färbungen wurden gemäß dem APAAP Protokoll des Herstellers (Dako, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die folgenden Antikörper wurden für die Charakterisierung von CLPF verwendet: Anti-Fibroblast-Antikörper ASO2 (1:100; Dianova, Hamburg, Deutschland), anti- α -smooth-muscle Actin (1:25; Klon 1A4; Dako, Hamburg, Deutschland), anti-vimentin (1:100; Klon 3B4; Dako), anti-vinculin (1:100; Klon V284; Dako), anti-myosin (1:100; Klon SMMS-1; Dako), und anti-desmin (1:100; Klon D33; Dako). Als Isotyp Kontrollen wurden IgG1 (MOPC 21; Sigma), IgG2a (MOPC-141; Sigma) und IgG3 (FLOPC-21; Sigma) verwendet.

Hier zeigten die Ergebnisse eine positive homogene Markierung mit anti-Fibroblasten-Antikörper, die ein Fibroblasten-Phänotyp der isolierten Darmzellen bestätigt.

Nach Anwendung der APAAP-Methode (Abbildung 3.5) von IgG1, IgG2 und IgG3 zeigten die Zellen keine Markierung, damit konnte eine unspezifische Markierung durch den Isotyp der verwendeten Antikörper ausgeschlossen werden.

**Abbildung 3.5**

Schematische Darstellung der APAAP-Reaktion. Bei der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-(APAAP)-Technik wird ein löslicher Immunkomplex verwendet, der aus alkalischer Phosphatase des Kälberdarms und einem gegen diese gerichteten monoklonalen Antikörper aus der Maus besteht. Die APAAP-Enzymreaktion wird mit den Chromogenen Fast Red TR-Chromogen und Naphtholsubstrat durchgeführt, sie färben das Antigen leuchtend rot an. (Universal DAKO-APAAP-Kit-Gebrauchsanleitung) (In Anlehnung an: Burmester und Pezzutto, 1998, S.77)

Bei den untersuchten Fibroblasten-Kulturen konnten nach der dritten Passage keine anderen adhärennten Zell-Populationen gefunden werden. Somit konnte eine Verunreinigung durch Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen oder Epithelzellen ausgeschlossen werden. Alle Experimente mit CLPF wurden nach der dritten Passage der Zellen durchgeführt, um Fehlergebnisse durch Verunreinigung zu vermeiden.

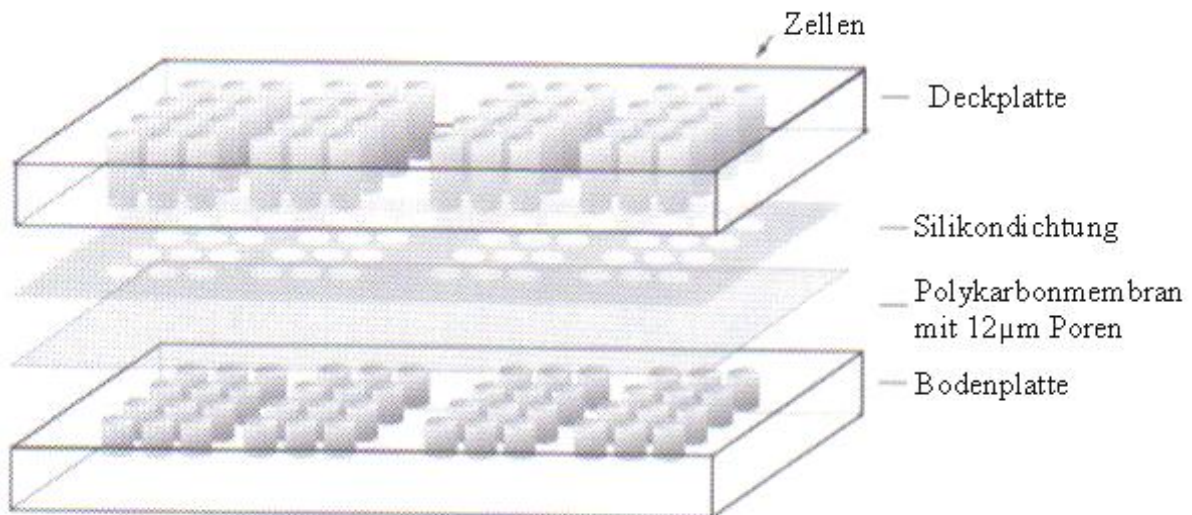
3.2.4 Migrations-Assay mit der modifizierten 48-Well-Boyden Kammer

3.2.4.1 Prinzip des Migrations-Assay

Mit dem Versuch sollte der Einfluss von Fibronectin, Prostaglandin E₂, Phosphodiesterasehemmern (Rolipram und Pentoxifyllin), EP-Rezeptoren und Forskolin auf das Migrationverhalten von den intestinalen Fibroblasten untersucht werden. Um die Zellmigration genauer nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit die modifizierte 48-Well-Boyden-Kammer verwendet. Im Vergleich zu der herkömmlichen 1-Well-Boyden-Kammer, hat die modifizierte 48-Well-Boyden-Kammer den Vorteil, dass weniger Zellen und geringere Volumen von Migrations-induzierenden Substanzen eingesetzt werden können und dass 48 Bestimmungen bei gleichen Versuchsbedingungen nebeneinander möglich sind. Die Methode basiert auf der Fähigkeit von Zellen, aktiv durch Filterporen einer bestimmten Größe zu wandern. Durch Inkubation mit Botenstoffen, die sich in der äußeren oder inneren Kammer befinden, migrieren die Zellen durch die Poren der inneren Kammer hindurch und bleiben an der Unterseite haften. Nach dem Entfernen der nicht migrierten Zellen von der Innenseite der Kammer und dem Fixieren der an der Unterseite haftenden Zellen kann die Anzahl der durch den Filter migrierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt werden.

3.2.4.2 Arbeitsschritte mit der modifizierten Boyden-Kammer

Alle Bestandteile der modifizierten 48-Well-Boyden-Kammer, die 2 Platten (Boden- und Deckplatten), die Silikondichtung und die Polycarbonatmembran, müssen sauber und trocken sein.

**Abbildung 3.6**

Bestandteile der modifizierten 48-Well-Boyden-Kammer (Guan Jun-Lin, 2005)

In der Bodenplatte der modifizierten Boyden-Kammer wurden pro *Well* 30,6µl Test-Substanz luftblasenfrei einpipettiert. Test-Substanz waren: Fibronectin, PGE₂, Forskolin, Phosphodiesterase-Inhibitoren, ER-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten, Medium ohne FCS. Jede Einzelsubstanz und Konzentration wurden jeweils in 4 *Wells* einpipettiert, um die Genauigkeit des *Assays* zu erhöhen (Abbildung 3.7).

Nachdem die unteren *Wells* gefüllt war, wurde vorsichtig die Polykarbonmembran mit 12 µm Porengröße auf die Platte aufgelegt (Abbildung 3.8). Danach wurde die Deckplatte mit Silikondichtung aufgesetzt und unter steigendem Druck festgeschraubt.

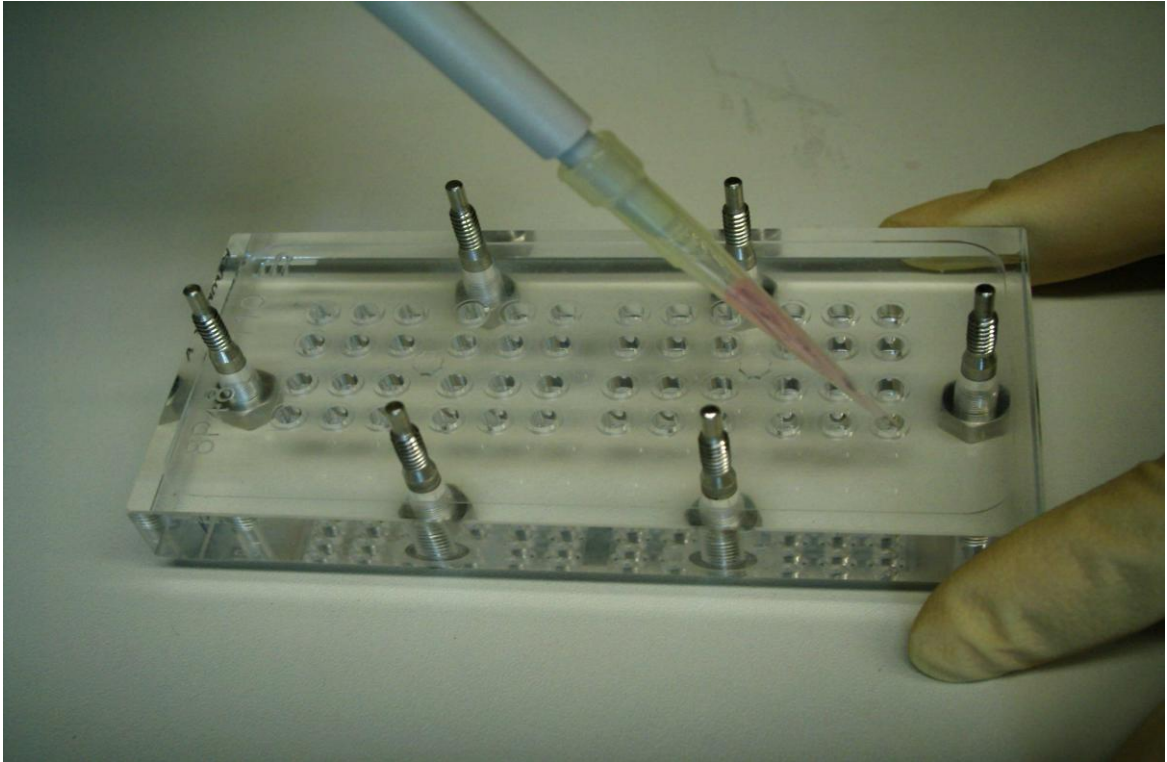


Abbildung 3.7

Pipettieren von 30,6 μ l Test-Substanz pro *Well* in der Bodenplatte der modifizierten Boyden-Kammer

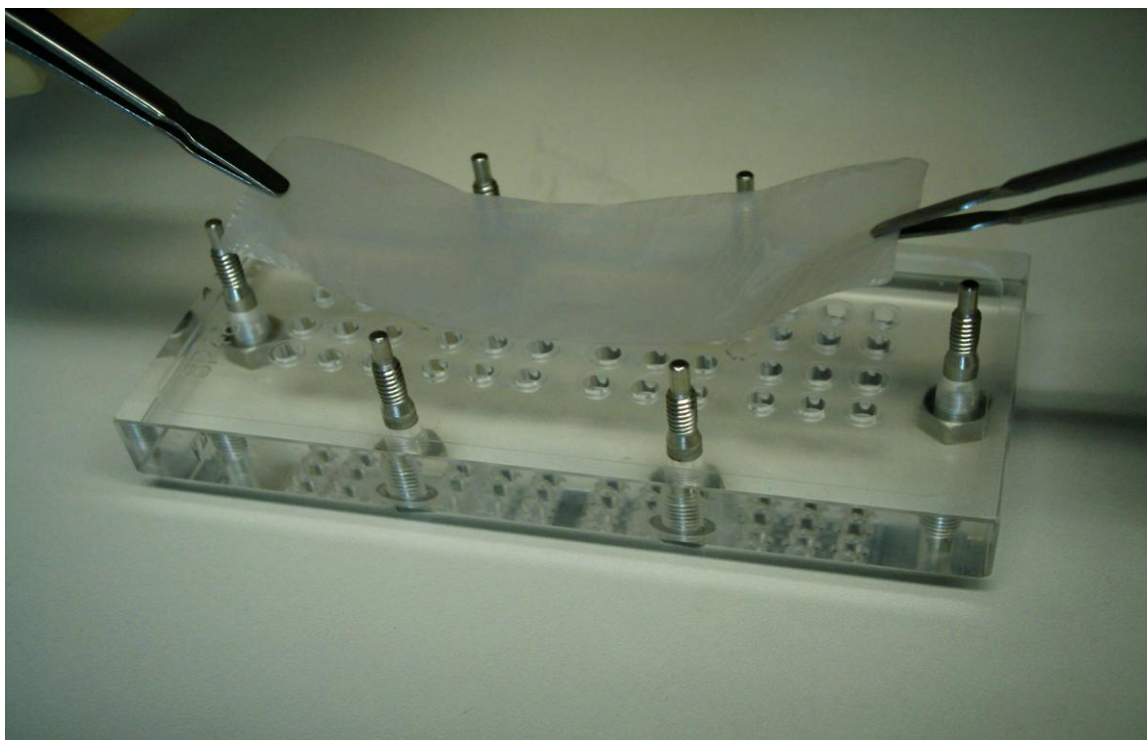


Abbildung 3.8

Auflegen der Polykarbonmembran

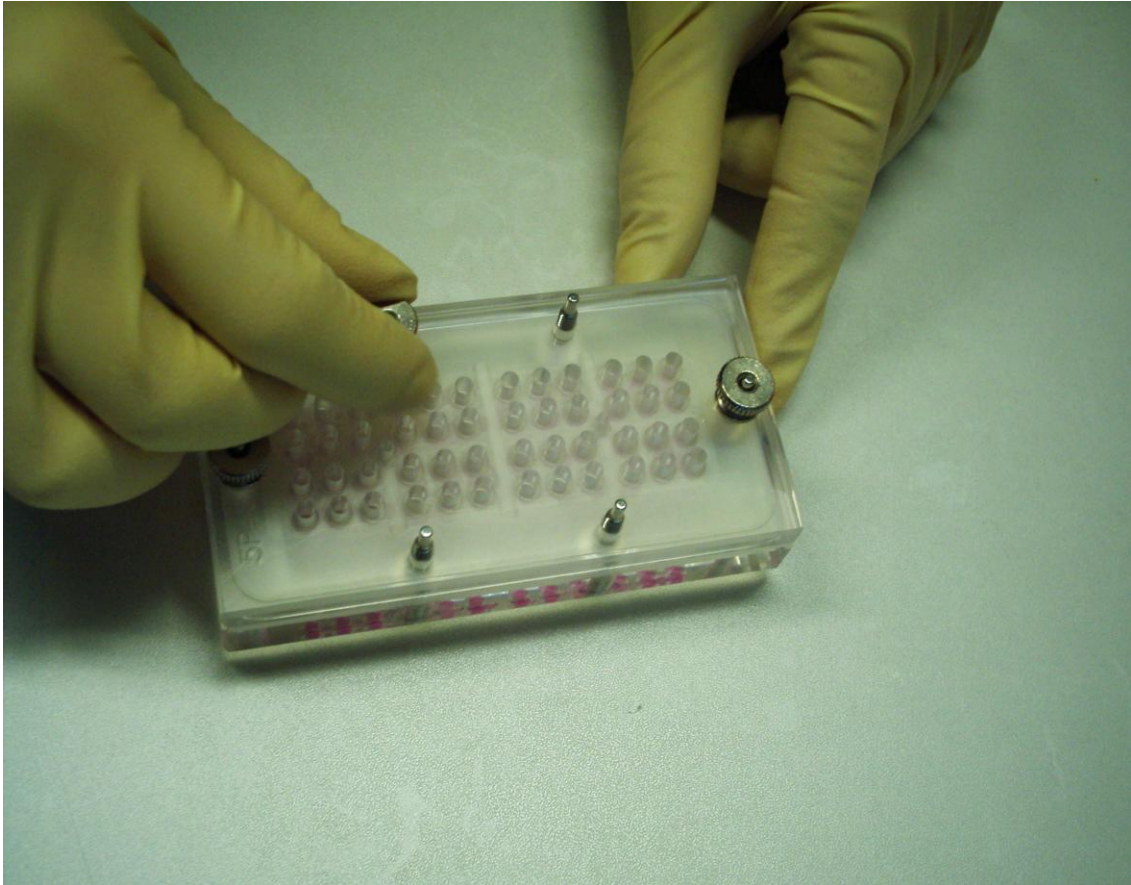


Abbildung 3.9

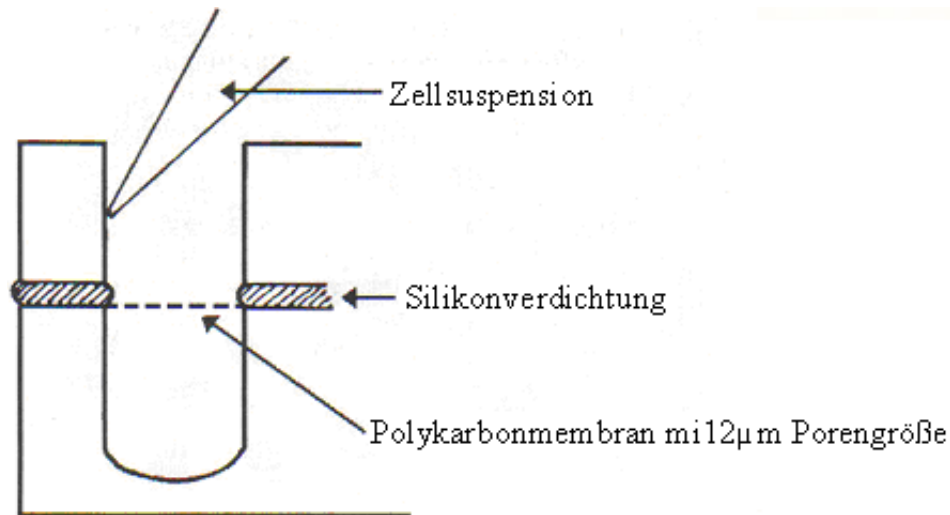
Die Deckplatte mitsamt Silikondichtung wurde aufgesetzt und festgeschraubt

Durch die Membran zwischen den beiden Platten entstanden zwei Kompartimenten. Die Kammer wurde für 30-60 Minuten in den Brutschrank (10% CO₂, 37°C) gestellt. Dadurch wurde in dem pipetierten Medium der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Danach wurden die CLPF von vier konfluenten 75 cm² Kulturflaschen abtrypsiniert und gezählt (Neubauer-Zählkammer). Die Zellen wurden mit der entsprechenden Menge an 1% BSA Medium ohne FCS, 20.000 Fibroblasten pro 50 µl Medium, aufgenommen und gut resuspendiert. Schließlich wurden in das obere Kompartiment 50 µl pro *Well* Zell-Suspension luftblasenfrei einpipettiert (Abbildung 3.10). Die fertige Kammer wurde für 6 h in den Brutschrank (10% CO₂, 37°C) gestellt.



Abbildung 3.10

Pipettieren von 50 μ l Zellsuspension, in der Deckplatte

**Abbildung 3.11**

Schematische Darstellung der Pipettenhaltung beim Auffüllen des oberen Kompartiments

Danach wurde die Kammer aus dem Brutschrank genommen und geöffnet. Die Membran wurde mit zwei Klemmen an den Enden fixiert. Die obere Seite der Membran, auf der sich die einpipettierte, nicht migrierte Zellen befanden, wurde mit PBS gewaschen und mit einem Gummiwischer je zwei Mal abgezogen. Dieser Vorgang drei Mal wiederholt. So befanden sich zum Schluss nur noch die migrierte Zellen auf der gegenüberliegenden Seite der Membran.

3.2.4.3 Färben der migrierten Zellen auf der Membran

Die Membran wurde mit Hemacolor-Schnellfärbe-Kit gefärbt. Das Hemacolor-Schnellfärbe-Kit besteht aus drei Lösungen. Jeweils 40 ml von den drei Lösungen wurden in drei 50-ml Reaktionsgefäße gefüllt. Das vierte Reaktionsgefäß enthielt nur PBS.

In dem ersten Reaktionsgefäß befand sich die Lösung 1 – Methanol. Durch Methanol wurden die Zellen auf der Membran fixiert. Die zweite ist eine Färbelösung nach

Giemsa. Sie enthält Azur(II)-Eosin und Azur II als saure Farbstoffe, Glycerin als Stabilisator und Methanol als Lösungsmittel. Die in den Zellen enthaltenen basischen Proteine sind azidophil und bilden mit dem sauren Farbstoff eine stabile Verbindung mit charakteristischer Färbung.

Die dritte Lösung ist eine Farblösung nach „May-Grünwald“. Sie besteht aus eosinsaurem Methylenblau als basischem Farbstoff und Glycerin gelöst in Methanol als Stabilisator. Die Zellen enthalten viele saure Bestandteile, die negativ geladen sind, wie z.B. im Kern - die DNA (Desoxyribonukleinsäure) oder in Nucleoli und im Cytoplasma – die RNA (Ribonukleinsäure). Diese basophilen Bestandteile färben sich in wässriger Lösung zusammen mit dem basischen Farbstoff, der eine positive elektrische Ladung besitzt, blau.

Die Membran wurde nach ein paar Minuten Antrocknen für eine Minute in die Fixierlösung getaucht. Dann wurde sie nach einer Minute Abtropfen in die Färbelösung zwei getaucht. So wurde die Membran bis zum vierten Reaktionsgefäß behandelt. Danach wurde sie mit PBS gewaschen und Trocknen gelassen. Schließlich wurde die Membran auf einen Objektträger mit Immersionsöl fixiert (Abbildung 3.12). Am nächsten Tag wurden die fixierten und gefärbten Zellen unter einem Durchlicht-Mikroskop gezählt. Es wurden von jedem *Well* bei 400-facher Vergrößerung jeweils vier zufällig gewählte mikroskopische Felder gezählt und der Mittelwert ausgerechnet.

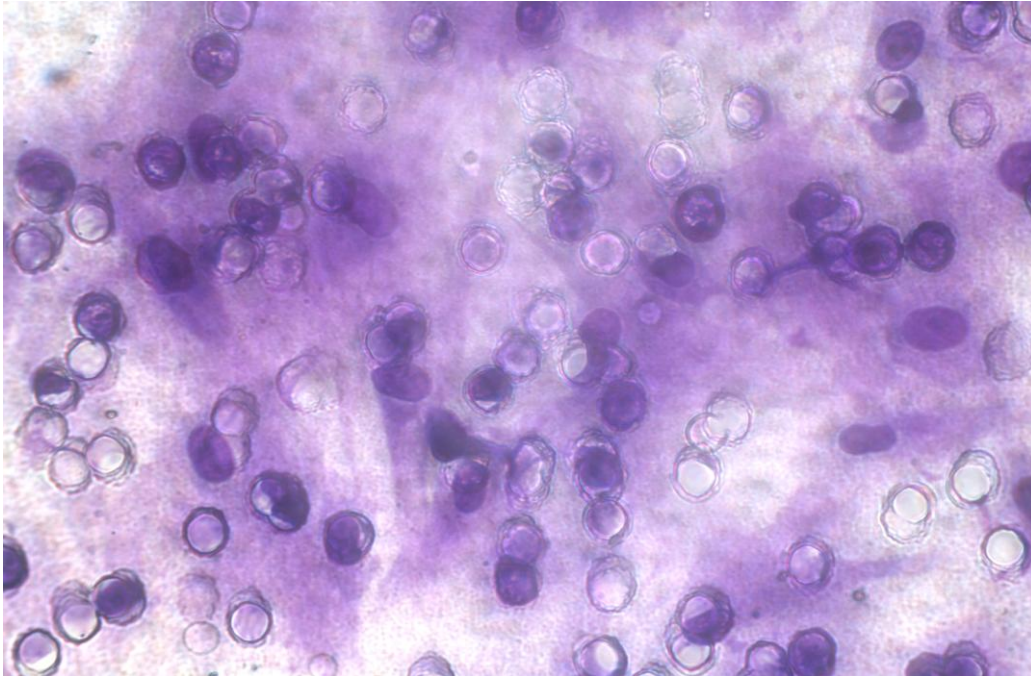


Abbildung 3.12

Gefärbte Fibroblasten bei 400-facher Vergrößerung in einem zufällig gewählten mikroskopischen Feld

3.2.5 Nachweis von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.2.5.1 Prinzip der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, ist ein immunologisches Nachweisverfahren (*Assay*), und basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Mittels cAMP ELISA Kit wurde das intrazelluläre cAMP von CLPF mit dem kommerziell erhältlichen Testsystem der Firma *Cayman Chemical* nach Vorschriften des Herstellers bestimmt. Hierbei wird eine 96-Well-Mikrotiterplatte, vorbeschichtet mit spezifischen Antikörpern, verwendet. Das jeweils gesuchte Antigen wird von diesen Antikörpern gebunden und über einen Detektionskomplex nachgewiesen. Das Enzym in diesem Komplex setzt ein Substrat um und es kommt zu einer gelben Farbreaktion mit

darauflfolgender Absorbtiionsänderung. Diese Absorbtiionsänderung wird im ELISA-Reader bei 412 nm gemessen und ist direkt proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens im Zelllysats. Die Intensität dieser Farbe ist, spektralphotometrisch festgestellt, direkt proportional zu dem Wert von gebundenem cAMP (Tracer) und indirekt proportional zu dem Wert von freiem cAMP während der Inkubation.

