

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum Rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Einfluss gastrointestinaler Peptidhormone, Neuropeptide und
Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von Darmepithelzellen im Modell
der nichttransformierten Epithelzellreihe IEC-6**

Simon Thomas Schäfer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. -Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. V. H. Schusdziarra
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 22.10.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003 angenommen.

Meinen Eltern und meiner Großmutter,
auf deren Hilfe und Unterstützung ich immer zählen kann,
widme ich diese Arbeit

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	4
2.	Material und Methodik	6
2.1	Arbeitsmaterialien	6
2.1.1	Peptide und Zusätze	6
2.1.2	Zellen und Zellkultur	8
2.1.3	Geräte	8
2.1.4	Spezielle Materialien	10
2.2	Zellkultur	11
2.3	Wachstumsassay	11
2.4	Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	14
2.5	Zellphotografie	16
2.6	FACS-Analyse	16
2.7	Statistische Auswertung	17
3.	Ergebnisse	19
3.1	IEC-6-Wachstum unter serumfreien Bedingungen	19
3.2	Etablierung der optimalen Versuchsbedingungen	27
3.3	Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren auf IEC-6 Zellen	28
3.3.1	TGF α , IGF-1, EGF	28
3.3.2	Insulin-Gastrin-Gruppe und CCK	31
3.3.3	Glucagon-Gruppe	34
3.3.4	Neuropeptide	38
3.3.5	TGF β 1 und Somatostatin	43
3.3.6	Interaktionen getesteter Peptide mit TGF β 1 und Somatostatin	45
4.	Diskussion	47
4.1	Zellwachstum unter serumfreien Bedingungen	47
4.2	Intestinale Wachstumsregulation	50
4.2.1	Intestinotrophe Peptidhormone	51
4.2.2	Neuropeptide	52
4.2.3	Proliferationsinhibierende Substanzen	54
5.	Schlussfolgerung	56
6.	Zusammenfassung	58
7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Danksagung	66
9.	Curriculum Vitae	67
10.	Anhang	68

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serum Albumin
CCK	Cholecystokinin
DMEM	Dulbecco´s Mod Eagle Medium
DNA	Desoxyribonuleicacid
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid
EGF	Epithelial Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serum
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GLI	Gastrin- Like- Immunoreactivity
GLP	Glucagon Like Peptide
GRP	Gastrin Releasing Peptide
HEPES	Hydroxyethylpiperazineethanesulfonicacid
IEC	Intestinal Epithelial Cell
IGF	Insulin Like Growth Factor
NEA	Non Essential Aminoacids
NGF	Nerve Growth Factor
PBS	Phosphat buffered saline
TGF	Transforming Growth Factor
VIP	Vasoactive Intetinal Peptide
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Der menschliche Verdauungskanal ist ein komplexes, vielseitiges Organ, das als größte Drüse des Körpers der Aufnahme, Verarbeitung und Resorption von Nahrungsbestandteilen dient und als hochpotentes Abwehrsystem fungiert. Der Kreislauf zur Steuerung von Proliferation und Zellerneuerung unterliegt einem effizienten Regulationsmechanismus, um eine ausreichende Anzahl reifer Enterozyten zur Nährstoffabsorption bereitzuhalten.

Darmepithelzellen erwerben die funktionalen Eigenschaften reifer Enterozyten während der hochorganisierten Abfolge von Proliferation, migrationsassoziierter Differenzierung und Exfoliation oder Apoptose. Bei den meisten Säugetieren dauert dieser Zyklus 2-3 Tage.⁷⁸ Atrophien der Darmschleimhaut bei parenteraler Ernährung, Kachexie, intestinalen Tumoren oder Schleimhautveränderungen im Rahmen von Morbus Crohn und anderen inflammatorischen Prozessen, stellen ein großes Risiko und eine häufig schlecht zu therapierende Erscheinung dar.

Neben dem bekannten Einfluss von Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Faktor wird seit einiger Zeit ein proliferations- und migrationsfördernder Effekt weiterer gastrointestinaler Peptidhormone, von Wachstumsfaktoren und Neuropeptiden auf die Darmmukosa diskutiert. Neben der endokrinen und parakrinen Wirkung scheint ein vom Darmlumen ausgehender Effekt auf die Proliferation vorhanden zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich im Dünndarmlumen physiologisch relevante Konzentrationen verschiedener Hormone finden und sie dort in stabiler, aktiver, und wirksamer Form anzutreffen sind. Somit ist eine Wirksamkeit von luminal und ein modulierender Effekt auf die Dünndarmmukosa anzunehmen.⁵⁷

Quaroni und May⁵⁴ etablierten die nichttransformierte intestinale Epithelzellreihe IEC-6, seitdem wird sie häufig als In-vitro-Modell zur Erforschung des Einflusses regulierender Substanzen auf das Zellwachstum des intestinalen Epithels verwendet. Björk et al.⁶ und Ko et al.⁴⁰ zeigten in vorausgegangenen Studien, dass es sowohl stimulierende Faktoren (Epidermal Growth Factor, Insulin, Insulin Like Growth Factor) als auch Inhibitoren des Zellwachstums

(Somatostatin, Transforming Growth Factor β) gibt. Im Rahmen dieser Versuche sind IEC-6-Zellen mit 5-10% Serum sowie 0,1U/ml Insulin kultiviert worden. Die Kultur in serum- und insulinhaltigem Medium erschwert es, einen Effekt potentiell proliferationsfördernder Substanzen nachzuweisen.

Ziel dieser Studie war es zunächst, ein serumfreies Kulturmedium zu entwickeln, um anschließend den Einfluss von Wachstumsfaktoren, gastrointestinalen Peptidhormonen und Neuropeptiden auf das Wachstum der nichttransformierten Epithelzellreihe IEC-6 unter serumfreien Bedingungen zu untersuchen.

Neben der Exploration der Wirkungen verschiedenster Einzelsubstanzen interessierte die Wechselwirkung mehrerer untereinander im Hinblick auf additive, potenzierende oder inhibitorische Effekte. Besonders interessierten Stoffe, von denen eine allgemeine Wachstumsinhibition berichtet wird bzw. deren inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation im Rahmen dieser Versuche nachgewiesen werden konnte.

2. Material und Methodik

2.1 Arbeitsmaterialien

Dieses Kapitel enthält eine Auflistung der verwendeten Materialien, Zellen und Geräte und zeigt den genauen Ablauf von Vorbereitung, Zellkultur, Versuchen und Auswertung, um die Reproduktion der Ergebnisse zu ermöglichen.

2.1.