3.2.5.2 Stimulation von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) und anschließende Lyse der Zellen

Die Kontrollfibroblasten wurden in 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, um Reste des FCS-haltigen Mediums zu entfernen. Danach wurde ein Teil von den Zellen mit Fibroblastenmedium ohne FCS alleine und der andere Teil mit sehr niedriger Konzentration von PGE₂, Forskolin, EP-Rezeptor-Agonisten (Butaprost, Sulprostone, ONO-AE1-329) oder Phosphodiesterase-Inhibitoren mit oder ohne EP-Rezeptor-Antagonisten, jeweils 1 ml für eine Stunde prä- bzw. für 15 min inkubiert (eine Präinkubation für 1 h erfolgte nur bei den Blockadeexperimenten mit EP-Blockern). Nach wiederholtem Waschen mit PBS, wurden die Fibroblasten für 15 min mit oben genannten Substanzen in verschiedenen hohen Konzentrationen stimuliert. Schließlich wurden die Fibroblasten für 20 min in 1 ml 0,1 M HCl belassen. Die Zellen wurden dann mit dem *Cellscrapper* von der Plattenoberfläche gelöst und mit dem Pipette ab und auf pipetiert bis zur Entstehung einer homogenen Suspension. Diese Suspension wurde abgenommen und zentrifugiert (1000 rpm, 10 min) um Zellreste zu entfernen und die Überstände wurden in Aliquots von 100 µl, 200 µl und 300 µl bei -20°C eingefroren.

3.2.5.3 Quantitative Bestimmung des zellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) - Gehalts

Die eingefrorenen Überständen wurden 2 h lang zum Auftauen auf Eis belassen. Danach wurden sie mit EIA Puffer (im Kit erhalten) 1:10 verdünnt und in eine mit Maus-Anti-cAMP-Antikörper beschichtete 96-Well-Platte (im Kit erhalten) pipetiert.

Danach wurden cAMP Antiserum und mit cAMP konjugierte Acetylcholinesterase (AChE) zugegeben. Die fertigpipettierte Platte wurde mit Plastikfolie zugeklebt und für 18 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die 96-Well-Platte 5 x mit Wasch-Puffer (im Kit erhalten) gewaschen und Ellman`s Reagenz als Substrat für die AChE zugegeben. Nach ca. 90 min wurde mit Hilfe von ELISA-Reader die Absorption, der in den Wells erhaltenen Lösungen bei 412 nm und der Leerwert, die totale AChE-Aktivität und nicht die spezifische Bindung bestimmt. Die cAMP-Konzentration der Proben wurde nach Subtraktion der nicht spezifischen Bindung, mit der Hilfe der cAMP-Standards erstellten Eichkurve, errechnet. Die Abbildung 3.13 zeigt den schematischen Ablauf der cAMP-Messung.

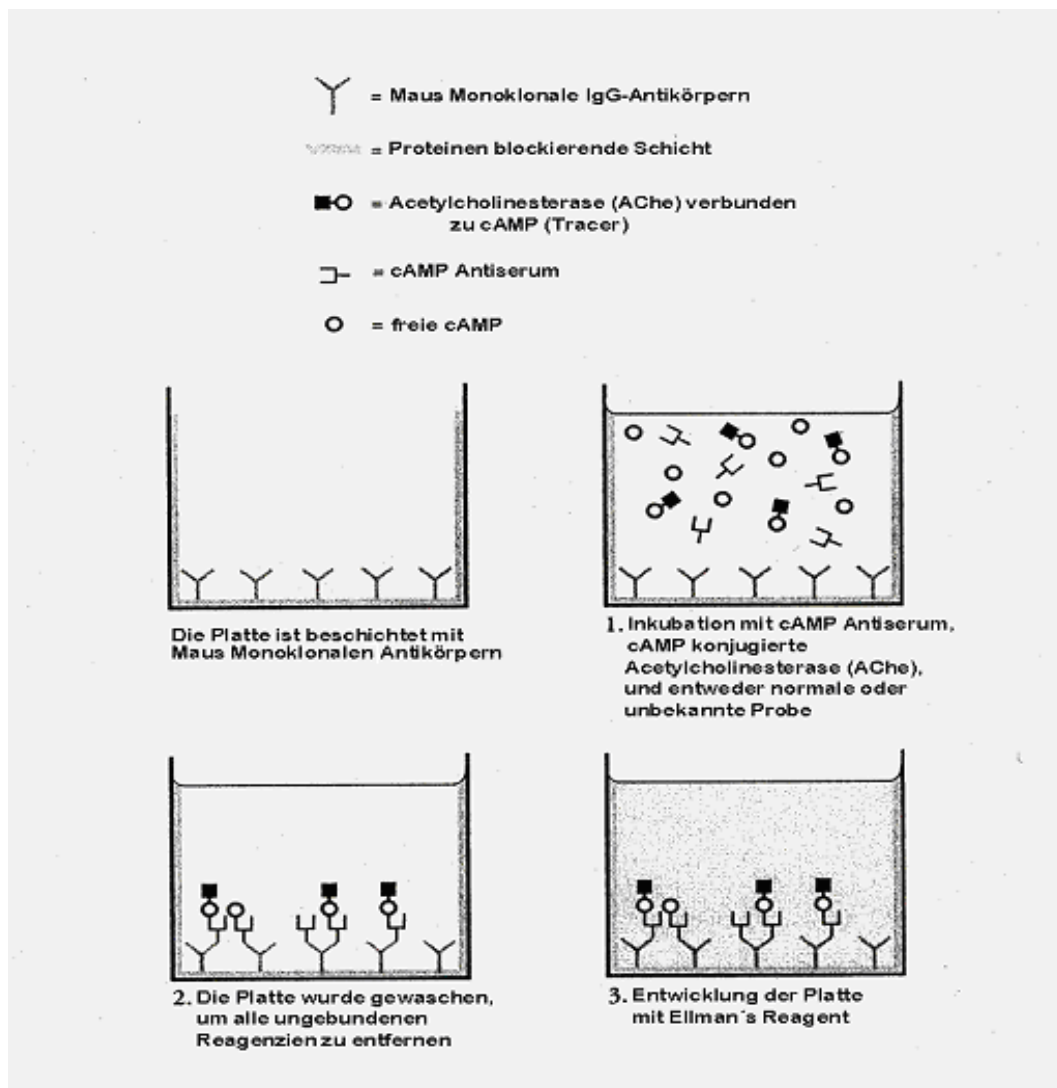


Abbildung 3.13

Schematische Ablauf der cAMP Bestimmung (Cyclic AMP EIA Kit, Cayman, Seite 8)

3.2.6 Nachweis von Prostaglandin E2 (PGE 2) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Der ELISA zur Detektion von PGE2 basiert auf dem Grundprinzip der kompetitiven Hemmung. Mittels PGE2 ELISA Kit wurde die PGE2 Konzentration in Überständen von CLPF nach Vorschriften des Herstellers (*Cayman Chemical*) bestimmt.

3.2.7 Western Blotting

Western Blot auch Immunblot genannt, bezeichnet die Übertragung (engl. *Blotting*) von Proteinen, die anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können, auf eine Trägermembran. Vor dem eigentlichen Western Blot werden die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer porösen Trägermatrix (SDS-PAGE), entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderer Eigenschaften aufgetrennt. Proteine sind aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle, die aufgrund unterschiedlicher Anteilen an positiv (wie Lysin oder Arginin) und negativ (wie Asparginsäure oder Glutaminsäure) geladenen Aminosäureresten elektrophoretische Eigenschaften aufweisen.

Die Proteine werden zuerst mit einem Polyacrylamid-Gel in Proteinbanden aufgetrennt. Ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld ermöglicht die Wanderung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran. An der Membranoberfläche bleiben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten – die Proteine sind nun aber für Antikörper-Bindung zugänglich. Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen werden. Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Spezifische Antikörper (monoklonal oder polyklonal) binden sich an die passenden Proteinbande auf der Membran. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschritten mit Puffern, die Detergentien enthalten, wieder entfernt.

3.2.7.1 Lyse der Fibroblasten

Die Fibroblasten in der Zellkulturflasche wurden auf Eis gelagert und mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 500 µl Lyse-Puffer pro 75 cm² für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit einem *Cellscraper* abgelöst und durch kräftiges Auf- und Abpipettieren wurde eine homogene Suspension erreicht. Zuletzt wurden die aufgeschlossenen Zellen für 10 min bei 13000 Umdrehungen/min und -4°C zentrifugiert, die Überstände in ein 1,5 ml-Plastikgefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Das Lysat wurde dann für Western blot verwendet. Folgende Zusammensetzung für 10 ml Lyse-Puffer wurde verwendet:

HEPES 10 mM

Saccharose 1%

CHAPS 0,01%

PMSF 1 mM

DTT 0,1 mM

Natriumorthovanadat 1 mM

Complete proteinase inhibitor cocktail 1 Stück

(enthält einen Mix aus Proteinaseinhibitoren)

Die Proteinkonzentration von Zell-Lysaten wurde mittels *Bio-Rad protein assay* (Biorad) ermittelt. Der Assay basiert auf der Methode nach Bradford (photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen bis zu Konzentration im Bereich Mikrogramm pro Milliliter) (Bradford MM, 1976). *Bio-Rad protein assay* wurde nach den Vorschriften des Herstellers (Biorad) durchgeführt.

3.2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, modifiziert nach Laemmli (Laemmli U.K., 1970), ist eine diskontinuierliche Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Die Diskontinuität bezieht sich auf die Gelstruktur, den pH-Wert und die Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern. Im Gel ist ein großporiges Sammelgel einem engporigen Trenngel aufgelagert. Das Gel wurde in eine Kammer

eingesetzt und mit 1x *Runningbuffer*, zusammengesetzt aus 950 ml dest. Wasser und 10x *Runningbuffer* (Invitrogen), gefüllt. In die Taschen wurde jeweils 15-50 µM Proteine pipettiert (Abbildung 3.14).

Der Elektronenpuffer enthält Tris-Glycin (pH-Wert 8,8), Proben und Sammelpuffer enthalten Tris-HCl (pH-Wert 6,8) und der Trenngelpuffer Tris-HCl (pH-Wert 8,8).

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke, je nach Gelbreite und Geldicke, meist 70 mA, bei einer Laufzeit von etwa 2 Stunden.

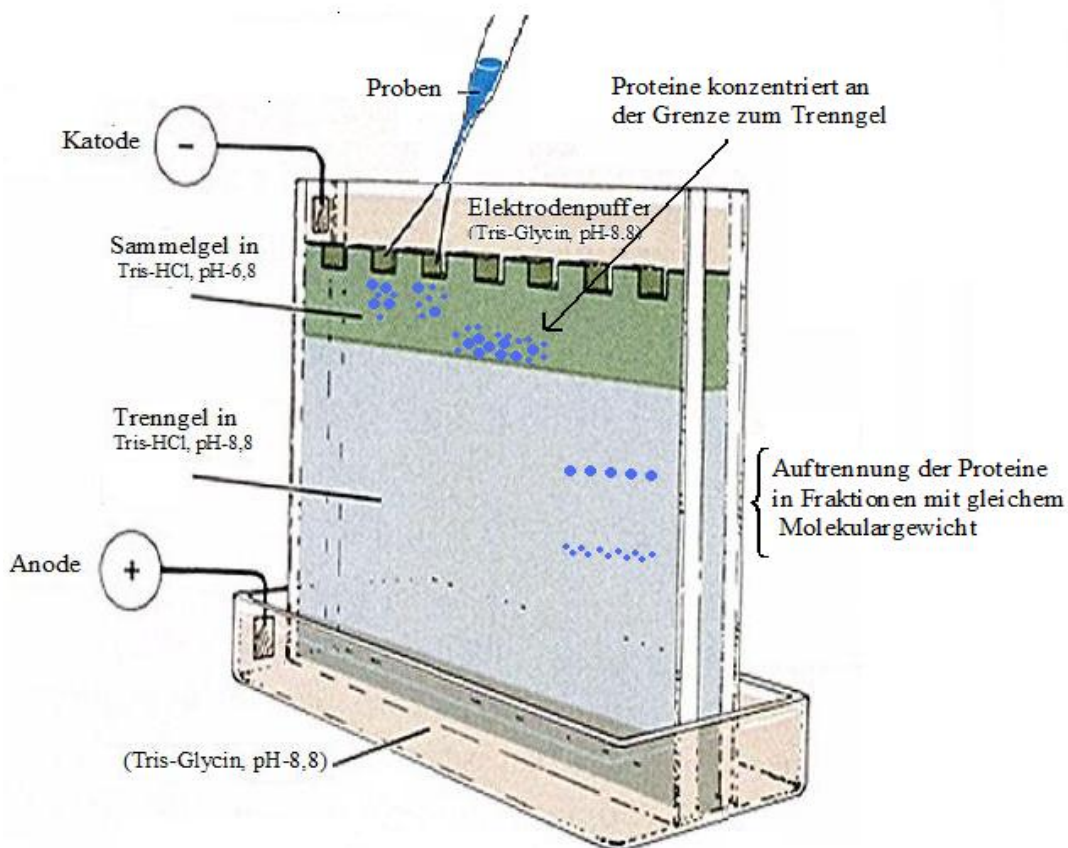


Abbildung 3.14

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Proben, bestehend aus unterschiedlicher Proteingröße, werden in den Probentaschen auf das Sammelpuffer aufgetragen. Nach Anlegung der Spannung wandern die Proteine in das Sammelpuffer ein, und konzentrieren sich an der Grenzlinie zum Trenngel. Aufgrund des „Molekularsiebeffekt“ des Trenngels, werden die Proteine in Fraktionen mit gleichem Molekulargewicht getrennt. (SDS-PAGE, Western Blot und andere Protein-Techniken. Tilman Lamparter, http://www.rz.uni-karlsruhe.de/~db127/f1_0708/f1_0708.html)

3.2.7.3 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel möglichst vollständig auf eine Membran (Immobilon P15, Millipore, Bedford) übertragen (*Western-Blotting*). Die Membran wurde auf zwei mit 1x-Transferpuffern, zusammengesetzt aus 850 ml dest. Wasser, 100 ml Methanol 98% und 50 ml 10x *Transferbuffer* (Invitrogen), getränkten Schwämmen und einem dünnen Filterpapier platziert. Auf das Gel wurden wiederum Filterpapier und Schwämme gelegt. Das Ganze wurde dann in ein Modul (Invitrogen) gelegt und ein Transfer mit 1-2 mA pro cm² des Filterpapiers für etwa 1,5 Stunden durchgeführt.

Die Färbung mit dem sauren Azofarbstoff *Ponceau S* diente zur visuellen Kontrolle des Transfers.

Nach Beendigung des *Blottings* wurde die Membran entfernt und für 60 min mit 5% Milch in 0,1% Tween 20 in PBS (Fischer) Lösung blockiert.

Danach erfolgte der Nachweis der membrangebundenen Proteine (*Immunoblotting*). Dafür wurde die Membran mit primären Antikörpern: anti-EP1, anti-EP2, anti-EP3 und anti-EP4, 1:1000 in 5% BSA verdünnt, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die anti-EP1, anti-EP2, anti-EP3 und anti-EP4 Antikörper stammen vom Hersteller Cayman Chemical (Ann Arbor, USA); die anti-Aktin Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz). Die ungebundenen Antikörper wurden am nächsten Tag durch sechsmaliges Waschen mit jeweils 10 min Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) entfernt. Die Membran wurde dann mit dem Sekundärantikörper HRP (*horseradish peroxidase*) (anti-Maus gekoppelt; Santa Cruz), 1:5000 in 5% BSA für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wieder 6x je 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Membran wurde zusätzlich mit diesem Verfahren und anti-Aktin Antikörpern, auf das Aktin untersucht. Aktin ist ein Protein, das in der Zelle permanent und in gleichen Konzentrationen vorhanden ist, sog. „housekeeping gene“ und somit nachgewiesen werden kann, dass die unterschiedliche Größe der Banden nicht aus einer ungleichmäßigen Beladung mit Protein resultiert.

Zum Nachweis des Membran-gebundenen Proteins wird im ECL-System Luminol (3-Aminophthalhydrazid) eingesetzt. HRT katalysiert die Umsetzung von Luminol (Super Signal, Rockford) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann (Abbildung 3.15).

Die Membran wurde zuletzt mittels ECL+System (Amersham) und Röntgenfilm bei Rotlicht in der Dunkelkammer im Entwicklungsautomaten entwickelt.

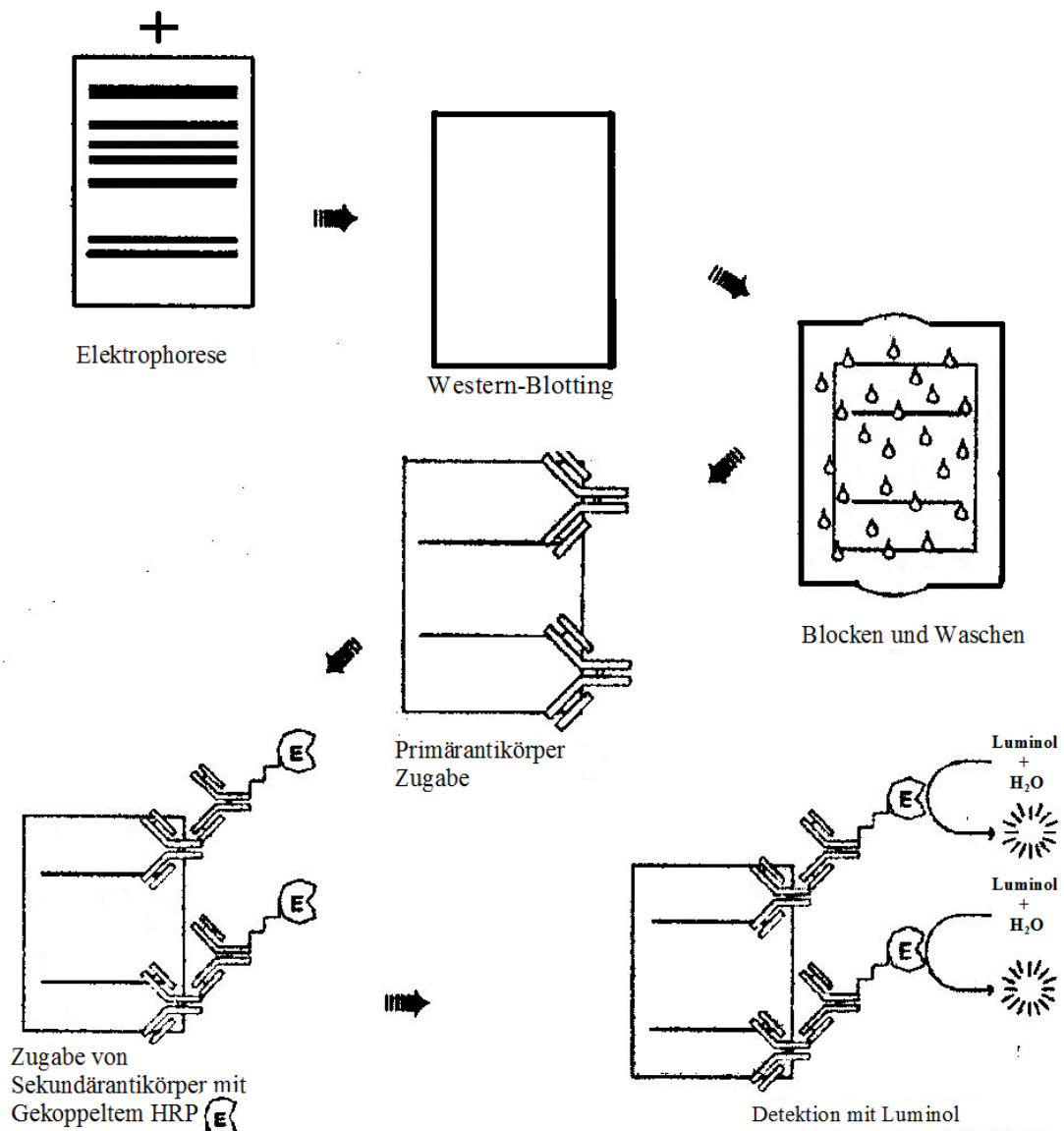


Abbildung 3.15

Schematische Darstellung des Western Blot Prinzips. Nach der SDS-PAGE werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen (*Western-Blotting*).

Danach wurde die Membran geblockt und gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper zugegeben. Er bindet sich spezifisch an das anzuweisende Protein, das wiederum von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt und gebunden wird. Bei der durch HRP katalysierten Reaktion kann die freigesetzte Lumineszenz detektiert werden. (Institut für Zoologie der Universität Heidelberg, <http://www.sinnesphysiologie.de/download/skripta.pdf>)

3.2.8 Zellwanderung in das Wundareal

Kontroll-Fibroblasten wurden in 6-Well-Platten, 80.000 CLPF/Well, ausgesät und kultiviert bis ein konfluenter *Monolayer* entstanden war.

Die Zellen wurden schließlich vor dem Versuch 24 h mit Kultur-Medium ohne FCS gehungert. Anschließend wurden mit einer Plastikpipette durch die konfluenten Zellen in den Platten Spuren gezogen. So wurde eine Zellschädigung / Wunde verursacht. Das Medium mit den abgekratzten Fibroblasten wurde abgekippt und durch neues ersetzt. Durch eine Zugabe von 25 µg/ml Fibronectin in das Kulturmedium wurde die Zellmigration induziert.

In den zwei weiteren Versuchen wurde die Zellmigration mittels einer Zugabe von 50 µM PGE2 oder 30 µM Forskolin zu dem Medium getestet.

4 Ergebnisse

4.1. Immunhistochemische Charakterisierung von humanen intestinalen Fibroblastenkulturen

Alle Versuche wurden mit primären intestinalen Fibroblasten aus Biopsien oder Darmresektaten des Colons (Dickdarm) durchgeführt. Das Colon beginnt an der Bauhin-Klappe und reicht bis zum Rektum. Es schließt das Caecum mit Appendix, das Colon Ascendens, das Colon transversum, das Colon descendens und das Colon sigmoideum mit ein. Es wurden Fibroblastenkulturen aus der intestinalen Mukosa von Kontroll-Patienten verwendet.

Nach der Isolation der primären intestinalen Fibroblasten von der Lamina propria des Colons (CLPF) wurden diese mittels Immunocytochemie identifiziert und charakterisiert. Die folgenden Antikörper wurden für die Charakterisierung von CLPF verwendet: Anti-Fibroblast-Antikörper, anti- α -smooth-muscle Actin, anti-vimentin, anti-vinculin, anti-myosin und anti-desmin. Als Isotyp-Kontrollen (Negativ-Kontrolle) wurden IgG1, IgG2a und IgG3 verwendet.

4.1.1 Anti-Vimentin Antikörper

Vimentin, ein Intermediärfilament - Protein des Zytoskeletts, kommt im Zytoplasma (teilweise auch im Nucleolus) aller Zellen mesenchymaler Herkunft vor. Der anti-Vimentin Antikörper Vim 3B4 reagiert mit Vimentin aus mesenchymalen Zellen, zeigt aber mit den anderen eng verwandten Intermediärfilament - Proteinen wie Desmin, Keratin, Neurofilamenten und gliafibrillären Proteinen keine Reaktion (DAKO, 1997).

Die untersuchten Zellen zeigten eine positive homogene Markierung mit dem anti-Vimentin Antikörper.

4.1.2 Anti- α -*smooth-muscle* Actin Antikörper

Als Bestandteil des Zytoskeletts ist Aktin ein wichtiges Strukturprotein. In der Zelle bildet Aktin dynamische Filamente, die sogenannten Aktin-Filamente. Diese Filamente dienen der Stabilisierung der äußeren Zellform, für intrazelluläre Transporte, nehmen an dem Fokalkontakt sowie der Zellmigration teil, und sind wichtiger zentraler Bestandteil des Kontraktionsapparats der Muskelzellen. Der Anti- α -*smooth-muscle* Actin Antikörper reagiert mit der α -*smooth-muscle*-Isoform von Aktin. Der Antikörper reagiert nicht mit dem Aktin von Fibroblasten (β - und γ -cytoplasmatisch), wohl aber mit dem Aktin von Myofibroblasten (DAKO, 1995). Ein Teil der untersuchten Zellen zeigte eine positive Markierung mit dem anti- α -*smooth-muscle* Actin. Bei den untersuchten Zellen handelt es sich somit um eine heterogene Population, die unterschiedlich α -*smooth-muscle* Actin exprimiert.

4.1.3 Anti-Desmin Antikörper

Desmin ist auch ein Bestandteil des Zytoskeletts und kommt in der Skelett-, Herz- und der glatten Muskulatur vor (Denise et al., 2004). Desmin ist im Zytoplasma der glatten Muskelzellen verteilt und verbindet in den Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur die benachbarten Myofibrillen (geordnete Bündel aus Aktin- und Myosinfasern) (Alberts et al., 1997b). Ein Teil der untersuchten Zellen zeigte eine positive Markierung von Desmin.

4.1.4 Zusammenfassung der immunhistochemischen Charakterisierung von humanen intestinalen Fibroblasten

Die isolierten Zellen zeigten eine positive homogene Markierung mit anti-Vimentin Antikörpern. Dies beweist den Fibroblasten-Phänotyp der isolierten Darmzellen. Die spezifischen Marker für Myofibroblasten und glatten Muskelzellen wie Aktin und

Desmin wurden von den Zellen unterschiedlich exprimiert. Diese weisen auf eine mesenchymale Mischpopulation hin.

Zur Sicherung der Reinheit der Fibroblastenkulturen wurden B-Zell-spezifische anti-CD19 und anti-CD45 Antikörper, T-Zell-spezifischer anti-CD3-Antikörper, Makrophagen und Leukozyten – spezifische anti-CD68 Antikörper, Epithelzell-spezifische anti-Cytokeratin 18 Antikörper verwendet.

Bei den untersuchten Fibroblastenkulturen konnten nach der dritten Passage neben den oben beschriebenen Zelltypen keine anderen positiven adhärenen Zell-Populationen gefunden werden. Somit konnte eine Verunreinigung durch Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen oder Epithelzellen ausgeschlossen werden. Alle Experimente mit den CLPF wurden nach der dritten Passagen der Zellen durchgeführt, um Fehlergebnisse durch Verunreinigung auszuschließen.

Als Negativ-Kontrolle wurde ebenfalls die APAAP-Methode mit den Isotyp-Kontrollen IgG1, IgG2 und IgG3 durchgeführt. Die Zellen blieben ungefärbt. Damit konnte eine unspezifische Markierung durch den Isotyp der verwendeten Antikörper ausgeschlossen werden.

4.2 Migrationsversuche mit der modifizierten 48-Well-Boyden-Kammer

Das Ziel der Migrationsversuche war es, die Migrationsinduktion durch Fibronectin in verschiedenen Konzentrationen bei CLPF zu zeigen, sowie den Effekt von PGE2 auf die Migration von CLPF zu untersuchen. Des Weiteren sollte herausgefunden werden, über welche Mechanismen PGE2 seine Wirkung auf die CLPF vermittelt. Die Funktion der einzelnen EP-Rezeptoren sollten untersucht werden. In den Migrations-Assays sollte auch das Migrationsverhalten von CLPF unter dem Einfluss von cAMP erhöhenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, welche Rolle cAMP auf das Migrationspotential von CLPF spielt.

Um genauer die Rolle von PGE2 zu untersuchen, wurden die Experimente mit Kontroll- und Morbus Crohn Darmfibroblasten in der modifizierten 48-Well-Boyden Kammer durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Migrationsexperimenten mit der modifizierten 48-Well-Boyden-Kammer sollten den Effekt von PGE2 auf die Migration von CLPF

aufdecken, aber auch die Rolle von PGE2 und die bisher unbekannte Rolle der cAMP erhöhenden Substanzen auf die intestinale Wundheilung evaluieren.

Um eine optimale Inkubationszeit von CLPF in der modifizierten 48-Well-Boyden Kammer zu bestimmen und diese für alle Migrationsversuche festzulegen, wurde in Vorversuche zeitabhängig das Migrationsverhalten von CLPF getestet. Bei der Migrations-Assay mit der modifizierten 48-Well-Boyden Kammer kommt es zu einer gerichteten Migration (Chemotaxis). Dabei wandern die Fibroblasten entlang eines Konzentrationsgradienten einer migrationsinduzierenden Substanz. Nach längerer Inkubationszeit erfolgt ein Konzentrationsausgleich zwischen den oberen und unteren Wells der Kammer und eine gerichtete Migration kann nicht mehr detektiert werden. Es wurde eine optimale Migrationszeit von 6 h herausgefunden. Alle folgenden Migrationsversuche wurden deshalb mit einer Inkubationszeit von 6 h durchgeführt.

4.2.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Fibronectin auf die Migration von Darmfibroblasten

Fibronectin ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das in vielen physiologischen Abläufen, unter anderem in der Gewebsreparatur sowie in der Migration und Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle spielt.

Es wurde zuerst die Migration von CLPF als Antwort auf zunehmende Konzentrationen von Fibronectin gemessen. In einem zweiten Versuch wurde in der Bodenplatte zusätzlich die gleiche Menge PGE2 in konstanter Konzentration von 10 μM zugegeben, Abbildung 4.1 ($p < 0,01$).

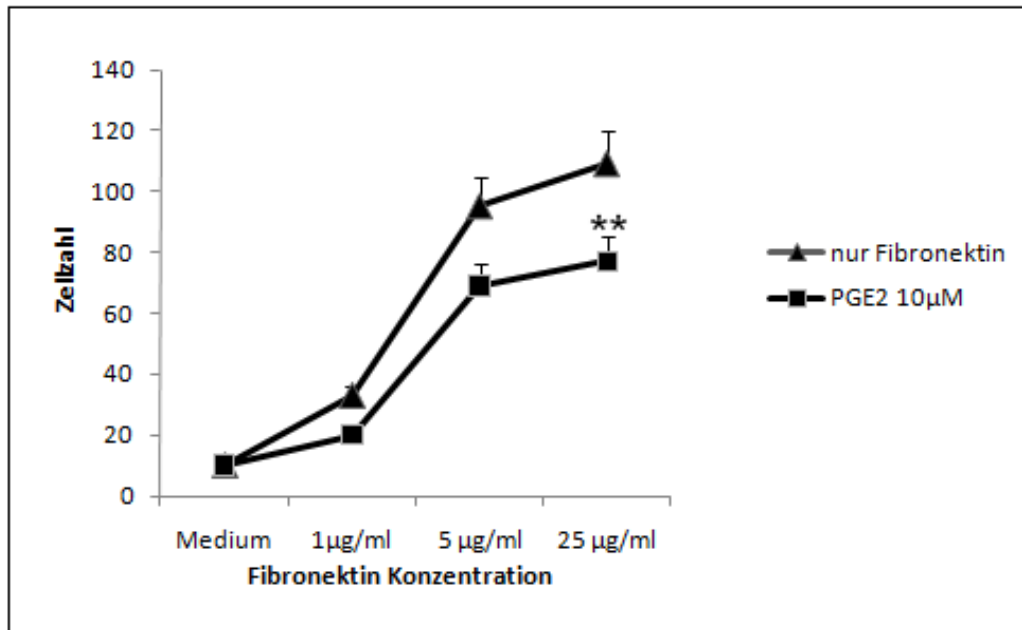


Abbildung 4.1

Migration von den CLPF bei steigender Fibronectin-Konzentration und nach der Zugabe von 10 µM PGE2 (n=6, ** p<0,01)

Die Abbildung 4.1 zeigt eine steigende Migration von CLPF mit zunehmender Fibronectin-Konzentration. Nach einer Zugabe von PGE2 wurde die Migration von CLPF deutlich gehemmt. Ähnliche Migrationsänderungen wurden auch unter dem Einfluss steigender PGE2-Konzentration in der Abbildung 4.2 (p<0,01) beobachtet.

4.2.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Prostaglandin E2 (PGE2) auf die Migration von Darmfibroblasten

Es wurde gezeigt, dass das Migrationspotential von den intestinalen Fibroblasten bei Exposition bzw. nach Prä-Exposition mit proinflammatorischen Mediatoren reduziert ist (Leeb et al., 2003). Prostaglandin E2 (PGE2), welches in der entzündeten intestinalen Mukosa von CED Patienten existiert, spielt eine wichtige Rolle in der funktionellen Modifizierung von CLPF. Der konzentrationsabhängige Einfluss von PGE2 auf die Migration von Fibroblasten wurde mittels modifizierter 48-Well-Boyden-Kammer untersucht.

Bei zunehmender PGE2 Konzentration und unveränderter Fibronectin-Konzentration von 25 µg/ml in der Bodenplatte zeigte sich eine deutliche Verminderung der Migration von CLPF, sowohl bei den Kontroll- als auch bei Morbus Crohn-Zellen. Die Morbus Crohn-Zellen haben spontan ein niedriges Migrationspotential wie vorherichtet (Leeb et al., 2003). Die Zugabe von PGE2 in die Bodenplatte oder in die Deckplatte ergab keine Unterschiede in der Migrationshemmung. Beide Migrationsversuche wurden wenigstens viermal wiederholt.

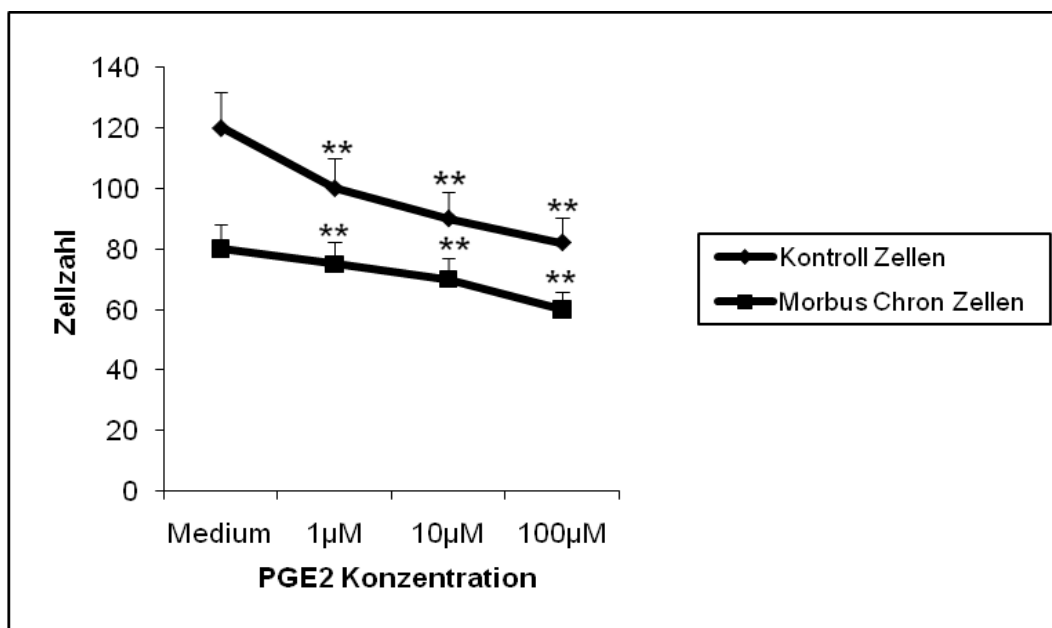


Abbildung 4.2

Migration der Kontroll- und Morbus Crohn-Zellen unter dem Einfluss steigender PGE2-Konzentration (n=7, * p<0,01)

Die Ergebnisse (Abbildung 4.2) zeigten sowohl bei den Kontroll-, als auch bei den Morbus Crohn-Fibroblasten ein ähnlich reduziertes Migrationsmuster unter PGE2 Einfluss. Die weiteren Versuche wurden deshalb nur mit Kontroll-Fibroblasten (CLPF) durchgeführt.

Auch in dem Wundassay mit konfluenten CLPF wurde eine Induktion der Zellmigration durch Fibronectin beobachtet. Durch das Auskratzen von einem Teil der Zellen in der konfluenten Zell *Monolayer*, kommt es zu einer Zellschädigung. Diese konnte nach

einer Zugabe von 25 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin in dem Kulturmedium durch die dabei induzierte Zellmigration wieder repariert werden. Die erste Reihe in der Abbildung 4.3 zeigt deutlich den Unterschied zwischen einem Wundareal ohne Fibronectin und einem Wundareal unter Fibronectin Einfluss. Nach einer zusätzlichen Gabe von 10 μM PGE2 konnte eine Hemmung der Fibronectin induzierten Migration beobachtet werden (Abbildung 4.3 untere Reihe). Ohne die migrationsinduzierende Substanz Fibronectin zeigten die CLPF in beiden Versuchen, mit und ohne PGE2 relativ geringes bis fast kein Migrationsverhalten.

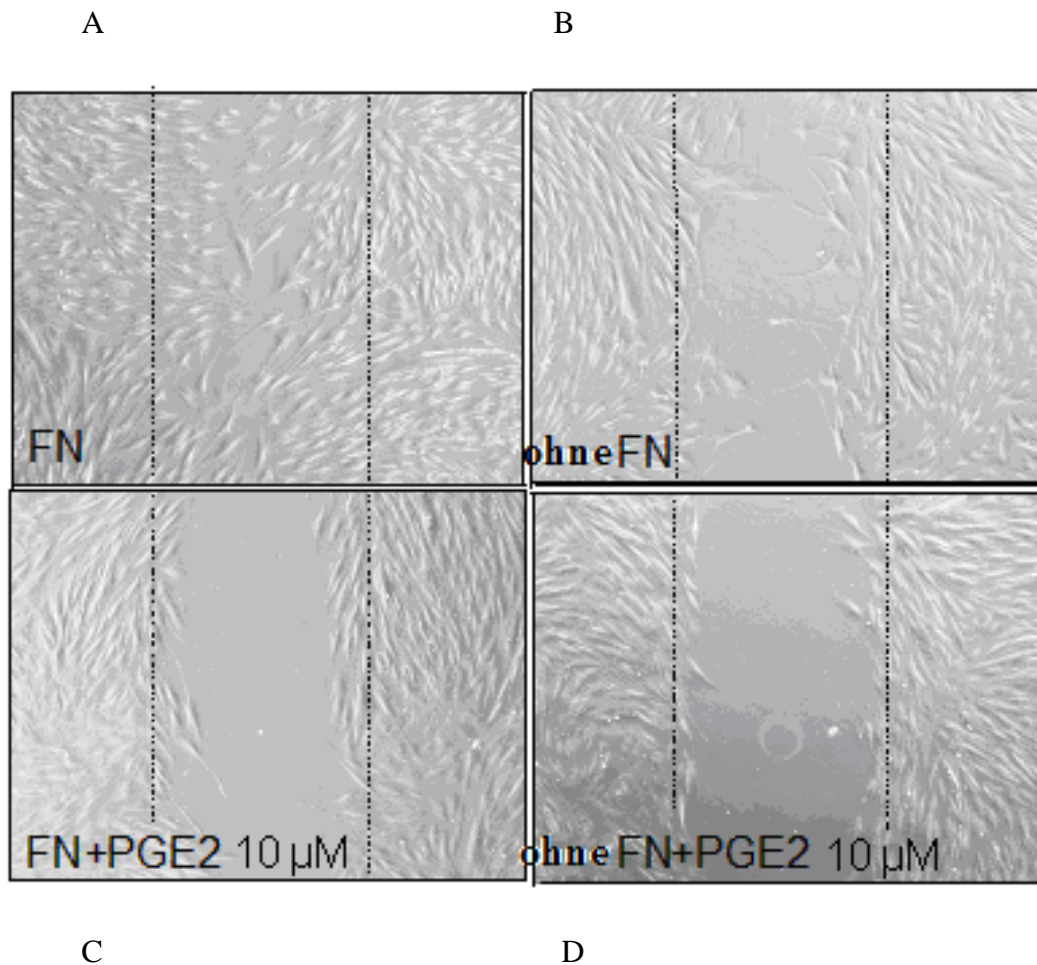


Abbildung 4.3

CLPF-Kultur (200-fache Vergrößerung). Das Bild A (oben links) zeigt die Fibronektin induzierte Fibroblastenmigration in einem Wundareal. Im Vergleich dazu konnte im Bild B (oben rechts) der Zellschädigung ohne Fibronektin eine sehr geringe Zellmigration beobachtet werden. Das Bild C (unten links) zeigt nach der Zugabe von 10 µM PGE2 das gehemmte Migrationsverhalten der Zellen. Die beiden rechten Bilder (B und D) zeigen ohne die migrationsinduzierende Substanz – Fibronektin - mit und ohne - PGE2 ein sehr niedriges Migrationspotential. Auf den beiden Seiten jedes Bildes (links und rechts, mit gestichelten Linien getrennt) ist der gesunde konfluente Zell *Monolayer* der CLPF ohne den Einfluss von PGE2 dargestellt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass bei einer Zellschädigung die durch Fibronektin induzierte Fibroblastenmigration die Wunde wieder verschließen konnte. Diese Migration konnte jedoch unter Einfluss von PGE2 gehemmt werden. Ohne Fibronektin zeigten die CLPF in beiden Versuchen - mit und ohne PGE2 - trotz der Gewebeschädigung ein stark reduziertes Migrationsverhalten (Abbildung 4.3).

4.2.3 *Checkerboard*-Analyse der Fibroblasten - Migration mit und ohne Prostaglandin E2 (PGE2)

Die *Checkerboard*-Analyse erlaubt es, zwischen einer gerichteten Zellmigration entlang einem Konzentrationsgradienten, eines Chemoattraktans (Chemotaxis), und einer gesteigerten Zellbewegung aufgrund der Präsenz eines chemokinetischen Faktors (Chemokinese) zu unterscheiden (Zigmond, 1973; Sakai et al., 1998).

Um zu untersuchen, ob PGE2 die Chemotaxis oder die Chemokinese, oder beide hemmt, wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. In dem ersten Ansatz wurden nur unterschiedliche Konzentrationen von Fibronectin sowohl in den oberen als auch in den unteren *Wells* der modifizierten Boyden-Kammer eingesetzt. In dem zweiten Ansatz wurde zu den unterschiedlichen Konzentrationen von Fibronectin eine jeweils konstante Konzentration von 10 μ M PGE2 gegeben.

Der erste Versuch (Tabelle 4.1 A, $p < 0,05$) zeigte bei einer Zugabe von Fibronectin nur in den unteren *Wells*, eine dosisabhängige Zellwanderung entlang einem Konzentrationsgradienten, der sich durch die Membran hindurch in Richtung des oberen *Wells* aufbaute. Ohne Fibronectin Zugabe wanderten nur 9 ± 1 CLPF/Gesichtsfeld, mit steigender Fibronectin Konzentration migrierten auch mehr Zellen. In den *Wells* mit der höchsten Konzentration von Fibronectin 25 μ g/ml konnte auch die höchste Migrationsrate 100 ± 19 CLPF/Gesichtsfeld gefunden werden (entlang der vertikalen Richtung von dem Pfeil 1), somit zeigt der Pfeil 1 eine chemotaktische Zellmigration. Bei einer Fibronectin Zugabe nur in den oberen *Wells* wanderten die Zellen jedoch kaum (entlang der horizontale Richtung von dem Pfeil 1), was klar gegen eine reine Chemokinese spricht. Es war aber mit steigender Fibronectin Konzentration zugleich in den oberen und in den unteren *Wells* der Kammer eine erhöhte Migration detektierbar. Diese Zellmigration fand somit ohne Ausbildung eines Konzentrationsgradienten statt (entlang der diagonalen Richtung von dem Pfeil 1). Befand sich gleichzeitig die gleiche Menge von maximal 25 μ M Fibronectin sowohl im oberen als auch in den unteren *Wells* der Kammer, dann migrierten trotz des Fehlens einer Konzentrationsgradienten maximal 86 ± 18 CLPF/Gesichtsfeld von der oberen Seite der Membran auf die untere. Diese chemokinetische Migration war auch abhängig von der Fibronectin-Konzentration (entlang der diagonalen Richtung von dem Pfeil 1).

Der zweite Versuch wurde bei den gleichen Bedingungen durchgeführt, es wurde nur zusätzlich eine konstante Menge von 10 μM PGE2 zugegeben (Tabelle 4.1 B, $p < 0,05$). Entlang der vertikalen Richtung von Pfeil 2 zeigt sich im Vergleich zum vertikalen Pfeil 1 eine gehemmte Zellmigration. Das beweist die hemmende chemotaktische Wirkung von PGE2 auf das Migrationsverhalten von CLPF. Wenn man den diagonalen Pfeil 2 verfolgt und mit dem diagonalen Pfeil 1 vergleicht, zeigen auch hier die Zellen ein reduziertes Migrationsverhalten. Somit konnte auch hier eine hemmende chemokinetische Wirkung von PGE2 auf der Zellmigration gezeigt werden.

Beide Migrationsversuche wurden viermal wiederholt.

A

Ohne PGE2

Fibronektin Konzentration in den oberen Wells ($\mu\text{g/ml}$)

		0	1	5	25
Fibronektin Konz. in den unteren Wells ($\mu\text{g/ml}$)	0	9 \pm 1	10 \pm 3	13 \pm 2	9 \pm 2
	1	36 \pm 12	43 \pm 14	38 \pm 12	36 \pm 10
	5	87 \pm 20	86 \pm 20	76 \pm 15	73 \pm 15
	25	100 \pm 19 *	97 \pm 18	81 \pm 15	86 \pm 18 °

B

PGE2 10 μM

Fibronektin Konzentration in den oberen Wells ($\mu\text{g/ml}$)

		0	1	5	25
Fibronektin Konz. in den unteren Wells ($\mu\text{g/ml}$)	0	12 \pm 1	10 \pm 1	20 \pm 8	11 \pm 3
	1	30 \pm 10	35 \pm 10	32 \pm 8	30 \pm 11
	5	72 \pm 13	80 \pm 18	64 \pm 10	65 \pm 14
	25	76 \pm 13 *	76 \pm 12	69 \pm 13	61 \pm 11 °

Tabelle 4.1 A und B

Checkerboard-Analyse mit den CLPF. Der Teil A zeigt einen von der Fibronektin-Konzentration abhängigen Anstieg der chemotaktischen (A, entlang der vertikalen Richtung von dem Pfeil 1) und chemokinetischen (A, entlang der diagonalen Richtung von dem Pfeil 1) Zellmigration von CLPF. Der Teil B beweist eine hemmende dosisabhängige sowohl chemotaktische (vertikaler Pfeil 2) als auch chemokinetische (diagonaler Pfeil 2) Wirkung von PGE2 auf die Migration von CLPF (n=4, * und ° p<0,05)

Zusammenfassend konnte bei der ersten Versuchsreihe ein von der Fibronektin-Konzentration abhängiger Anstieg der chemotaktischen und chemokinetischen Migration von CLPF beobachtet werden. Der zweite Versuch bewies eine Hemmung auf die chemotaktische und chemokinetische Migration durch PGE2.

4.2.4 Prostaglandin E₂ (PGE₂) vermittelt seine Effekte über den EP-Rezeptor

Das verminderte Migrationsverhalten von CLPF durch PGE₂ wurde über spezifische Membranrezeptoren (EP-Rezeptoren) vermittelt. Vier EP-Rezeptor Subtypen (EP₁-EP₄) sind bekannt, die an verschiedene membranengebundenen G-Proteinen (G_i:EP₃, G_s:EP₂, EP₄, G_q:EP₁, EP₃) gekoppelt sind und die vielfältige physiologische Rolle von PGE₂ vermitteln. Mittels Western blot erfolgte der Nachweis von den vier Subtypen von EP-Rezeptoren in CLPF. Für den Versuch wurden zuerst die CLPF mit Lyse-Puffer inkubiert und danach wurden die aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert und das Lysat wurde für Western blot verwendet. Der Nachweis von membrangebundenen Proteinen (EP-Rezeptoren) erfolgte mittels *Immunoblotting*, dafür wurden anti-EP1, anti-EP2, anti-EP3 und anti-EP4 polyklonale Antikörper verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass in allen getesteten Fibroblasten alle vier EP-Rezeptor Subtypen exprimiert wurden (Abbildung 4.4). Die Ergebnisse sind repräsentativ für sechs unabhängige Zelllinien. Um die genaue Wirkung von PGE₂ auf die Migration von CLPF zu erforschen, wurde jeder der vier verschiedenen EP-Rezeptor- Subtypen einzeln untersucht.

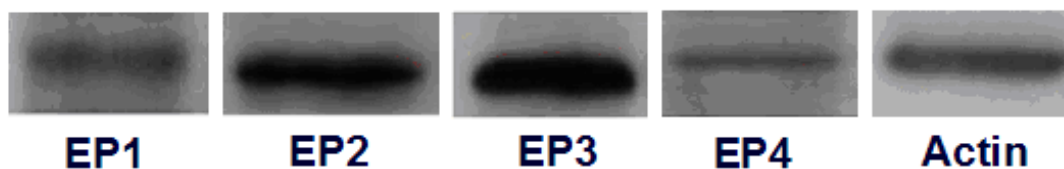


Abbildung 4.4

Ein repräsentativer Western blot der vier Subtypen des EP-Rezeptors in CLPF. Die membrangebundenen Proteine wurden mittels SDS PAGE Gels aufgetrennt und durch Western Blotting mit Hilfe von Antikörpern gegen die vier Subtypen des EP-Rezeptors visualisiert. Alle vier Subtypen des EP-Rezeptors wurden von allen getesteten CLPF exprimiert. Die Abbildung ist repräsentativ für sechs unabhängige Zelllinien (n=6)

4.2.4.1 Expression der EP-Rezeptoren

4.2.4.2 Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) zeigen unverändertes Migrationsverhalten bei der Stimulation von der EP1- und EP3-Rezeptoren

Sulproston, ein synthetisches Prostaglandin-E2-Derivat, ist ein kombinierter EP1- und EP3-Rezeptor-Agonist. Auf die Migration von CLPF zeigte Sulproston keine signifikante Wirkung, Abbildung 4.5. Die Migration von CLPF, die untersucht wird, ist Fibronektin induziert.

Der Versuch wurde viermal wiederholt.

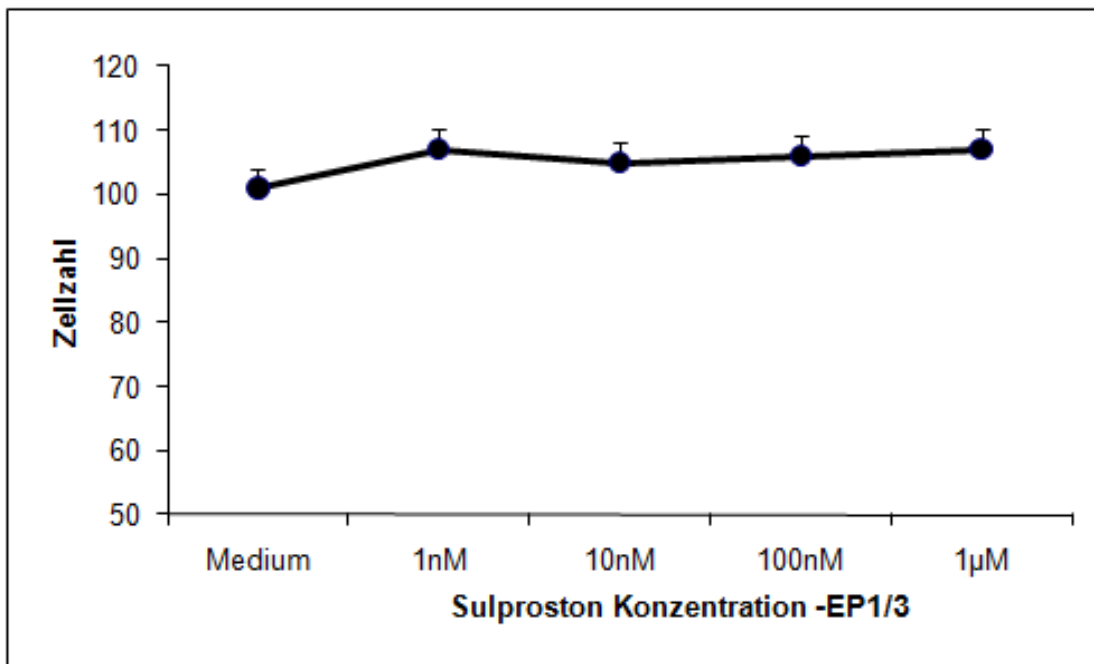


Abbildung 4.5

Unter einer steigenden Konzentration von Sulproston zeigten die CLPF keine signifikante Migrationsveränderung (n=4)

4.2.4.3 Der spezifische EP2-Rezeptor-Agonist Butaprost reduziert die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)

Als nächstes wurde die Wirkung der spezifischen Ligation der cAMP erhöhender EP-Rezeptors - EP2 und EP4 - untersucht.

Um genauer zu untersuchen, ob die hemmende Wirkung von PGE2 auf die CLPF über den EP2-Rezeptor vermittelt wird, wurde der spezifische EP2-Rezeptor-Agonist Butaprost eingesetzt.

In den Versuchen wurde Butaprost in den Konzentrationen von 100 nM, 1 μ M und 10 μ M verwendet. Butaprost zeigte eine hemmende Wirkung auf die CLPF Migration schon ab einer Konzentration von 100 nM, (Abbildung 4.6, $p < 0.05$). Der Versuch wurde viermal wiederholt.

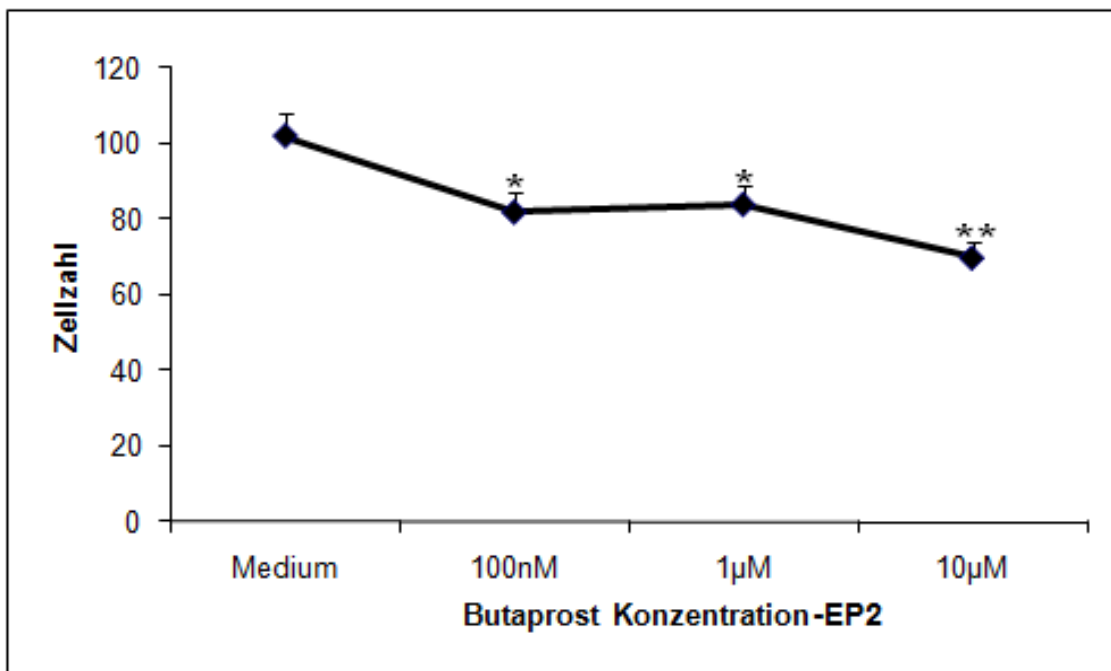


Abbildung 4.6

Butaprost, ein spezifischer EP2-Rezeptor-Agonist, vermindert konzentrationsabhängig die Migration von CLPF (n=4, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

4.2.4.4 Der spezifische EP4-Rezeptor-Agonist ONO-AE1-329 reduziert die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)

Als nächstes wurde der selektive EP4-Rezeptor-Agonist ONO-AE1-329 getestet. In den Migrationsversuchen wurde dieser EP4-Rezeptor-Agonist in Konzentrationen von 100 nM bis 10 μ M eingesetzt. Schon ab einer Konzentration von 100 nM migrierten deutlich weniger CLPF. In der Abbildung 4.7 ($p < 0,01$) wurde die konzentrationsabhängige Reduktion der Migration von CLPF unter dem Einfluss von ONO-AE1-329. Der Versuch wurde viermal wiederholt.

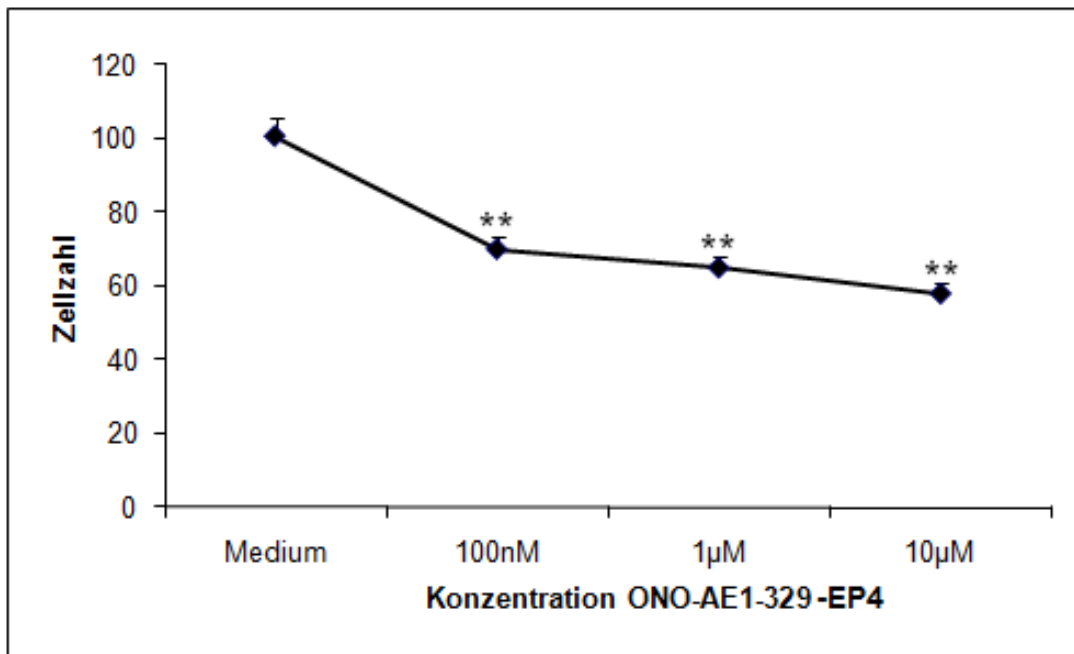


Abbildung 4.7

Konzentrationsabhängige Migrationshemmung von CLPF unter der Wirkung des selektiven EP4-Rezeptor-Agonisten ONO-AE1-329 (n=4, * $p < 0,01$)

4.2.5 Durch eine Blockierung der EP2- und EP4- Subtyp-Rezeptoren wurde die hemmende Wirkung von Prostaglandin E2 (PGE2) auf die Migration von Kontroll-Fibroblasten aufgehoben

Im nächsten Versuch wurde die Wirkung der EP2-Rezeptorblocker AH 6809 und EP4-Rezeptorblocker AH 23848 auf die CLPF getestet. Die CLPF wurden 1 h vor dem Start der Migrations-Assay mit den jeweiligen Rezeptor-Antagonisten präinkubiert. Nach 1 h wurden die EP2- und EP4-Rezeptor-Antagonisten getrennt und zusammen, und jeweils mit und ohne PGE2 in der Bodenplatte zugegeben. Die EP-Rezeptorblocker wurden in den Konzentrationen von 10 μM getestet. PGE2 wurde in einer konstanten Konzentration von 10 μM verwendet, da die CLPF bei dieser Konzentration von PGE2 eine deutlich reduzierte Migration zeigten (siehe Abbildung 4.2). Die Ergebnisse in der Abbildung 4.8 (* $p < 0,05$) zeigen die Migrationssteigerung von CLPF durch die Zugabe von je 10 μM EP2- oder EP4-Rezeptorblocker. Bei einer Gabe der beiden Rezeptorblockern AH 6809 und AH 23848 in einer Konzentration von 10 μM zusammen mit PGE2, zeigten die Kontroll-Fibroblasten ein maximales Migrationsverhalten. Der Versuch wurde viermal wiederholt.

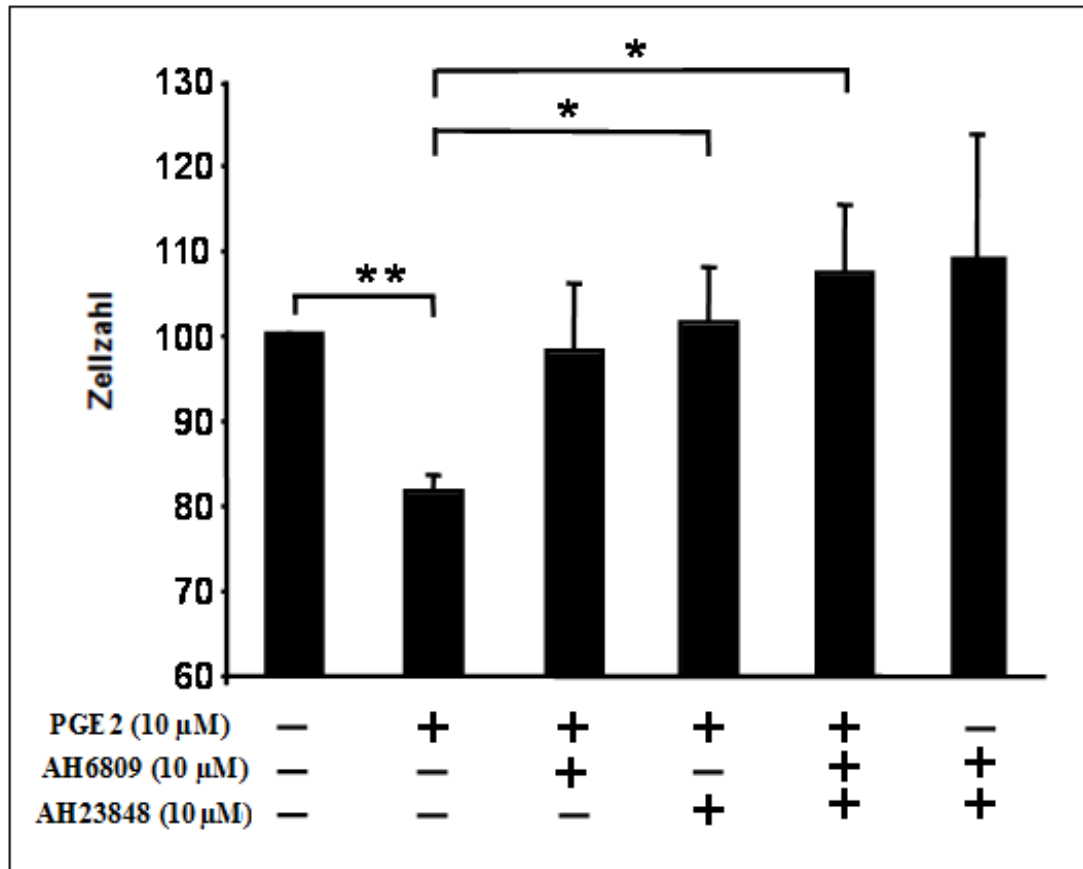


Abbildung 4.8

Aufheben der hemmenden Wirkung von PGE2 auf die CLPF mittels EP2 (AH6809)- und EP4 (AH23848)- Rezeptorblocker (n=4, * p<0,05, **p<0,01)

4.2.6 Wirkung von intrazellulärem Cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF)

PGE2 erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration mittels EP2- und EP4-Rezeptoren. Die Rezeptoren sind an das membranständige G-Protein gekoppelt.

Durch die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors wird die membranständige Adenylatcyclase stimuliert. Diese wandelt zelluläres ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP um. Ein bekannter direkter Stimulator der Adenylatcyclase ist Forskolin.

Der Abbau von cAMP zu AMP (Adenosinmonophosphat) wird durch das Enzym Phosphodiesterase katalysiert.

4.2.6.1 Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase

Forskolin wurde in den Migrationsversuchen in verschiedenen Konzentrationen von 3 μM bis 30 μM eingesetzt. Die Abbildung 4.9 ($p < 0,01$) zeigt das reduzierte Migrationsverhalten der CLPF unter der Einwirkung von Forskolin.

Der Versuch wurde viermal wiederholt.

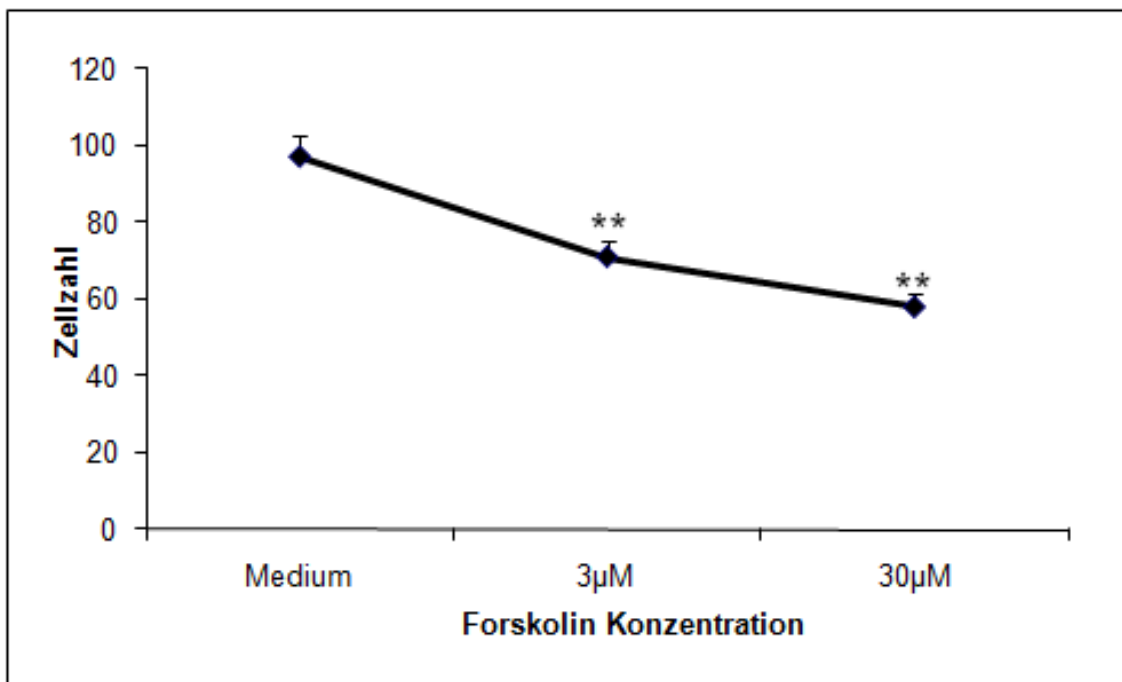


Abbildung 4.9

Der direkte Stimulator der Adenylatcyclase Forskolin reduziert konzentrationsabhängig die Migration von CLPF ($n=4$, * $p < 0,01$)

Auch in dem Versuch der Zellmigration in verwundetem Zellrasen, konnte beobachtet werden, dass die von Fibronectin induzierte Zellmigration bei einer Gewebeschädigung,

nach einer Zugabe von 30 μ M Forskolin deutlich gehemmt werden konnte (Abbildung 4.10). Die erste Reihe in der Abbildung 4.10 zeigt wieder einen deutlichen Unterschied zwischen dem Wundareal unter Fibronectin-Einfluss und den Wundareal ohne Fibronectin. Die untere Reihe bestätigt die hemmende Wirkung von Forskolin auf die Zellmigration.

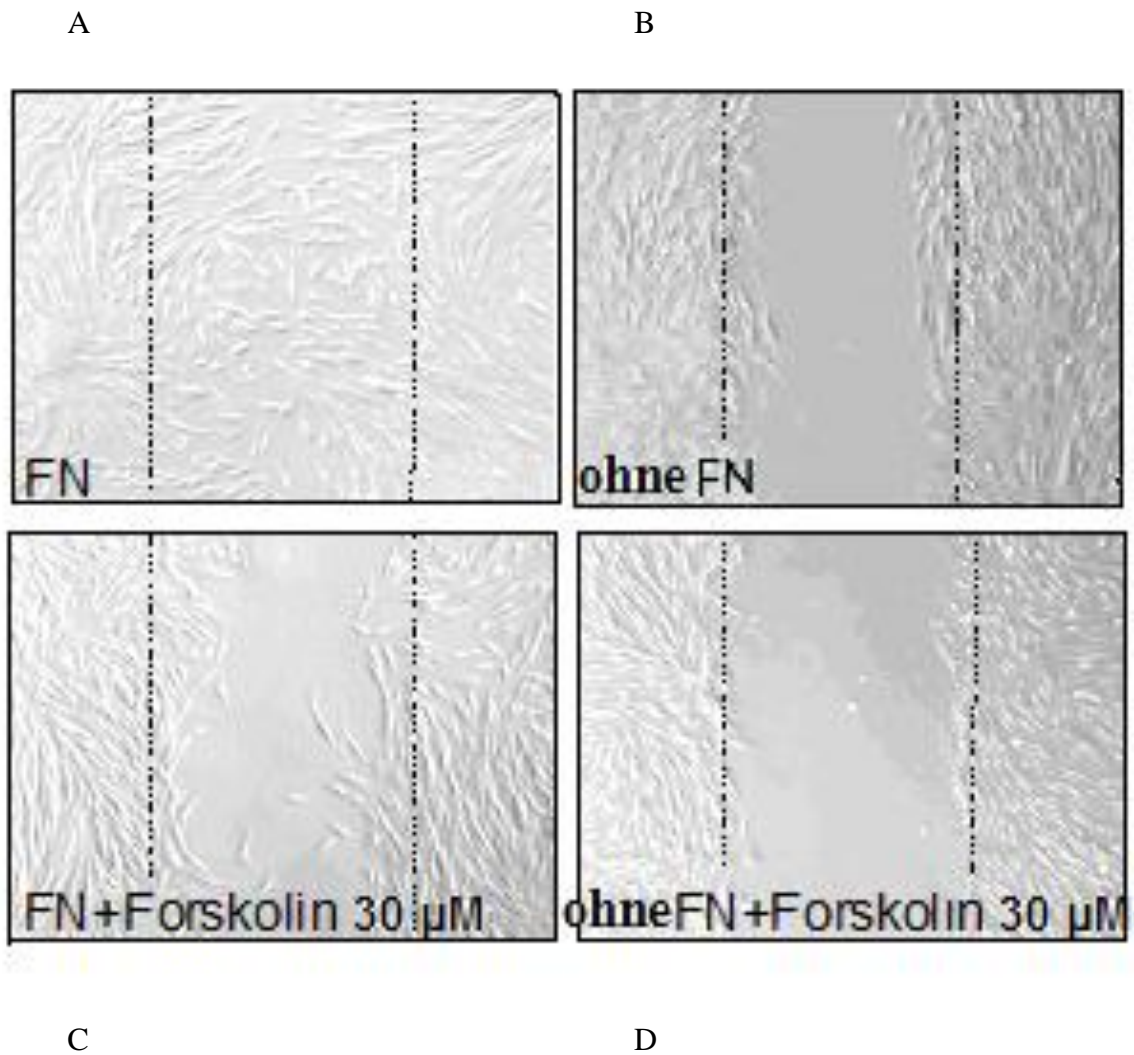


Abbildung 4.10

CLPF-Kultur (200-fache Vergrößerung). Das Bild A (oben links) zeigt die Fibronektin induzierte Fibroblastenmigration in einem Wundareal. Im Vergleich dazu zeigt das Bild B (oben rechts) ohne Fibronektin mit einer sehr niedrigen Zellmigration. Das Bild C (unten links) zeigt nach der Zugabe von 30 μ M Forskolin das gehemmte Migrationsverhalten der Zellen. Die beiden rechten Bilder (B und D) zeigen ohne die migrationsinduzierende Substanz Fibronektin, mit und ohne Forskolin ein sehr niedriges Migrationsverhalten. Auf den beiden Seiten jedes Bildes (links und rechts, mit gestrichelten Linien getrennt) ist der gesunde konfluenten Zell *Monolayer* der CLPF ohne den Einfluss von Forskolin dargestellt.

4.2.6.2 Die Phosphodiesterase-Hemmer Pentoxyphyllin und Rolipram

Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration wird durch die Aktivität der Phosphodiesterase (PDE) begrenzt, die cAMP zu 5'-Adenosin-Monophosphat (AMP) abbaut. 11 PDE Isoformen sind bisher bekannt, die sich in ihrem Vorkommen, ihren Funktionen und der Regulation durch spezifische Inhibitoren oder Aktivatoren unterscheiden. Die Wirkung der beiden PDE Inhibitoren Pentoxyphyllin und Rolipram auf die CLPF wurde getestet.

Im nächsten Experiment wurde die Wirkung von Pentoxyphyllin in Konzentrationen von 100 μ M und 1 mM auf die CLPF getestet. Mit dem PDE-Hemmer migrierten deutlich weniger Fibroblasten. Inkubiert man die CLPF mit Pentoxyphyllin und PGE₂, in konstanter Konzentration von 10 μ M zusammen, zeigte sich eine noch stärkere Migrationshemmung der Zellen (Abbildung 4.11, $p < 0,01$). Der Versuch wurde viermal wiederholt.

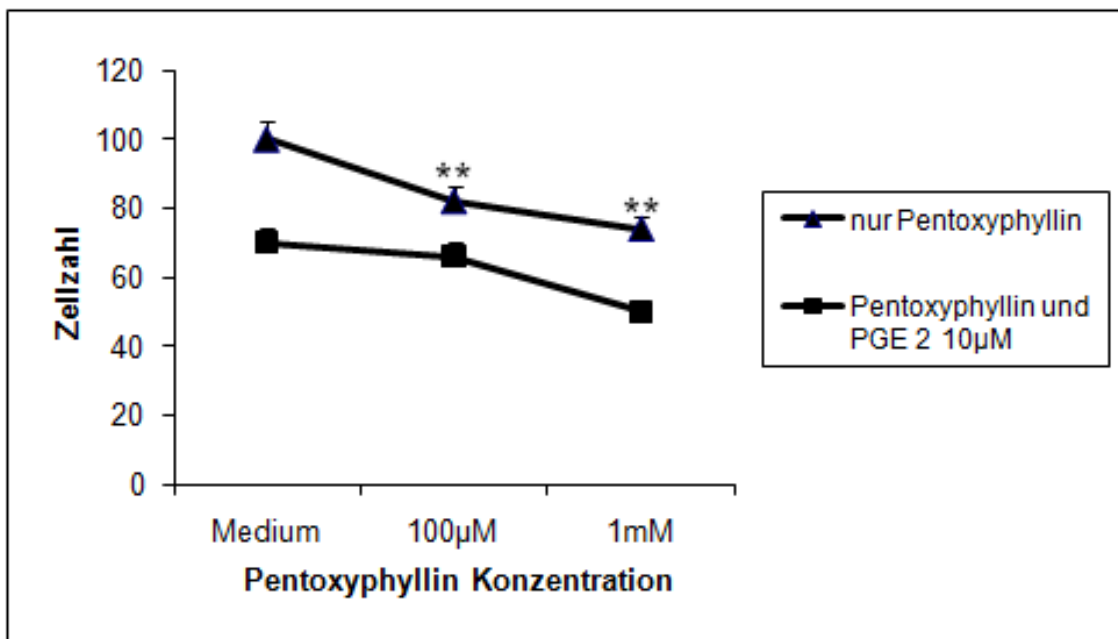


Abbildung 4.11

Konzentrationsabhängige Reduktion der Migration von CLPF unter der Wirkung von PDE-Hemmer Pentoxyphyllin und noch stärkere Migrationshemmung unter dem Einfluss von Pentoxyphyllin und 10 μ M PGE 2 zusammen (n=4, ** $p < 0,01$)

In den Migrationsversuchen wurde PDE Typ-4 Inhibitor Rolipram in Konzentrationen von 100 nM und 1 μ M verwendet. Als Ergebnis konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Migration von CLPF (Abbildung 4.12, $p < 0,05$) beobachtet werden. Im nächsten Versuch wurde in der Bodenplatte eine steigende Konzentration von Rolipram und zusätzlich die gleiche Menge von 10 μ M PGE2 zugegeben. Unter Einfluss von Rolipram und PGE2 zusammen migrierten an Zahl signifikant weniger Kontroll-Fibroblasten (siehe Abbildung 4.12). Der Versuch wurde viermal wiederholt.

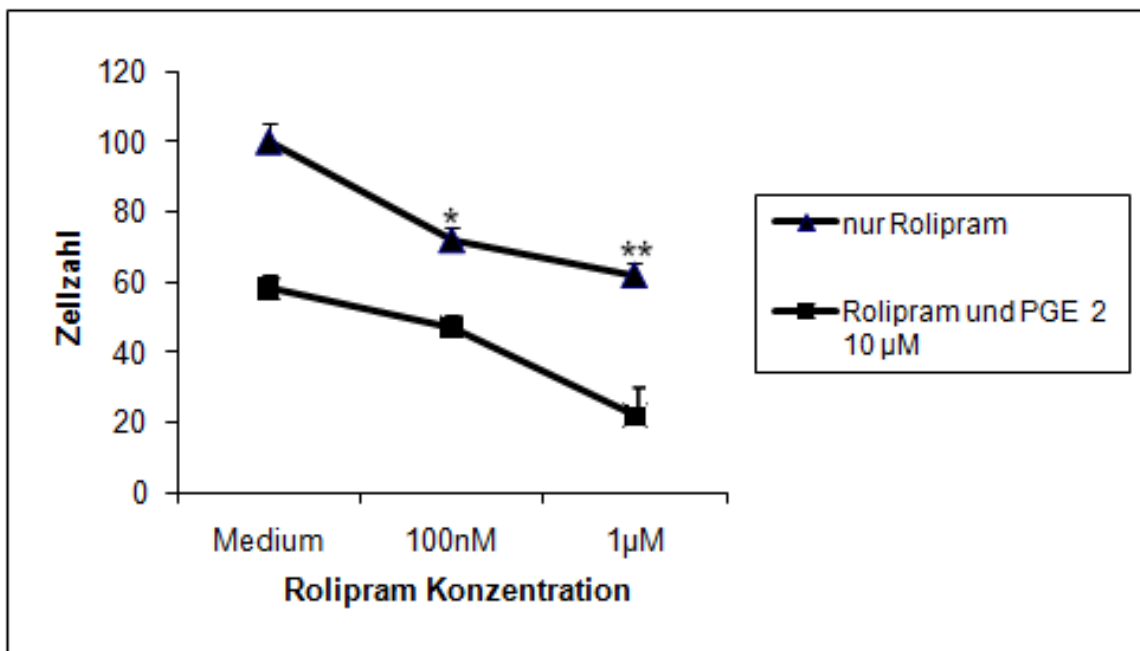


Abbildung 4.12

Konzentrationsabhängige Reduktion der Migration von CLPF unter der Wirkung des spezifischen PDE Typ-4 Hemmers Rolipram und noch stärkere Migrationshemmung unter dem Einfluss von Rolipram und PGE2 (10 μ M) zusammen ($n=4$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$)

4.3 Quantitative Konzentrationsbestimmungen mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

4.3.1 Prostaglandin E2 (PGE2) steigert die intrazelluläre cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration

Nachdem schon gezeigt konnte, dass eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration zu einer Hemmung der Fibroblastenmigration führt, wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration von CLPF nach einer vorherigen Inkubation der Zellen mit PGE2, mittels ELISA gemessen. Nach einer Inkubation von CLPF mit PGE2 10 µM konnte eine signifikante Steigerung des intrazellulären cAMP-Niveaus beobachtet werden (Abbildung 4.13, $p < 0,05$). Bei einer normalen intrazellulären cAMP-Konzentration von 30 ± 5 pmol/ml, führte eine Inkubation mit PGE2 zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bis auf maximal 120 ± 5 pmol/ml.

Als nächster Versuch wurden die CLPF für 1h jeweils allein oder zusammen mit dem EP2- und EP4-Rezeptor-Antagonisten, AH 6809 und AH 23848, vorinkubiert. In diesem Versuch zeigten die Ergebnisse mit den beiden EP2- und EP4-Rezeptor Antagonisten zusammen, trotz der PGE2-Wirkung, eine signifikante Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration bis auf 15 ± 5 pmol/ml (siehe vorletzter Block, Abbildung 4.13, $p < 0,05$). Eine vorherige Inkubation sowohl mit dem EP2- als auch mit dem EP4-Rezeptor-Antagonisten allein, führte auch hier trotz des PGE-Einflusses zu einer minimalen Steigerung der cAMP-Konzentration.

Als letzter Versuch wurden die Zellen nur mit den beiden EP2- und EP4-Rezeptor Antagonisten vorinkubiert, ohne PGE2. Hier konnte eine in etwa gleiche der normalen intrazellulären cAMP-Konzentration von 27 ± 5 pmol/ml gemessen werden.

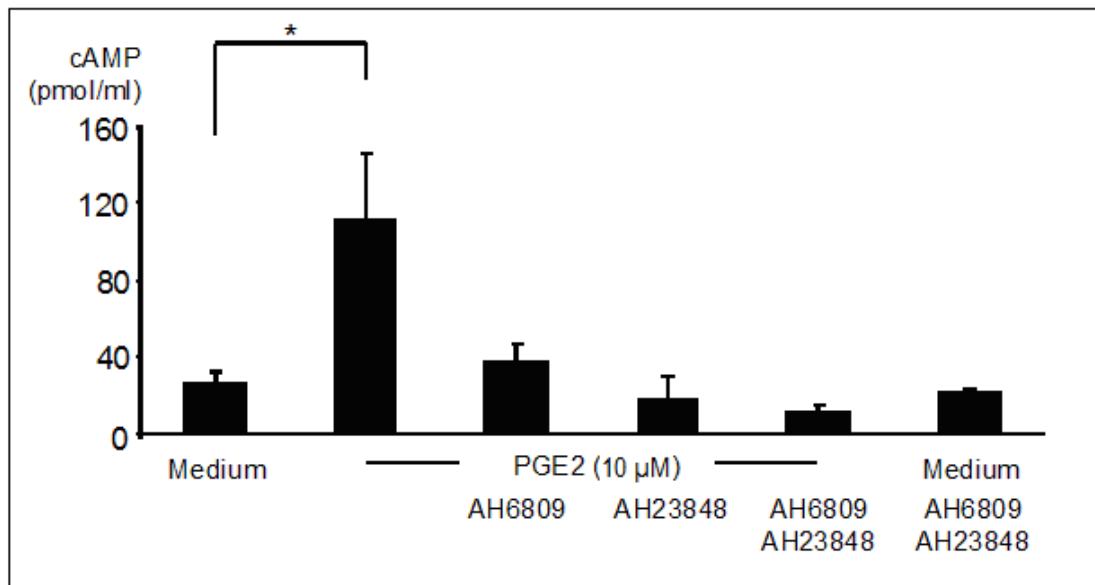


Abbildung 4.13

Quantitative Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels ELISA. Die normale intrazelluläre cAMP-Konzentration in den CLPF misst 30 ± 5 pmol/ml. Nach einer Vorinkubation mit PGE2 wurde eine signifikant höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration von maximal 120 ± 5 pmol/ml gemessen. Eine zusätzliche Vorinkubation der Zellen mit den EP2- und EP4-Rezeptor-Antagonisten, AH 6809 und AH 23848, konnte den durch PGE2 induzierten intrazellulären cAMP-Konzentrationsanstieg signifikant senken, bis auf 15 ± 5 pmol/ml ($n=3$, * $p < 0,05$)

4.3.2 IL-1 β und IFN- γ steigern die Prostaglandin E2 (PGE2) Konzentration in Zellüberständen

Wie bereits gezeigt wurde, zeigten die Morbus Crohn-Fibroblasten, die aus dem entzündlichen Milieu des Darmes stammen, sowie ähnlich auch die Kontroll-Fibroblasten, die einem simulierten inflammatorischen Milieu ausgesetzt wurden, ein reduziertes Migrationspotential, das wahrscheinlich durch die während der Entzündung freigesetzten Mediatoren hervorgerufen wurde.

Ziel dieses Experiment war herauszufinden, ob die Sekretion von PGE₂ durch CLPF nach Aktivierung erhöht ist. Das könnte eine mögliche parakrine und autokrine Ursache für das reduzierte Migrationspotential der Zellen während der Entzündung sein.

CLPF sezernierten spontan geringe Menge PGE₂ von etwa 5±5 ng/ml. Nach Stimulation mit IFN- γ oder IL-1 β kam es zu einem deutlichen Anstieg der PGE₂-Sekretion. Sowohl die mit IL- β stimulierten CLPF als auch die mit INF- γ stimulierten CLPF zeigten einen signifikanten PGE₂-Konzentrationsanstieg bis zu 45±5 ng/ml (Abbildung 4.14, p<0,05).

Die während der Entzündung freigesetzten Zytokine führten zu einer gesteigerten PGE₂ Sekretion der Zellen, die möglicherweise für ein reduziertes Migrationspotential der Zellen in den Wundarealen und somit für die gestörte Wundheilung verantwortlich ist.

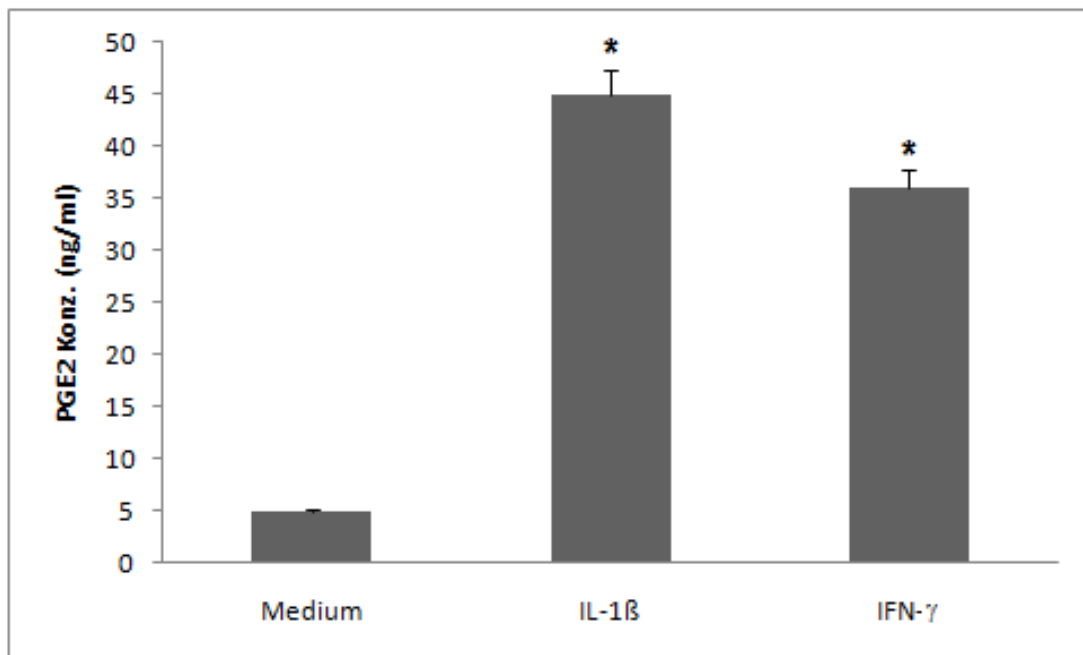


Abbildung 4.14

Quantitative Messung der PGE₂-Konzentration mittels ELISA. Die spontan sezernierte PGE₂-Konzentration von CLPF misst etwa 5±5 ng/ml. Nach einer Aktivierung der CLPF durch vorherige Stimulation mit IL-1 β und IFN- γ Zytokine wurde ein signifikanter PGE₂-Konzentrationsanstieg in den Zellüberständen von maximal 45±5 ng/ml gemessen (n=3, *p< 0,05)

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren die Etablierung eines Migrations-Assays für Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF), die Untersuchung des Einflusses verschiedener cAMP-erhöhenden-Substanzen unter anderen Prostaglandin E2 (PGE2) auf das Migrationsverhalten von CLPF und die nähere Charakterisierung wichtiger Schritte bzw. beteiligter Rezeptoren der Signaltransduktion der CLPF-Migration.

Für Fibronectin, ein von Fibroblasten sezerniertes Protein der extrazellulären Matrix, konnte eine promigratorische Wirkung nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine inhibitorische Wirkung von PGE2 auf die Fibronectin-induzierte Migration von CLPF nachgewiesen. Diese beruht auf eine Bindung an G-Protein gekoppelten EP-Rezeptoren und nachfolgendem Anstieg der intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration. Auch Forskolin und PDE-Hemmer erwiesen sich durch Modulation der intrazellulären cAMP als potente Inhibitoren für die CLPF-Migration. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bindung an EP-Rezeptoren und der Anstieg oder der Abfall der intrazellulären cAMP-Konzentration entscheidende Schritte in der Signaltransduktion der Fibronectin-vermittelten CLPF-Migration darstellen.

Die hemmende PGE2-Wirkung auf CLPF-Migration konnte durch Blockade der EP-Rezeptoren aufgehoben werden. Eine Vorbehandlung der CLPF mit den EP-Rezeptorblockern bewirkte eine signifikante Steigerung der PGE2 reduzierten CLPF-Migration. Zusätzlich konnte nach einer Vorstimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-1 β ein signifikanter PGE2-Konzentrationsanstieg in den CLPF-Überständen gemessen werden.

5.2 Diskussion der Zellmigration und Versuchsaufbau

Die Fähigkeit zur Migration stellt eine Schlüsselfunktion von Fibroblasten dar. Die Wanderung von Fibroblasten zum Ort der Gewebeverletzung ist eine Notwendigkeit für eine optimale Reparatur des Gewebeschadens (Postlethwaite et al., 1990; Rieder et al., 2007). Der genaue Mechanismus der Induktion und der Regulation der Migration der Fibroblasten aus dem umliegenden unverletzten Gewebe in Bereiche einer Gewebedestruktion oder eines Gewebedefektes ist bisher unzureichend verstanden.

Fibroblasten, Bindegewebszellen mesenchymalen Ursprungs, kommen im humanen Organismus in allen Organen vor und werden durch verschiedene Reize zur Migration angeregt, die z.B. in der Verletzung der Gewebe oder in der lokalen oder systemischen Freisetzung verschiedener Fibronectin abhängiger Faktoren der Darmmukosa wie platelet-derived growth factor PDGF-A, PDGF-B, Insulin growth factor-I (IGF-I) oder epithelial growth factor (EGF) bestehen (Leeb et al., 2002; 2004).

Für die Fibroblastenmigration tragen mehre essentielle Vorgänge bei. Zunächst entstehen in Arealen einer Gewebeschädigung durch die Gewebeabbauprodukte und die Sekretion verschiedener Moleküle bei der Entzündung chemotaktische Gradienten, die die Modulation von Fibroblasten verändern und deren Migration in das Wundgebiet induzieren.

Außerdem wird im Darm die Migration von mesenchymalen Zellen durch autokrine und parakrine Prozesse reguliert. Fibronectin, ein von Fibroblasten sezerniertes Protein der extrazellulären Matrix, ist dabei essentiell für die Induktion der CLPF Migration (Manabe et al., 1997; Leeb et al., 2004). Entscheidende Rolle spielen auch die Kommunikationsprozesse wie z.B. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, welche über die Adhäsionsmoleküle die Signale in das Zellinnere übertragen, das häufig mit einer Aktivierung oder Deaktivierung der entsprechenden Zellen verbunden ist (Goris R.J.H., 1997). Bei der Signalübertragung spielen auch die Fokalkontakte eine wichtige Rolle, die zusätzlich eine Verankerungsfunktion haben. Für die Zellmigration ist die Phosphorylierung von FAK (focal adhesion kinase) von entscheidender Bedeutung (Sieg et al., 2000).

Wichtige Voraussetzung zur Zellmigration besteht in der Motilität der Zellen, die über eine Umstrukturierung des Zytoskeletts aus Aktin und Myosin und eine Aktivierung der kontraktilen Mikrofilamente durch die Polymerisation von Aktin erreicht wird (Alberts,

1997d). Ein Hauptmodulator der Aktin-Myosin-Interaktion ist die leichte Myosinkette (MLC), die durch Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) phosphoryliert und aktiviert werden kann (Amano et al., 1996; Ramachandran et al., 2008). Die Regulation der MLC – Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Fibroblasten (Totsukawa et al., 2004).

Schließlich ist bei der Wundheilung sowie zur Gewebeneubildung eine gerichtete Migration von Zellen aus dem umgebenden unverwundeten Gewebe in die Wunde Voraussetzung. Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Migration von Zellen in Richtung steigender Konzentrationen eines Reizes und steht im Gegensatz zur Chemokinese, der ungerichteten Zellbewegung (Zigmond, 1973; Sakai et al., 1998). So kann Fibronectin einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Migration von CLPF hervorrufen, welche hauptsächlich chemotaktisch (gerichtete Migration), aber auch chemokinetisch sein kann (Leeb et al., 2002).

In der Literatur werden drei verschiedene Methoden zur Untersuchung der Zellmigration beschrieben. Die erste Methode wurde von Stephen Boyden im Jahr 1962 beschrieben und besteht in einem experimentellen Zwei-Kammer-System (Boyden S., 1962). Dort werden zwei mit einer Nährlösung gefüllte Kompartimente durch eine für die Zellen nur durch aktive Migration durchlässige Membran getrennt. Durch Zugabe des zu untersuchenden Faktors in das eine Kompartiment und der Zellen in das andere Kompartiment wird ein definierter Konzentrationsgradient geschaffen. Die Beobachtung erstreckt sich über einen Zeitraum von 4-5 Stunden, so dass einerseits Kurzzeiteffekte auf die Migration untersucht werden können, andererseits aber auch ein störender Einfluss einer möglichen Zell-Proliferation auf das Ergebnis ausgeschlossen wird.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung der mesenchymalen Zellmigration besteht im sogenannten Scratch wound closure assay. In einer konfluenten mesenchymalen Zellschicht wird unter sterilen Bedingungen eine Läsion definierter Größe gesetzt. Nach einer festgesetzten Zeit wird die Anzahl der aus dem noch intakten Zellverband in die Wunde ausgewanderten Zellen ausgezählt (Gotlieb et al., 1981). Dabei sind wie bei dem Zwei-Kammer-System nach Boyden sowohl Kurz- als auch Langzeiteffekte beobachtbar. Der ursprüngliche Ansatz des Scratch wound closure assays konnte hingegen nicht zwischen reiner Migration und zusätzlicher Proliferation differenzieren. Diesem Problem begegnete man mit neueren Versuchen, z.B. bei Endothelzellen, indem man die Proliferation durch Zugabe von Inhibitoren des Zellwachstums, wie z.B.

etwa Thymidin, unterband (Malinda et al., 1997). Dennoch ist diese Methode der modifizierten Boyden-Kammer unterlegen, da hier ein definierter Konzentrationsgradient nicht zu erhalten ist und es sich bei der beobachteten Migration daher eher um Effekte der Chemokinese, also der ungerichteten Zellbewegung, handelt, als um eine echte Chemotaxis.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Zwei-Kammer-System nach Boyden verwendet. Die modifizierte 48-Well-Boyden-Kammer ist inzwischen das meistgenutzte System zur Untersuchung von Migrationsvorgängen und ermöglicht eine quantitative Messung von Fibroblasten. Dennoch ist diese Kammer der herkömmlichen 1-Well-Boyden-Kammer überlegen, da hier weniger Zellen und Volumen von den zu testenden Substanzen eingesetzt werden können. Ein weiter Vorteil ist auch, dass insgesamt 48 Bestimmungen unter gleichen Versuchsbedingungen nebeneinander möglich sind. Diese Methode bezieht sich auf der Fähigkeit von Zellen, aktiv durch Filterporen einer bestimmten Größe zu wandern.

5.3 Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche hatten zum Ziel, den Einfluss von PGE₂ auf die CLPF-Migration zu analysieren und die Schritte der dabei beteiligten Signaltransduktion näher zu definieren.

5.3.1 Fibronectin induzierte Migration und Prostaglandin E₂ (PGE₂) - induzierte Hemmung der Migration von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF)

Fibronectin, ein extrazelluläres Glykoprotein, welches auch von Fibroblasten selbst sezerniert wird, stellt die Verbindung zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix her. Da bekannt war, dass Fibronectin bei den intestinalen Fibroblasten eine dosisabhängige Migration induzieren kann (Leeb et al., 2002), wurde der Einfluss von unterschiedlichen Fibronectinkonzentrationen allein und zusammen mit den unterschiedlichen Konzentrationen von PGE₂ auf CLPF getestet und verglichen. In den Migrations-Assays mit der modifizierten Boyden-Kammer konnten wir das Fibronectin

- dosisabhängige Migrationsverhalten von CLPF bestätigen und im Vergleich dazu ein signifikant reduziertes Migrationspotential der Zellen, nach einer konstanten Zugabe von PGE2 beobachten. Das wurde auch in einem weiteren Migrationsversuch gezeigt. Bei zunehmender PGE2-Konzentration und unveränderter Fibronektinkonzentration in der Bodenplatte bestätigte sich die konzentrationsabhängige Hemmung der Migration von CLPF, sowohl bei den Kontroll-Zellen als auch bei den Morbus Crohn-Zellen. Da es zu einem ähnlich reduzierten Migrationsmuster unter PGE2-Einfluss bei den Kontroll- Fibroblasten und bei den Morbus Crohn-Fibroblasten zustande kam, wurden die weiteren Versuche nur mit Kontroll-Fibroblasten (CLPF) durchgeführt.

In der *Checkerboard* Analyse konnten wir zeigen, dass Fibronektin zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Migration von CLPF führt, welche hauptsächlich chemotaktisch (gerichtete Migration), aber auch chemokinetisch sein kann. Die Intensität der Migration war von der Fibronektin-Konzentration in der Bodenplatte der modifizierten Boyden-Kammer abhängig, aber nicht unbedingt von einem Konzentrationsgradienten zwischen dem oberen und dem unteren Kammerkompartiment.

Bekannt ist, dass PGE2 eine hemmende Wirkung auf der Chemotaxis bei humanen fetalen Lungenfibroblasten zeigt (Kohyama et al., 2001; Kohyama et al., 2002b; Togo et al., 2009). Um zu untersuchen, ob PGE2 auch bei intestinalen Fibroblasten die Chemotaxis oder die Chemokinese oder beide hemmt, wurde nach der *Checkerboard* Analyse mit Fibronektin ein zweiter Versuch angeschlossen. Der Unterschied zwischen beiden Versuchen war nur die zusätzliche konstante Gabe von PGE2 in dem zweiten Versuch. Tatsächlich stellte sich eine sowohl chemotaktisch als auch chemokinetisch hemmende Wirkung von PGE2 auf die Migration von intestinalen CLPF heraus.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die durch Fibronektin induzierte Zellmigration ausreichend war, eine künstlich entstandene Wunde ohne Entzündung und ohne Einwirkung von entzündlichen Mediatoren, wieder zu verschließen. In einer Wundassay stellte sich heraus, dass nach Auskratzen eines Teils der Zellen in der konfluenten Zell *Monolayer*, die dadurch bedingte Zellschädigung nach einer Zugabe von Fibronektin in das Kulturmedium, durch induzierte Zellmigration, die „Wunde“ wieder verschließen konnte. Allerdings konnte diese Zellschädigung durch eine zusätzliche Gabe von PGE2 nicht mehr repariert werden. Die CLPF zeigten ohne die migrationsinduzierende Substanz – Fibronektin - mit und ohne - PGE2 ein sehr niedriges Migrationspotential. Das bewies wieder sowohl die Fibronektin induzierte

Fibroblastenmigration, als auch das reduzierte Migrationspotential der Zellen in Anwesenheit von PGE₂.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Fibronectin eine dosisabhängige sowohl chemotaktische (gerichtete Migration) als auch chemokinetische Zellmigration von CLPF induziert, die ausreichend ist, eine Zellschädigung zu reparieren. Im Vergleich dazu bewirkt PGE₂ eine Hemmung des chemotaktischen und chemokinetischen Migrationspotentials der CLPF und reduziert dosisabhängig die Zellmigration, so dass die CLPF unfähig sind eine Zellschädigung zu reparieren.

Bei chronischen Entzündungen kann es um den Gewebedefekt zu verschließen, zu einer mesenchymalen Zell-Anhäufung und dadurch vermehrten Kollagenbildung kommen (Graham, 1995). Diese kann zu einer Veränderung der Darmarchitektur, der Entstehung von Fibrose und somit zu einer Beeinträchtigung der Darmfunktion führen. Des Weiteren kommt es auch im Wundgebiet zu einer Anhäufung von entzündlichen Mediatoren, einschließlich Zytokinen und PGE₂. Es wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt, dass das Migrationspotential von intestinalen Fibroblasten bei Exposition bzw. nach Prä-Exposition mit proinflammatorischen Mediatoren reduziert ist (Leeb et al., 2003). Eine lokale Häufung von Fibroblasten mit einem verringerten Migrationspotential führt möglicherweise zu einer vermehrten Wundkontraktion, einer vermehrten Anhäufung von ECM und zur Entstehung einer Fibrose. Andererseits kann es durch die Wundheilungsstörungen und den fehlenden Verschluss der Wunden sekundär zu einem reduzierten Migrationspotential und damit zur Fistelbildung kommen.

Darüber hinaus wird auch in anderen Arbeiten über die hemmende Wirkung von PGE₂ auf die Zellmigration berichtet. PGE₂ zum Teil auch die PGD₂ können mehrere Fibroblastenfunktionen in der Lunge, unter anderem die Proliferation, die Migration und die Produktion von Kollagen Typ I hemmen, sowie die Sekretion anderer ECM-Moleküle senken (Fine et al., 1987, 1989; Skold et al., 1999; Kohyama et al., 2002a; Moore et al., 2005; Huang et al., 2007). Untersuchungsergebnisse zeigen eine erhöhte Konzentration von PGE₂ sowohl in vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen als auch in der intestinalen Mukosa von CED Patienten (Schmidt et al., 1996; Wiercinska-Drapalo et al., 1999). Die nähere Charakterisierung der an der CLPF-Migration beteiligten Mechanismen der PGE₂-Signaltransduktion kann zu der Verbesserung der Therapieansätze und der Vermeidung von Darmfibrose bei CED-Patienten beitragen.

5.3.2 Prostaglandin E2 (PGE2) und die EP-Rezeptoren

Wie schon erwähnt, ist eine Entzündung die charakteristische Antwort von biologischem Gewebe auf einen äußeren oder innerlich ausgelösten Reiz mit der Funktion, den Schädigungsreiz zu beseitigen oder zu reparieren. Sowohl bei Entzündungen als auch bei Fieber oder Schmerzen werden Prostaglandine freigesetzt. Diese werden normalerweise nicht in Zellen oder Geweben gespeichert, sondern auf unterschiedliche Stimuli aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure, synthetisiert und freigesetzt. Prostaglandine sind Substanzen mit hormonartiger Wirkung, die hauptsächlich das Gewebsareal beeinflussen, in dem sie produziert werden.

Die natürlich gebildeten Prostaglandine - unter anderen PGE2 - kommen nicht nur in allen Geweben - Ausnahme Erythrozyten - vor, sondern können auch auf verschiedene Organe und Organsysteme wirken. Daher ist der gezielte therapeutische Einsatz von Prostaglandinen erschwert und eine erwünschte Wirkung kann von vielen Nebenwirkungen begleitet sein. PGE2, bekannt als wichtiger Entzündungs- und Schmerzmediator, wirkt an den Zielzellen über die Bindung von G-Protein gekoppelten Prostaglandinrezeptoren, EP-Rezeptoren (Sugimoto et al., 2000; Guan et al., 2002; Ruwanpura et al., 2004). Vier EP-Rezeptoren - EP-1, EP-2, EP-3 und EP-4 - sind bekannt mit je unterschiedlichen Signaltransduktionswegen (Ushikubi et al., 1995; Narumiya et al., 1999; 2001; Breyer et al., 2001). Der EP-1 Rezeptor ist gekoppelt an die Mobilisierung intrazellulären Calciums, während EP-2 und EP-4 Rezeptoren zur Akkumulation von intrazellulärem cAMP führen. Demgegenüber inhibiert EP-3 die cAMP Akkumulation. Dies konnte in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden, so unter anderem beim Hamster (Kiriya et al., 1997), der Ratte (Boie et al., 1997), der Maus (Sugimoto et al., 2000) und dem Menschen (Narumiya et al., 1999). Außerdem ist auch bekannt, dass der EP-Rezeptor auf vielen verschiedenen Zelltypen präsentiert ist (Kabashima et al., 2002; Nitta et al., 2002; Guan et al., 2002; Ruwanpura et al., 2004; Moore et al., 2005; White et al., 2008; Odaka et al., 2009). Dies veranlasste uns dazu, die vier Subtypen von EP-Rezeptoren auch auf den CLPF nachzuweisen.

Es ist uns gelungen, mittels Western blot und mit der Hilfe von Antikörpern gegen diese Rezeptoren, die vier Subtypen von EP-Rezeptoren in CLPF zu visualisieren. Alle vier Subtypen von EP-Rezeptoren wurden von allen getesteten CLPF exprimiert.

Die biologische Wirkung von PGE₂ ist sehr unterschiedlich. Die zuvor beschriebenen EP-Rezeptoren können, aufgrund ihrer Wirkung z.B. auf die glatte Gefäßmuskulatur, in drei Gruppen eingeteilt werden. Die relaxierenden EP₂- und EP₄-Rezeptoren können eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur verursachen. Wohingegen der kontraktile EP₁-Rezeptor eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur induziert und der inhibitorische EP₃-Rezeptor eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur inhibiert (Breyer et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden für den EP₂-Rezeptor der spezifische EP₂-Rezeptor-Agonist Butaprost und für den EP₄-Rezeptor der selektive EP₄-Rezeptor-Agonist ONO-AE1-329 eingesetzt. Untersuchungsergebnisse zeigen, dass über den EP₂-Rezeptor Butaprost die ATP-induzierte Migration von Gliazellen reduziert wurde (Nagano et al., 2008). Zusätzlich hemmt PGE₂ durch die Bindung von Butaprost an den EP₂-Rezeptor und einen nachfolgenden cAMP-Anstieg die Proliferation und die Migration von primären Fibroblasten in der Lunge (White et al., 2005; Huang et al., 2007).

Über die Wirkung von PGE₂ auf die Migration intestinaler Fibroblasten sowie die Beurteilung der daran beteiligten Rezeptoren und Mechanismen, ist nur wenig bekannt. Um die genaue Wirkung von PGE₂ auf die Migration von CLPF zu erforschen, haben wir jeden von den vier verschiedenen Subtypen von EP-Rezeptoren einzeln in Migrations-Assay untersucht.

5.3.3 Prostaglandin E₂ (PGE₂) reduziert die Migration von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF) über die EP₂- und EP₄-Rezeptoren

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass PGE₂ für eine dosisabhängige Reduktion der Migration von intestinalen Fibroblasten verantwortlich ist. Aus diesen Ergebnissen und der schon bekannten erhöhten Konzentration von PGE₂ sowohl in vielen chronischen entzündlichen Erkrankungen als auch in der intestinalen Mukosa von CED Patienten (Schmidt et al., 1996; Wiercinska-Drapalo et al., 1999), kann PGE₂ als dominierendes Prostaglandin bei CED betrachtet werden.

Die vorgenannten Beobachtungen über die EP2- und EP4-Rezeptoren ließ vermuten, dass PGE2 die Hemmung der Migration von CLPF durch eine Bindung an EP2- und EP4-Rezeptoren vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte tatsächlich nicht nur eine konzentrationsabhängige Reduktion der Migration von CLPF durch Butaprost, sondern auch durch ONO-AE1-329 gezeigt werden.

Um diese Rezeptoren genauer zu untersuchen haben wir die Wirkung von EP2-Rezeptorblocker AH 6809 und EP4-Rezeptorblocker AH 23848 auf die CLPF getestet. Zu diesem Zweck wurden die CLPF 1 h vor dem Start der Migrations-Assay jeweils mit den beiden Rezeptor-Antagonisten präinkubiert. Nach 1 h wurden die EP2- und EP4-Rezeptor-Antagonisten getrennt und zusammen, und jeweils mit und ohne konstante PGE2 Konzentration in die Bodenplatte zugegeben. Durch die Blockierung von EP2- und EP4-Subtyp-Rezeptoren, war es möglich, die hemmende Wirkung von PGE2 auf die Migration von Kontroll-Fibroblasten aufzuheben. Bei einer Gabe beider Rezeptorblocker AH 6809 und AH 23848 zusammen mit PGE2 zeigten die Kontroll-Fibroblasten ein maximales Migrationsverhalten. Diese Beobachtungen bestätigten, dass PGE2 die hemmende Wirkung auf die Migration von CLPF durch eine Bindung an EP2- und EP4-Rezeptoren vermittelte. Auch die EP1- und EP3-Rezeptoren wurden getestet. Es wurde der kombinierte EP1- und EP3-Rezeptor-Agonist Sulproston eingesetzt. Wie bereits gezeigt, hatte Sulproston auf der Migration von Gliazellen und Monozyten keinen Einfluss (Panzer et al., 2004; Nagano et al., 2008), auch die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde nicht durch Sulproston beeinflusst (Zeng et al., 1996). Auf die Migration von CLPF zeigte Sulproston ebenso keine Wirkung.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass PGE2 über die spezifischen membrangebundenen G-Protein Rezeptoren - EP2 und EP4 - die Migration von intestinalen Fibroblasten reduziert. Diese Hemmung des Migrationspotentials konnte jedoch durch die Blockierung von EP2- und EP4-Subtyp-Rezeptoren aufgehoben werden. Die Signaltransduktion von PGE2 über beide EP2- und EP4-Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Vermutlich bedingt die erhöhte cAMP-Konzentration das reduzierte Migrationsverhalten von CLPF.

5.3.4 Anstieg der intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration reduziert das Migrationsverhalten von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF)

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen auch bei CLPF die vielfach beschriebene Reduktion der Zellmigration durch PGE₂ vermittelte über die EP₂- und EP₄-Rezeptoren. Beide Rezeptoren wurden an membrangebundene G-Proteine gekoppelt. Wie schon erwähnt führte eine Bindung an EP₂- oder EP₄-Rezeptoren zu einer Akkumulation von Adenylatcyclase und einer Steigerung der intrazellulären cAMP Konzentration (Zeng et al., 1996; Nagano et al., 2008).

cAMP, als „second messenger“ ist ein intrazellulärer Vermittler der Wirkung vieler Hormone. Eine erhöhte Konzentration von cAMP hat vielfältige Auswirkungen u. a. auf die Aktivität von Immun- und Nicht-Immunzellen. Die Hemmung der Zellmigration - bedingt durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration - wurde bereits bei verschiedenen Zellen nachgewiesen (Goncharova et al., 2003; Chen et al., 2008), jedoch noch nicht bei den intestinalen Fibroblasten.

Ein bekannter direkter Stimulator der Adenylatcyclase ist Forskolin. In den humanen fetalen Lungenfibroblasten führte Forskolin zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveau und zur Hemmung der Chemotaxis (Kohyama et al., 2001). Forskolin scheint auch einen Einfluss auf die Kontraktionen von Hautfibroblasten bei der Wundheilung zu haben (Sandulache et al., 2006). Untersuchungsergebnisse zeigen, dass diese Substanz fähig ist, die ATP induzierte Migration von Gliazellen sowie die chemotaktische Migration von Lungenfibroblasten zu reduzieren (Kohyama et al., 2001; Nagano et al., 2008). Bekannt ist auch, dass Forskolin in vielen Zellen außer zu einem cAMP-Anstieg auch zu einer Dephosphorylierung von MLC (Myosin-Leichte-Kette) führen kann (Ramachandran et al., 2008). pMLC (phosphorylierte Myosin-Leichte-Kette) spielt eine wichtige Rolle für die Aktin-Kontraktionen bei der Zellmigration (Ren et al., 2004; Ramachandran et al., 2008), ein wichtiger Schritt beim Wundverschluss. Auch in den endothelialen Zellen der Kornea führte Forskolin zu einer Suppression von der MLC Phosphorylierung (Satpathy et al., 2005).

In unseren Untersuchungen erhöhte Forskolin durch die Stimulation der Adenylatcyclase den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dadurch konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Migration auch bei CLPF beobachtet werden.

Die Zellschädigung, bedingt durch das Auskratzen eines Teils der Zellen in der konfluenten Zell-Monolayer, konnte nach einer Zugabe von Fibronectin in das Kulturmedium und die dadurch induzierte Zellmigration, die „Wunde“ wieder verschließen. Allerdings konnte, ähnlich wie bei PGE₂, diese Zellschädigung durch eine zusätzliche Gabe von Forskolin nicht mehr repariert werden. Das bestätigte wieder das reduzierte Migrationspotential der CLPF in der Anwesenheit von Forskolin, möglicherweise bedingt durch den intrazellulären cAMP-Anstieg. Das wäre auch eine mögliche Mechanismus-Erklärung für die insuffiziente Wundheilung bei CED Patienten: durch den intrazellulären cAMP-Anstieg wird auch die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) nicht aktiviert, folglich werden auch die leichten Myosinketten (MLC) nicht phosphoryliert. Letztendlich wird die zur Zellkontraktion benötigte Energie nicht geliefert, es findet keine Reorganisation des Aktin-Myosin-Zytoskeletts statt und die Zelle kann sich nicht bewegen.

Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration wird durch die Aktivität der Phosphodiesterase (PDE) begrenzt, die cAMP zu 5'Adenosin-Monophosphat (AMP) abbaut. Durch die Hemmung der Phosphodiesterasen wird die Hydrolyse von cAMP verhindert und der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt. Außerdem bewirkt ein langfristig erhöhter cAMP-Spiegel durch die Erhöhung der Genexpression eine Aktivitätssteigerung der PDE Typ 4 (Torphy et al., 1992). Zusätzlich kann eine Stimulation von Immunzellen zu einer PDE Typ 4 Aktivierung führen (Valette et al., 1990; Okonogi et al., 1991).

PDE Typ 4 Hemmer ist cAMP spezifisch und ist neben den anderen Isoenzymen in verschiedenen Zellarten, unter anderem auch in humanen fetalen Lungenfibroblasten nachweisbar (Torphy et al., 1998; Kohyama et al., 2002b; Togo et al., 2009). In Monozyten und Makrophagen kommt es 1. zur Reduktion der Sekretion von Zytokinen wie IL-2, IL-5, IL-13, IFN- γ und TNF- α , 2. zur Reduktion der Proliferation von T-Helferzellen (Essayan et al., 1997; Dinter et al., 2000) und 3. zur Induktion von IL-1 β (Semmler et al., 1993). Der unspezifische PDF-Inhibitor Pentoxyphyllin zeigte *in vitro* in mesenchymalen Zellen renalen Ursprungs zum einen antiproliferative Effekte und zum anderen eine Suppression der Synthese und der Proliferation von ECM, wie z.B. Kollagen I und III sowie Fibronectin (Tsai et al., 1995; Lin et al., 2004; Lin et al., 2005). In Hautfibroblasten sind ebenfalls die Proliferation und die Synthese von Kollagen und Fibronectin reduziert und die Aktivität der Kollagenase erhöht (Berman et al., 1989). Ähnliche Ergebnisse existieren von Myofibroblasten der Leber und von

Fibroblasten von Patienten mit Morbus Basedow (Chang et al., 1993; Windmeier et al., 1996). In humanen fetalen Lungenfibroblasten verminderte die spezifische Hemmung der PDE Typ-4 die Chemotaxis und die Fähigkeit zur Kontraktion von Kollagengelen (Kohyama et al., 2002b). Dieser Effekt wird von dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β über eine erhöhte PGE₂-Sekretion und Induktion des cAMP moduliert. Die antiinflammatorische Potenz des PDE-Inhibitors Pentoxyphyllin zeigt sich in einer geringen Synthese proinflammatorischer Zytokine und einer geringeren Akkumulation von Entzündungszellen. Außerdem wurden auch positiven Effekte auf die Fibroseentwicklung in einem Tiermodell für Lungentransplantationen beobachtet, hier wurde eine geringe Proliferation von Fibroblasten gezeigt (Schade et al., 2002). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die meisten Effekte der PDE Typ-4 Inhibitoren durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung vermittelt werden. Somit scheint die cAMP-Erhöhung durch PDE-Hemmer eine essentielle Rolle zu spielen. Jedoch kann die hemmende Wirkung von PDE-Inhibitoren durch eine Hemmung der Cyclooxygenase mittels Indomethacin reduziert werden (Kohyama et al., 2002c). Die Wirkung auf die mesenchymalen Zellen ist bisher nur unvollständig untersucht.

Wir haben die Wirkung der beiden PDE-Inhibitoren Pentoxyphyllin und Rolipram auf die CLPF-Migration untersucht. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die beiden PDE-Hemmer Pentoxyphyllin und Rolipram zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Migration von CLPF führen. Nach einer zusätzlichen Gabe von PGE₂ zusammen entweder mit Rolipram oder mit Pentoxyphyllin, konnte eine noch stärkere Migrationshemmung bei den CLPF beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die vielfach beschriebene Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch eine PDE-Hemmung.

Die entzündungshemmende Wirkung der Phosphodiesterase-Inhibitoren macht den Einsatz dieser Substanzklasse bei CED sinnvoll. Bei 16 Patienten mit steroidabhängigem Morbus Crohn wurde bei viermaliger täglicher Applikation von Pentoxyphyllin keine Besserung der klinischen oder histologischen Zeichen der Colitis erreicht (Bauditz et al., 1997). Mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in vitro sehr hohe Konzentrationen eines unspezifischen PDE-Inhibitors notwendig sind, um die TNF- α Produktion zu senken (Reimund et al., 1997). Die hohe Potenz und Spezifität von Rolipram machen die Möglichkeit einer wirksamen Anwendung bei niedrigen Dosierungen wahrscheinlich.

Nachdem schon gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration zu einer Hemmung der Fibroblastenmigration führte, wurde noch die intrazelluläre cAMP-Konzentration von CLPF, nach einer vorheriger Inkubation der Zellen mit PGE₂, mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse konnten nach einer Inkubation von CLPF mit PGE₂ eine signifikante Steigerung des intrazellulären cAMP-Niveaus bestätigen. Im Gegensatz dazu, wurde nach einer Vorinkubation von CLPF mit den EP₂- und EP₄-Rezeptor-Antagonisten, AH 6809 und AH 23848, eine deutlich niedrige Konzentration von intrazellulärem cAMP gemessen. Eine vorherige Inkubation mit beiden EP₂- und EP₄-Rezeptor-Antagonisten zusammen, führte trotz des PGE₂-Einflusses nur zu einer minimalen Steigerung der cAMP-Konzentration.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass ein intrazellulärer cAMP-Anstieg, vermittelt durch PGE₂, durch die direkte Aktivierung der Adenylatcyclase oder durch die Hemmung der Phosphodiesterasen, zu einer Hemmung der Migration von CLPF führt.

5.3.5 Wachstumsfaktoren, Zytokine und Prostaglandin E₂

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von PGE₂ auf die Migration von CLPF zu untersuchen und die dabei beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion näher zu definieren. In den durchgeführten Migrationsversuchen erwies sich PGE₂ als ein Inhibitor der CLPF-Migration. Da 1. bei der Wundheilung nicht nur die Migration sondern auch die Proliferation von Fibroblasten und deren Produktion von extrazellulären Matrix Proteinen (ECM) eine entscheidende Rolle spielen (Dale et al., 1997) und 2. während des Entzündungsprozesses neben PGE₂ auch andere Entzündungsmediatoren sezerniert werden, spielt möglicherweise das Zusammenwirken von PGE₂ und Zytokinen auf die vorgenannten CLPF-Fähigkeiten bei der Wundheilung eine wichtige Rolle.

Wie schon erwähnt, werden bei der Entzündung PGE₂, aber auch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine - wie z.B. platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β , INF- γ und TNF- α freigesetzt, welche die Fibroblastenfunktion modulieren (McGarity et al., 1976). Neben den Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind bei aktiver Entzündung in der Darmmukosa eine erhöhte Anzahl von

Entzündungszellen wie eosinophile Granulozyten, Mastzellen und T-Zellen zu finden. Vermutlich kann ein direkter Zell-Zell Kontakt zwischen den Fibroblasten und den entzündlichen Zellen, die Fibroblasten aktivieren und dadurch deren Proliferation in vitro stimulieren (Berton et al., 2000; Xu et al., 2004). Im inflammatorischen Milieu des Darmes ändert sich der Phänotyp der intestinalen Fibroblasten. Das Migrationspotential von Fibroblasten ist bei Exposition bzw. nach Prä-Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen reduziert (Leeb et al., 2003). Im Gegensatz dazu sind die lokale Proliferation und die Synthese von ECM gesteigert, ohne signifikante Änderung ihrer Zytokin-Expression. Eine lokale Häufung von Fibroblasten mit einem verringerten Migrationspotential und unveränderter Zytokin-Expression führt möglicherweise zu einer vermehrten Wundkontraktion, einer vermehrten Anhäufung von ECM und zur Entstehung einer Fibrose. Andererseits kann PGE2 neben der schon nachgewiesenen Reduzierung der Zellmigration in der Wunde auch eine Hemmung der Fibroblasten-Proliferation und eine Kontraktion der ECM bewirken (Kohyama et al., 2001). Wie schon erwähnt, wird PGE2 in hoher Konzentration bei vielen entzündlichen Erkrankungen und auch in der intestinalen Mukosa von Patienten mit CED gefunden (Schmidt et al., 1996; Wiercinska-Drapalo et al., 1999). Das könnte eine mögliche Erklärung für die schlechte Wundheilung bei CED sein.

Dies veranlasste uns dazu, mittels ELISA eine quantitative Messung der PGE2-Konzentration in den Zellüberständen von Kontroll-CLPF, die aus dem normalen, nicht entzündeten Milieu des Darmes stammen, sowie von Kontroll-Fibroblasten, die vorher einem „inflammatorischen Milieu“ ausgesetzt wurden, durchzuführen. Die Ergebnisse dieser Messung wurden danach miteinander verglichen. Interessant war auch, zu testen, ob sich eine Veränderung der PGE2-Konzentration in den CLPF-Überstände durch Zytokine induzieren lässt, was letztendlich eine Erklärung dafür geben könnte, dass die immer wiederkehrenden und langandauernden Entzündungsprozesse bei CED einen PGE2-Anstieg in den CLPF induzieren, der durch einen intrazellulären cAMP-Anstieg wiederum zu einem reduzierten Migrationspotential der CLPF führt, welches dann eine insuffiziente Wundheilung bewirken kann.

Bei der quantitativen Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels ELISA konnte - bei normalen Umgebungsverhältnissen - in CLPF eine intrazelluläre cAMP-Konzentration gemessen werden. Dies lässt vermuten, dass die CLPF spontan geringe Menge PGE2 sezernieren. Wahrscheinlich führte auch ein unterschiedlich hohes Niveau

der PGE2 Sekretion durch die Fibroblasten zu einer autokrinen Modifizierung der CLPF Wanderung.

Vor der Versuchsdurchführung wurden die Kontroll-Fibroblasten zuerst 1 Stunde mit IL-1 β und IFN- γ Zytokinen stimuliert. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IFN- γ sind entzündliche Mediatoren, deren mRNA- und Protein-Transkripte bei CED vermehrt exprimiert sind (Stallmach et al., 1992; Autschbach et al., 2002). Ein hohes Level an IL-1 β steigert die Wahrscheinlichkeit eines wiederholten Ausbruches der CED. Sowohl IL-1 β als auch IFN- γ spielen eine wichtige Rolle bei der Fibroblastenmigration (Brouty-Boye et al., 1980; Adelman-Grill et al., 1987). Untersuchungen bei CLPF, die aus der gesunden Mukosa isoliert wurden, zeigen nach einer Inkubation der CLPF mit IFN- γ eine signifikant reduzierte Migration als unbehandelte CLPF (Leeb et al., 2002).

Uns ist es gelungen, zu zeigen, dass die CLPF-Überstände - nach einer Vorinkubation der CLPF sowohl mit IL-1 β als auch mit INF- γ – einen PGE2-Konzentrationsanstieg aufwiesen. Bei den mit INF- γ oder IL-1 β stimulierten CLPF wurde im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten ein signifikanter Anstieg der PGE2-Sekretion gemessen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es möglich war, durch Stimulation von CLPF mit IL-1 β oder INF- γ ein entzündliches Milieu, das bei CED besteht, zu initiieren. Nach einer Zugabe von IL-1 β oder INF- γ zum Medium zeigten diese CLPF im Vergleich zu Kontroll-CLPF einen signifikant erhöhten PGE2-Gehalt. Eine mögliche Erklärung für die gestörte Wundheilung scheint das reduzierte Migrationspotential der Zellen in den Wundarealen zu sein. Damit konnte dieser Arbeit darauf hinweisen, dass wahrscheinlich während der Entzündung freigesetzte Zytokine die CLPF stimulieren, die dadurch vermehrt PGE2 sezernieren, was letztendlich zu einer Hemmung der Zellmigration führt.

5.4 Prostaglandin E2 (PGE2) und die Migration von primären intestinalen Darmfibroblasten (CLPF)

Eine spezifische medikamentöse Therapie mit dem Ziel der Heilung ist bei CED bislang nicht bekannt. Die bestehenden therapeutischen Maßnahmen führen in der Regel zu

einer symptomatischen Behandlung der akuten Entzündung und Verlängerung der Remissionsphase. In vielen Fällen wird die Therapie auf Grund schwerer Nebenwirkungen abgebrochen. Die Rezidivrate ist weiterhin hoch und es treten therapierefraktäre Verläufe auf. In den meisten Fällen kommt es auch durch die überschießende Wundheilung zur Komplikationen, wie z.B. Entstehung einer Darmfibrose, die oft zu Beeinträchtigung der Darmfunktion führen kann. Aus diesen Gründen besteht bei CED ein dringender Bedarf an neuen spezifischeren Therapiemöglichkeiten mit reduzierten Nebenwirkungen. Dafür müssen die Mechanismen der Zellmigration aus dem unverletzten Gewebe in Bereiche einer Gewebeschädigung und die Schritte zur Entstehung von Komplikationen - wie Fisteln oder Stenosen - näher definiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PGE₂ auf die CLPF-Migration genauer untersucht. Zum ersten Mal werden die beteiligten EP-Rezeptoren der PGE₂-Signaltransduktion der Fibroblastenmigration näher charakterisiert (Abbildung 5.1). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen wichtige Schritte und mögliche Mechanismus-Erklärung für die insuffiziente Wundheilung bei CED Patienten dar. Das soll zur Erläuterung weiterer Mechanismen der Zellmigration und zu den neuen therapeutischen Effekten beitragen.

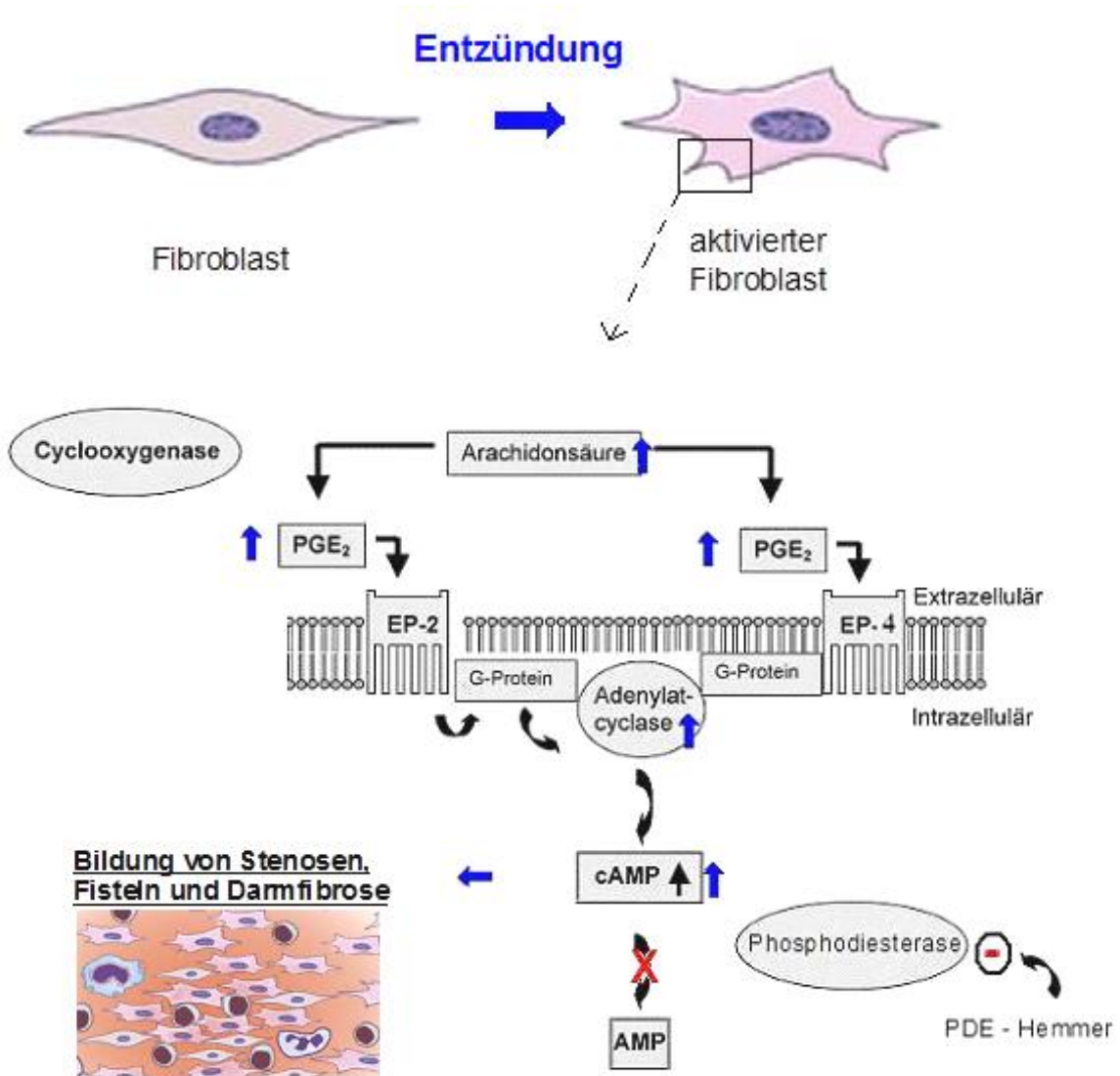


Abbildung 5.1

Schematische Darstellung der Rezeptoren von aktivierten Fibroblasten und PGE₂-Signaltransduktion bei der Entzündung. Während der Entzündung führt die erhöhte PGE₂-Konzentration zu einer erhöhten cAMP-Konzentration und letztendlich zu einer Migrationshemmung der CLPF. Bei CED kommt es durch die immer wiederkehrende Entzündung zur Bildung von Stenosen, Fisteln und Darmfibrose.

6 Zusammenfassung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind eine multifaktoriell bedingte Störung, die durch chronischen Schaden der intestinalen Epithelzellschicht und des tiefer liegenden Bindegewebes charakterisiert ist. Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa ist vielschichtig und bisher noch weitgehend unbekannt. Die Migration und die Proliferation von Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) sowie deren Produktion von extrazellulärer Matrix spielen bei der Wundheilung im Verlauf der Entzündung und bei der Fistel- und Strikturentstehung eine entscheidende Rolle. Eine spezifische medikamentöse Therapie ist weder für CED noch für deren Komplikationen bekannt. Deswegen sind neue Therapiemöglichkeiten zur medikamentösen Prävention oder zur Behandlung von Komplikationen wie Fisteln oder Stenosen und zur Verbesserung der postoperativen Wundheilung bei CED dringend notwendig. Dazu müssen die Mechanismen, die bei der Wundheilung eine Rolle spielen, untersucht und verstanden werden. Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die CLPF aus der gesunden Darmmukosa und die CLPF von Patienten mit Morbus Crohn unterschiedlich stark migrieren. CLPF, die aus entzündlicher Darmmukosa von Morbus Crohn-Patienten stammten, migrierten weniger als CLPF, die aus der gesunden Darmmukosa von Kontrollpatienten isoliert wurden. Möglicherweise wird die Migration von CLPF durch verschiedene Faktoren moduliert, die während der Wundheilungs- und Entzündungsprozessen, von intestinalen Fibroblasten, Myofibroblasten und anderen Zellen verstärkt sezerniert werden können. Bei den Entzündungsprozessen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt die Arachidonsäure als Vorläuferin von Prostanoiden und Eicosanoiden, unter denen besonders Prostaglandin E₂, eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurden primär intestinale CLPF von Kontroll-Patienten isoliert, kultiviert und immunhistochemisch charakterisiert. Anschließend wurden Migrations-Assays in der modifizierten 48-Boyden-Kammer durchgeführt, um das Migrationsverhalten der Darmfibroblasten zu untersuchen.

Um den Einfluss der Extrazellulärmatrix-Komponenten, wie z.B. Fibronectin und des Gewebehormons Prostaglandin E₂ auf intestinale CLPF zu untersuchen, wurden Migrations-Assays mit steigender Konzentrationen von Fibronectin und PGE₂

durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Migration von CLPF mit steigender Fibronectin-Konzentration zunimmt. Im Gegensatz dazu wurde die Migration von CLPF mit zunehmender PGE2 Konzentration signifikant und dosisabhängig reduziert.

Die *Checkerboard*-Analyse zeigte, dass Fibronectin sowohl die Chemotaxis (gerichtete Migration), als auch die Chemokinese induzierte. Es konnte bei der *Checkerboard*-Analyse nach einer Zugabe von PGE2 eine dosisabhängige Hemmung, sowohl der Chemotaxis als auch der Chemokinese beobachtet werden.

Durch weitere Migrations-Assays wurde der genaue Wirkungsmechanismus von PGE2 auf die CLPF untersucht. Die Versuche zeigten, dass PGE2 über die spezifischen membrangebundenen G-Protein Rezeptoren - EP2 und EP4 - die Migration von intestinalen CLPF signifikant reduziert. Diese Hemmung des Migrationspotentials konnte durch die Blockierung von EP2- und EP4-Subtyp Rezeptoren aufgehoben werden. Die Signaltransduktion von PGE2 über die EP2- und EP4-Rezeptoren führt durch die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Danach wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration quantitativ mittels ELISA gemessen. Nach einer vorherigen Inkubation der Zellen mit PGE2 konnte eine signifikante Steigerung des intrazellulären cAMP-Niveaus bestätigt werden. Hingegen wurde nach einer Vorinkubation der CLPF mit EP2- und EP4-Rezeptor-Antagonisten, trotz des PGE2-Einflusses, eine minimale Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration gemessen. Das bestätigte noch einmal die Signaltransduktion von PGE2 auf die CLPF durch den Anstieg des intrazellulären cAMP.

Des Weiteren wurde die cAMP-Wirkung auf die CLPF weiter untersucht. In Migrations-Assays mit steigender Konzentration des direkten Stimulators der Adenylatcyclase Forskolin, konnte eine dosisabhängige signifikante Hemmung der Migration von CLPF, bedingt durch den intrazellulären cAMP-Anstieg, beobachtet werden. Auch die beiden getesteten Phosphodiesterase-Hemmer Pentoxyphyllin und Rolipram zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Migration von CLPF, diese wurde durch eine Zugabe von PGE2 noch stärker gehemmt, ebenfalls durch die Steigerung des cAMP-Niveaus.

Als letztes wurde mittels ELISA eine quantitative Messung der PGE2-Konzentration in Zellüberständen von Kontroll-CLPF, die aus dem gesunden Milieu des Darmes stammen, sowie von CLPF, die vorher einem „inflammatorischen Milieu“ ausgesetzt waren, durchgeführt. Als Ergebnis wurde nach einer Aktivierung der CLPF durch vorherige Stimulation mit den Zytokinen - IL-1 β und IFN- γ - ein signifikanter

PGE₂-Konzentrationsanstieg - im Vergleich zu Kontroll- CLPF - in den Zellüberständen gemessen.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, neue Mechanismen und Faktoren aufzudecken, die die Migration von intestinalen CLPF beeinflussen. Das Migrationsverhalten von CLPF korrelierte mit der Fibronektinkonzentration. PGE₂ führte über die spezifischen membrangebundenen G-Protein Rezeptoren - EP₂ und EP₄ - zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, welche das Migrationspotential von intestinalen CLPF signifikant reduziert. CLPF, die aus dem „inflammatorischen Milieu“ stammten, zeigten eine signifikant erhöhte PGE₂-Sekretion.

7 Ausblick

Bei der Wundheilung spielt die Migration von intestinalen Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Die Mechanismen, die - vermittelt durch PGE2 und eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration - zu einer reduzierten Migration von CLPF führen, sind in dieser Arbeit definiert. Die Migration der Fibroblasten hängt von mehreren verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der Polymerisationsvorgänge von zytoskelettalen Filamenten. Der Effekt eines oder aller dieser Prozesse könnte auf eine verminderte Migrationrate hinauslaufen. Folgende Prozesse, Mechanismen und/oder Faktoren sollten genauer analysiert werden, um den Zusammenhängen der CED auf die Spur zu kommen.

- Die reduzierte Expression von α -SMA und F-Aktin aus den intestinalen Fibroblasten, wäre auch ein möglicher Mechanismus, der zu reduzierter Migration führen konnte. Als Bestandteil des Zytoskeletts ist Aktin ein wichtiges Strukturprotein. In der Zelle bildet Aktin dynamische Filamente, die so genannte Aktin-Filamente. Diese Filamente dienen der Stabilisierung der äußeren Zellform, ermöglichen intrazelluläre Transporte, nehmen am Fokalkontakt und der Zellmigration teil, und sind wichtiger zentraler Bestandteil des Kontraktionsapparats der Muskeln.

→ Hier ist eine Messung von α -SMA und F-Aktin mittels Western Blot oder immunocytochemisch möglich.

- Die Phosphorylierung von MLC (Myosin-Leichte-Kette) spielt eine wichtige Rolle für die Aktin-Kontraktionen bei der Zellmigration (Ren et al., 2004; Ramachandran et al., 2008). Außer einer Erhöhung der intrazellulären cAMP, konnte Forskolin laut Studien, bei einer Zellexposition zu einer reduzierten Phosphorylierung von MLC (Myosin light Chain) führen (Satpathy et al., 2005; Ramachandran et al., 2008). Vermutlich führt das erhöhte cAMP-Niveau zu einer Deaktivierung der MLCK (Myosin Light Chain Kinase) und nachfolgender Suppression der MLC Phosphorylierung.

→ Mittels Immunofluoreszenz/konfokaler Mikroskopie könnte die Lokalisation von Myosin IIA, sowie MLC und dessen mono- (p-MLC) und diphosphorylierter (pp-MLC) Form bestimmt werden.

→ Western Blots für MLC, p-MLC und pp-MLC könnten zur Bestimmung der Aktivierungszustände des Myosin IIA verwendet werden.

Dies könnte ein möglicher Mechanismus für den insuffizienten Wundverschluss im Darm bei CED sein.

8 Literaturverzeichnis

- Achkar JP, Dassopoulos T, Silverberg MS, Tuvlin JA, Duerr RH, Brant SR, Siminovitch K, Reddy D, Datta LW, Bayless TM, Zhang L, Barmada MM, Rioux JD, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Cohen Z, Yang H, Bromfield GP, Schumm P, Hanauer SB, Cho JH, Nicolae DL. Phenotype-stratified genetic linkage study demonstrates that IBD2 is an extensive ulcerative colitis locus. *Am.J.Gastroenterol.* 2006; 101 (3):572-580
- Adelmann-Grill BC, Hein R, Wach F, Krieg T. Inhibition of fibroblast chemotaxis by recombinant human interferon gamma and interferon alpha. *J.Cell Physiol* 1987; 130 (2):270-275
- Adler G. *M.Crohn, Colitis ulcerosa.* Springer; Berlin – Heidelberg – New York., 1996
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Molekularbiologie der Zelle: Viele Zellen strecken von ihrem Leitsaum dynamische Actin-haltige Mikroskipes und Lamellipodien aus.* Weinheim: VCH, 1997a; S. 977-978
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J. D. *Intermediärfilamente.* In *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, 1997b; S. 941-948
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Molekularbiologie der Zelle: Der Leitsaum beweglicher Zellen setzt die Polymerisation im Gang.* Weinheim: VCH, 1997c; S. 978-979
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Molekularbiologie der Zelle: Fokalekontakte ermöglichen es den Actin-Filamenten, an der Unterlage zu ziehen.* Weinheim: VCH, 1997d; S.992-994
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *In Molekularbiologie der Zelle: Die extrazelluläre Matrix bei Tieren.* VCH, 1997e; S. 1148-1175
- Albini A, Pontz B, Pulz M, Allavena G, Mensing H, Muller PK. Decline of fibroblast chemotaxis with age of donor and cell passage number. *Coll.Relat Res.* 1988; 8 (1):23-37
- Alon R, Cahalon L, Hershkovic R, Elbaz D, Reizis B, Wallach D, Akiyama SK, Yamada KM, Lider O. TNF-alpha binds to the N-terminal domain of fibronectin and augments the beta 1-integrin-mediated adhesion of CD4+ T lymphocytes to the glycoprotein. *J.Immunol.* 1994; 152 (3):1304-1313
- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, Lacy AM, Pique JM, Yague J, Panes J. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann.Surg.* 2005; 242 (5):693-700

- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi, K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J.Biol.Chem.* 1996; 271(34): 20246- 20249
- Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344 (11):808-814
- Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch.* 2002; 441 (5):500-513
- Bamba S, Lee CY, Brittan M, Preston SL, Direkze NC, Poulosom R, Alison MR, Wright NA, Otto WR. Bone marrow transplantation ameliorates pathology in interleukin-10 knockout colitic mice. *J.Pathol.* 2006; 209 (2):265-273
- Bashour Mounir. Inflammatory Bowel Disease. *eMedicine Journal.* 2009.
<http://emedicine.medscape.com/article/1215328-overview>
- Bauditz J, Haemling J, Ortner M, Lochs H, Raedler A, Schreiber S. Treatment with tumour necrosis factor inhibitor oxpentifylline does not improve corticosteroid dependent chronic active Crohn's disease. *Gut* 1997; 40 (4):470-474
- Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106(8): 123–133
- Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995; 75 (4):725-748
- Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 2007; 87 (9):858-870
- Berman B, Duncan MR. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. *J.Invest Dermatol.* 1989; 92 (4):605-610
- Berton A, Levi-Schaffer F, Emonard H, Garbuzenko E, Gillery P, Maquart FX. Activation of fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. *Clin.Exp.Allergy* 2000; 30 (4):485-492
- Beutler B. Autoimmunity and apoptosis: the Crohn's connection. *Immunity.* 2001; 15 (1):5-14
- Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschaefer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur.J.Pharmacol.* 1997; 340 (2-3):227-241
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J.Exp.Med.* 1962; 115:453-466

- Braegger CP, MacDonald TT. Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann.Allergy* 1994; 72 (2):135-141
- Brenmoehl J. Bedeutung von Fibronectin Spleißvarianten für die Migration primärer Colon lamina propria Fibroblasten bei unterschiedlichen klinischen Subtypen von Morbus Crohn 2007; S.17, 36
- Breyer MD and Breyer RM. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J PhysiolRenal Physiol* 2000; 279: F12-23
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, and Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 661-690
- Brittan M, Chance V, Elia G, Poulsom R, Alison MR, MacDonald TT, Wright NA. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 128 (7):1984-1995
- Brochhausen C. Neue Targets für das Tissue Engineering von Gelenkknorpel aus der Wachstumsfuge? 2005; <http://www-klinik.uni-mainz.de/Pathologie>
- Brouty-Boye D, Zetter BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 1980; 208 (4443):516-518
- Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2007; 102 (2):439-448
- Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 1998; 4 (4):285-290
- Chang CC, Chang TC, Kao SC, Kuo YF, Chien LF. Pentoxifylline inhibits the proliferation and glycosaminoglycan synthesis of cultured fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial myxoedema. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 1993; 129 (4):322-327
- Chen L, Zhang JJ, Huang XY. cAMP inhibits cell migration by interfering with Rac-induced lamellipodium formation. *J.Biol.Chem.* 2008; 283 (20):13799-13805
- Chowdhury A, Fukuda R, Fukumoto S. Growth factor mRNA expression in normal colorectal mucosa and in uninvolved mucosa from ulcerative colitis patients. *J.Gastroenterol.* 1996; 31 (3):353-360
- DAKO. Produktbeschreibung von anti- α -smooth muscle Aktin Antikörper Klon 1A4. 1995
- DAKO. Produktbeschreibung von anti-Vimentin Antikörper Klon Vim 3B4. 1997
- Dale PD, Sherratt JA, Maini PK. Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult dermal wound healing. *Bull.Math.Biol.* 1997; 59 (6):1077-1100

- Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR, Werner S. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 1998; 30 (8):909-922
- Denise Paulin, Zhenlin Li. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research.* 2004; 301:1-7
- Dignass AU, Sturm A. Peptide growth factors in the intestine. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 2001; 13 (7):763-770
- Dinter H. Phosphodiesterase type 4 inhibitors: potential in the treatment of multiple sclerosis? *BioDrugs.* 2000; 13 (2):87-94
- Edwards CN, Griffith SG, Hennis AJ, Hambleton IR. Inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and disease characteristics in Barbados, West Indies. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2008; 14 (10): 1419-1424
- Edward V. Loftus Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004; 126 (6):1504-1517
- Essayan DM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Huang SK. Differential regulation of human antigen-specific Th1 and Th2 lymphocyte responses by isozyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997; 282 (1):505-512
- Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97 (7):3702-3707
- Fine A, Goldstein RH. The effect of PGE2 on the activation of quiescent lung fibroblasts. *Prostaglandins* 1987; 33 (6):903-913
- Fine A, Poliks CF, Donahue LP, Smith BD, Goldstein RH. The differential effect of prostaglandin E2 on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 1989; 264 (29):16988-16991
- Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ.Res.* 2002; 90 (11):1189-1196
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003; 314 (1):15-23
- Goebell H.S. et al. Morbus Crohn: Klinische Erkrankungsmuster in Beziehung zur Lokalisation. Eine prospektive Analyse an 300 Patienten. *Med. Klein.* 1997; 82:1

- Goncharova EA, Billington CK, Irani C, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Penn RB, Krymskaya VP, Panettieri RA, Jr. Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2003; 29 (1):19-27
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.* 2005; 5 (12):953-964
- Goris RJH. Die Wundheilung: Ein kontrollierter Entzündungsprozess. In *Aspekte im Gespräch – Extracta aus Wissenschaft und Klinik 7*, Biotest Pharma GmbH. 1997; S 8-16
- Gotlieb A I, Spector W. Migration into an in vitro experimental wound: a comparison of porcine aortic endothelial and smooth muscle cells and the effect of culture irradiation. *Am.J.Pathol.* 1981; 103 (2):271-282
- Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn´s disease – an update. *Inflamm. Bowel. Dis.* 1995; 1, 220-227.
- Greten H., Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. *Innere Medizin.* 2005; S. 728-741
- Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J.Leukoc.Biol.* 1996; 59 (6):804-812
- Guan Jun-Lin. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols.* 2005; 294:17
- Guan Y, Stillman BA, Zhang Y, Schneider A, Saito O, Davis LS, Redha R, Breyer RM, Breyer MD. Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP2 receptor. *BMC.Pharmacol.* 2002; 2:14
- Hancke E., Junginger Th. Anorektale Abszesse und Fisteln: Einleitung, Klinik, Diagnostik, Therapie. *Ärztebl Rheinland-Pfalz.* 1990; 8: 396-400.
- Hartmann F., Colitis ulcerosa. In: Hahn G, Riemann JF (Hrsg) *Klinische Gastroenterologie*, Bd 1, 3.Aufl. Thieme, Stuttgart. 1996; S 905-928
- Hartz RS, Poticha SM, Shields TW. Healing of the perineal wound. *Arch.Surg.* 1980; 115 (4):471-474
- Heckmann M, mann-Grill BC, Hein R, Krieg T. Biphasic effects of interleukin-1 alpha on dermal fibroblasts: enhancement of chemotactic responsiveness at low concentrations and of mRNA expression for collagenase at high concentrations. *J.Invest Dermatol.* 1993; 100 (6):780-784
- Herold G. und Mitarbeiter. *Innere Medizin. Arzt und Information* 2006; S. 422

- Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2007; 292 (2):L405-L413
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (6837):599-603
- Hynes RO. *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York, 1990
- Hynes RO. Fibronectins: a family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. *Harvey Lect.* 1985; 81:133-152
- Ito M, Yoshida K, Kyo E, Ayhan A, Nakayama H, Yasui W, Ito H, Tahara E. Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinomas. *Virchows Arch.B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* 1990; 59 (3):173-178
- Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat.Med.* 2005; 11 (11):1173-1179
- Kabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A, Narumiya S. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J.Clin.Invest* 2002; 109 (7):883-893
- Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J.Clin.Invest* 2003; 112 (12):1776-1784
- Karish SB, Gagnon JM. The potential role of roflumilast: the new phosphodiesterase-4 inhibitor. *Ann.Pharmacother.* 2006; 40 (6):1096-1104
- Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 122 (2):217-224
- Klein I, Reif S, Farbstein H, Halak A, Gilat T. Preillness non dietary factors and habits in inflammatory bowel disease. *Ital.J.Gastroenterol.Hepatol.* 1998; 30 (3):247-251
- Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; 281 (5):L1257-L1263
- Kohyama T, Liu XD, Wen FQ, Kim HJ, Takizawa H, Rennard SI. Prostaglandin D2 inhibits fibroblast migration. *Eur.Respir.J.* 2002a; 19 (4):684-689

- Kohyama T, Liu X, Wen FQ, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, Takizawa H, Cieslinski LB, Barnette MS, Rennard SI. PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2002b; 26 (6):694-701
- Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Seagroatt V. Appendicectomy, tonsillectomy, and inflammatory bowel disease: a case-control record linkage study. *J.Epidemiol.Community Health* 2002; 56 (7):551-554
- Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J.Leukoc.Biol.* 2003; 74 (5):833-845
- Laemimli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2001a; 7 (3):226-236
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2001b; 7 (1):16-26
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J.Cell Biol.* 2006; 172 (7):973-981
- Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 2002; 20 (2):81-91
- Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, Scholmerich J, Gelbmann CM, Rogler G. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology* 2003; 125 (5):1341-1354
- Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. *Am.J.Gastroenterol.* 2004; 99 (2):335-340
- Lin SL, Chen YM, Chiang WC, Tsai TJ, Chen WY. Pentoxifylline: a potential therapy for chronic kidney disease. *Nephrology.(Carlton.)* 2004; 9 (4):198-204
- Lin SL, Chiang WC, Chen YM, Lai CF, Tsai TJ, Hsieh BS. The renoprotective potential of pentoxifylline in chronic kidney disease. *J.Chin Med.Assoc.* 2005; 68 (3):99-105
- Lin WR, Brittan M, Alison MR. The role of bone marrow-derived cells in fibrosis. *Cells Tissues.Organs* 2008; 188 (1-2):178-188

- Lodish et al. Zellbiologie I. 2004, 5th ed., Kap. 19.
http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxm/documents/V_ZB1_6dh_WS05_online.pdf
- Lorenz R, Olbert P, Born P. Factor XIII in chronic inflammatory bowel diseases. *Semin.Thromb.Hemost.* 1996; 22 (5):451-455
- Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, El YF, Colombel JF, Belaiche J. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut* 2003; 52 (4):552-557
- Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 1997; 11 (6):474-481
- Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J.Cell Biol.* 1997; 139 (1):295-307
- McGarity WC, Mallory C, Walker J. Perineal wound healing after abdominoperineal resection. *Am.Surg.* 1976; 42 (3):206-211
- McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2002; 282 (1):C172-C182
- McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am.J.Pathol.* 2003; 162 (4):1355-1360
- McLeod R, Cohen Z, Langer B, Taylor B. Primary perineal wound closure following excision of the rectum. *Can.J.Surg.* 1983; 26 (2):122-124
- Meier JKH, Leeb SN, Falk W, Scholmerich J, Rogler G. The migratory potential of Crohn's disease myofibroblasts differs significantly between inflamed mucosa, strictures, and fistulae. 124 Suppl. 2 ed. 2003:A-329
- Mensing H, Pontz BF, Muller PK, Gauss-Muller V. A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *Eur.J.Cell Biol.* 1983; 29:268-273
- Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002; 50 Suppl 3:III60-III64
- Moore BB, Ballinger MN, White ES, Green ME, Herrygers AB, Wilke CA, Toews GB, Peters-Golden M. Bleomycin-induced E prostanoïd receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E2. *J.Immunol.* 2005; 174 (9):5644-5649
- Nagano T, Kimura SH, Takemura M. Prostaglandin E2 reduces extracellular ATP-induced migration in cultured rat microglia. *Brain Res.* 2008; 1221:1-5

- Nakajima A, Matsushashi N, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Kimura A. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995; 109 (5):1462-1467
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999; 79 (4):1193-1226
- Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J.Clin.Invest.* 2001; 108 (1):25-30
- Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin.* 2000; 16 (2):289-302
- Nelson PR, Yamamura S, Kent KC. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. *J.Vasc.Surg.* 1996; 24 (1):25-32
- Neurath MF, Schurmann G. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]. *Chirurg* 2000; 71 (1):30-40
- Nielsen OH, Rogler G, Hahnloser D, Thomsen OO. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat.Clin.Pract.Gastroenterol.Hepatol.* 2009; 6(2):92-106
- Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 1998; 42 (4):470-476
- Nitta M, Hirata I, Toshina K, Murano M, Maemura K, Hamamoto N, Sasaki S, Yamauchi H, Katsu K. Expression of the EP4 prostaglandin E2 receptor subtype with rat dextran sodium sulphate colitis: colitis suppression by a selective agonist, ONO-AE1-329. *Scand.J.Immunol.* 2002; 56 (1):66-75
- Oakley JR, Fazio VW, Jagelman DG, Lavery IC, Weakley FL, Easley K. Management of the perineal wound after rectal excision for ulcerative colitis. *Dis.Colon Rectum* 1985; 28 (12):885-888
- Odaka T, Kobayashi K, Takahashi K, Nakamura H, Matsuoka T. Effect of prostaglandin E2 on urokinase-type plasminogen activator production by human lung fibroblasts. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 2009; 69 (2):225-233
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (6837):603-606
- Okonogi K, Gettys TW, Uhing RJ, Tarry WC, Adams DO, Prpic V. Inhibition of prostaglandin E2-stimulated cAMP accumulation by lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages. *J.Biol.Chem.* 1991; 266 (16):10305-10312
- Pakianathan DR. Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J.Leukoc.Biol.* 1995; 57 (5):699-702

- Panzer U, Ugucioni M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *Eur.J.Immunol.* 2004; 34 (12):3682-3689
- Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am.J.Pathol.* 1997; 150 (3):823-832
- Pasricha PJ, Hassoun PM, Teufel E, Landman MJ, Fanburg BL. Prostaglandins E1 and E2 stimulate the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Prostaglandins.* 1992; 43(1):5-19
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* 1987; 165 (1):251-256
- Postlethwaite AE, Seyer JM. Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and a synthetic TNF-alpha 31-68 peptide. *J.Exp.Med.* 1990; 172 (6):1749-1756
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am.J.Physiol* 1999a; 277 (2 Pt 1):C183-C201
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am.J.Physiol* 1999b; 277 (1 Pt 1):C1-C9
- Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N.Engl.J.Med.* 1999; 340(18): 1398- 1405
- Prudhomme M, Dozois RR, Godlewski G, Mathison S, Fabbro-Peray P. Anal canal strictures after ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum.* 2003; 46 (1):20-23
- Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2000; 279 (4):G653-G659
- Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004; 36 (4):598-606
- Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2002;51(6):808-13.
- Ramachandran C, Satpathy M, Mehta D, Srinivas SP. Forskolin induces myosin light chain dephosphorylation in bovine trabecular meshwork cells. *Curr.Eye Res.* 2008; 33 (2):169-176

- Reif S, Lavy A, Keter D, Broide E, Niv Y, Halak A, Ron Y, Eliakim R, Odes S, Patz J, Fich A, Villa Y, Arber N, Gilat T. Appendectomy is more frequent but not a risk factor in Crohn's disease while being protective in ulcerative colitis: a comparison of surgical procedures in inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2001; 96 (3):829-832
- Reimund JM, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Kedinger M, Baumann R, Poindron P, Duclos B. In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40 (4):475-480
- Ren XD, Wang R, Li Q, Kahek LA, Kaibuchi K, Clark RA. Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment. *J.Cell Sci.* 2004; 117 (Pt 16):3511-3518
- Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 2007; 56 (1):130-139
- Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease—Current knowledge and future perspectives. *Journal of Crohn's and Colitis.* 2008; 2:279-290
- Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD—a dynamic, multifactorial process. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 2009; 6:228-235
- Riemann JF, Martin W-R Morbus Crohn. In: Hahn G, Riemann JF (Hrsg) *Klinische Gastroenterologie*, Bd 1, 3.Aufl. Thieme, Stuttgart. 1996; S 881-904
- Rogler G., Campieri M, Fiocchi S., Hanauer B. Jewell D.P., Rachmilewitz D., & Schölmerich J. (2002). Cells of the intestinal mucosa - from inflammation to fibrosis. In: *Inflammatory Bowel Disease: A Clinical Case Approach to Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment.* Kluwer Academic Publishers. S. 127-142.
- Russel M.G., Volovics A., Schoon E.J., van Wijlick E.H., Logan R.F., Shivananda S., & Stockbrugger R.W. Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm. Bowel. Dis.* 1998; 4, 182-186
- Ruwanpura SM, Noguchi K, Ishikawa I. Prostaglandin E2 regulates interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-3 production in human gingival fibroblasts. *J.Dent.Res.* 2004; 83 (3):260-265
- Sailer J, Turetschek K, Schima W. Bildgebung bei Morbus Crohn. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2006; 4 (3), 10-17, www.kup.at/gastroenterologie
- Sakai T, Peyruchaud O, Fassler R, Mosher DF. Restoration of beta1A integrins is required for lysophosphatidic acid-induced migration of beta1-null mouse fibroblastic cells. *J.Biol.Chem.* 1998; 273 (31):19378-19382

- Sandulache VC, Parekh A, Li-Korotky HS, Dohar JE, Hebda PA. Prostaglandin E2 differentially modulates human fetal and adult dermal fibroblast migration and contraction: implication for wound healing. *Wound.Repair Regen.* 2006; 14:633-643
- Satpathy M, Gallagher P, Jin Y, Srinivas SP. Extracellular ATP opposes thrombin-induced myosin light chain phosphorylation and loss of barrier integrity in corneal endothelial cells. *Exp.Eye Res.* 2005; 81 (2):183-192
- Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 347 (9010):1212-1217
- Schade I, Roth-Eichhorn S, Kasper M, Kuss H, Plotze K, Funk RH, Schuler S. Benefit of phosphodiesterase 4 inhibitors as supplemental therapy after lung transplantation concerning their antiproliferative effects: an experimental study using a heterotopic rodent model. *Transplantation* 2002; 74 (3):326-334
- Schmidt C, Baumeister B, Kipnowski J, Schiermeyer-Dunkhase B, Vetter H. Alteration of prostaglandin E2 and leukotriene B4 synthesis in chronic inflammatory bowel disease. *Hepatology* 1996; 43 (12):1508-1512
- Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G und Fürst A: *Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn*, 2003
- Schor H, Vaday GG, Lider O. Modulation of leukocyte behavior by an inflamed extracellular matrix. *Dev.Immunol.* 2000; 7 (2-4):227-238
- Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A, Pinnau R, Bertovich MJ, Nash GS. Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 101 (4):1020-1030
- Schreiber S. Pathophysiologie der chronisch-intestinalen Entzündung: Gestörte Homöostase von Entzündungsmediatoren? Aspekte im Gespräch – Extracta aus *Wissenschaft und Klinik* 10, Biotest Pharma GmbH. 1998; S. 9-17
- Schreiber S. Activation of nuclear factor kappaB as a target for anti-inflammatory therapy. *Gut* 1999; 44 (3):309-310
- Schwartz DA, Loftus EV, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology.* 2002; 122(4): 875-880
- Semmler J, Wachtel H, Endres S. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor-alpha production by human mononuclear cells. *Int.J.Immunopharmacol.* 1993; 15 (3):409-413
- Shapiro W. Inflammatory bowel disease. *eMedicine Specialties.* 2008.
<http://emedicine.medscape.com/article/774566-overview>

- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat.Cell Biol.* 2000; 2 (5):249-256
- Skold CM, Liu XD, Zhu YK, Umino T, Takigawa K, Ohkuni Y, Ertl RF, Spurzem JR, Romberger DJ, Brattsand R, Rennard SI. Glucocorticoids augment fibroblast-mediated contraction of collagen gels by inhibition of endogenous PGE production. *Proc.Assoc.Am.Physicians* 1999; 111 (3):249-258
- Slatter C, Girgis S, Huynh H, El-Matary W. Pre-pouch ileitis after colectomy in paediatric ulcerative colitis. *Acta Paediatr.* 2008; 97 (3):381-383
- Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem.J.* 1989; 259 (2):315-324
- Smith T. *Der menschliche Körper.* 1997; 158-159
- Sommer N, Loschmann PA, Northoff GH, Weller M, Steinbrecher A, Steinbach JP, Lichtenfels R, Meyermann R, Riethmuller A, Fontana A, . The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Nat.Med.* 1995; 1 (3):244-248
- Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102 (6):1920-1929
- Stelzner F. *Die anorektalen Fisteln.* Springer, Berlin Heidelberg New York 1981
- Sugimoto Y, Narumiya S, and Ichikawa A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog Lipid Res* 2000; 39: 289-314
- Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab Invest* 1996; 74 (2):452-466
- Togo S, Liu X, Wang X, Sugiura H, Kamio K, Kawasaki S, Kobayashi T, Ertl RF, Ahn Y, Holz O, Magnussen H, Fredriksson K, Skold CM, Rennard SI. The PDE4 inhibitors roflumilast and rolipram augment PGE₂ inhibition of TGF- β 1 stimulated fibroblasts. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2009;
- Tompkins RG, Warshaw AL. Improved management of the perineal wound after proctectomy. *Ann.Surg.* 1985; 202 (6):760-765
- Torphy TJ, Zhou HL, Cieslinski LB. Stimulation of beta adrenoceptors in a human monocyte cell line (U937) up-regulates cyclic AMP-specific phosphodiesterase activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1992; 263 (3):1195-1205
- Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1998; 157 (2):351-370

- Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J.Cell Biol.* 2004; 164 (3):427-439
- Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, McElree CK, Pressman SR, Shanahan F, Targan SR, . Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104 (3):741-748
- Tsai TJ, Lin RH, Chang CC, Chen YM, Chen CF, Ko FN, Teng CM. Vasodilator agents modulate rat glomerular mesangial cell growth and collagen synthesis. *Nephron* 1995; 70 (1):91-99
- Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29 (7):990-996
- Ushikubi F, Hirata M, and Narumiya S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995; 12: 343-359
- Vaday GG, Hershkoviz R, Rahat MA, Lahat N, Cahalon L, Lider O. Fibronectin-bound TNF-alpha stimulates monocyte matrix metalloproteinase-9 expression and regulates chemotaxis. *J.Leukoc.Biol.* 2000; 68 (5):737-747
- Valette L, Prigent AF, Nemoz G, Anker G, Macovschi O, Lagarde M. Concanavalin A stimulates the Rolipram-sensitive isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat thymic lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1990; 169 (3):864-872
- Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10:55–60
- Waits JO, Dozois RR, Kelly KA. Primary closure and continuous irrigation of the perineal wound after proctectomy. *Mayo Clin.Proc.* 1982; 57 (3):185-188
- White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, Moore BB, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast migration by E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2005; 32 (2):135-141
- White KE, Ding Q, Moore BB, Peters-Golden M, Ware LB, Matthay MA, Olman MA. Prostaglandin E2 mediates IL-1beta-related fibroblast mitogenic effects in acute lung injury through differential utilization of prostanoid receptors. *J.Immunol.* 2008; 180 (1):637-646
- Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Prokopowicz D. Mucosal and plasma prostaglandin E2 in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46 (28):2338-2342
- Windmeier C, Gressner AM. Effect of pentoxifylline on the fibrogenic functions of cultured rat liver fat-storing cells and myofibroblasts. *Biochem.Pharmacol.* 1996; 51 (5):577-584

- Xu J, Clark RA. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J.Cell Biol.* 1996; 132 (1-2):239-249
- Xu X, Rivkind A, Pikarsky A, Pappo O, Bischoff SC, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils have a potential profibrogenic role in Crohn disease. *Scand.J.Gastroenterol.* 2004; 39 (5):440-447
- Zeng L, An S, Goetzl EJ. Selective regulation of RNK-16 cell matrix metalloproteinases by the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor. *Biochemistry* 1996; 35 (22):7159-7164
- Zigmond S. Leucocyte locomotion and chemotaxis. *Nouv.Rev.Fr.Hematol.* 1973; 13 (6):886-887
- Zimmermann EM, Li L, Hou YT, Mohapatra NK, Pucilowska JB. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 5 in Crohn's disease. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2001; 280 (5):G1022-G1029

9 Danksagung

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. J. Schölmerich für die Ermöglichung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler für die Überlassung des Themas und seine vielfältige Unterstützung.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. F. Rieder, der diese Arbeit hervorragend und mit großem Engagement betreute und jeder Zeit für Diskussion und Korrektur zur Verfügung stand.

Bei den Ärzten und Kollegen aus der Endoskopie, Chirurgie und Pathologie möchte ich mich für die Bereitstellung von Gewebeproben bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich beim „Forschungsbau-Team“ für die freundliche Aufnahme, das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe Monika Artinger und Anita Zügner für das freundliche Klima im Labor, die gute Zusammenarbeit und für ihre Unterstützung während des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit bin ich Petra Hartung, einer lieben Freundin, sehr dankbar.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir zur jeder Zeit mit liebevoller Unterstützung, Hilfe und emotionalem Rückhalt zur Seite steht und mir damit meinen Lebensweg ermöglicht.

Meinem Freund Miroslav gilt ein besonderes liebes Dankeschön für die vielen aufmunternden Worte in schwierigen Momenten, für seine große Hilfsbereitschaft und die unendliche Geduld.

Vielen Dank!

10 Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Georgieva
Vorname: Martina
Adresse: Gutenberggasse 1c, 93051 Regensburg
Telefonnummer: 09412007817 oder 017624509743
E-mail: martina0georgieva@yahoo.de

Geburtsdatum: 09. Mai 1981
Geburtsort: Ruse, Bulgarien
Staatsangehörigkeit: Bulgarisch und Deutsch
Religion: Orthodox

Familienstand: ledig
Mutter: Pavlina Yankova, Diplom Ingenieurin
Vater: Yordan Yankov, Diplom Ingenieur

Ausbildung

1988 - 1992 Grundschule in Ruse, Bulgarien
1992 - 1999 Gymnasium in Ruse, Bulgarien – Abiturabschluss

10/1999 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg

08/2004 Physikum

21.02/05 - 22.03/05 Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
im Klinikum der Universität Regensburg (30 Tage)

26.08/05 - 11.09/05 Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie im
Klinikum der Universität Regensburg (16 Tage)

09/2005 Beginn der experimentellen Doktorarbeit zum Thema
„ Die Prostaglandine hemmen die Migration von
Darmfibroblasten“ bei Prof. Rogler in der Abteilung für
Gastroenterologie am Universitätsklinikum Regensburg

13.02/06 - 14.03/06	Famulatur in der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie im Krankenhaus Barmherzige Brüder (30 Tage)
08/06 – 10/06	Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin in Ruse, Bulgarien (2 Monate)
16.03/06 - 26.03/06	Famulatur in dem Institut für Röntgendiagnostik im Klinikum der
03.04/06 - 07.04/06	Universität Regensburg (16 Tage)
22.02/07 - 11.03/07	Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Neurologie im Bezirksklinikum Regensburg (16 Tage)
27.08/07 – 16.12/08	Praktisches Jahr in dem Institut für Röntgendiagnostik im Klinikum der Universität Regensburg
17.12/07 – 06.04/08	Praktisches Jahr in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin im Klinikum der Universität Regensburg
07.04/08 – 29.06/08	Praktisches Jahr in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie im Universitätsklinikum Jakarta, Indonesien
10/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2008	Approbation als Ärztin

Berufserfahrung

seit 01.12.2008	Assistenzärztin am Institut für Röntgendiagnostik, Klinikum der Universität Regensburg
-----------------	--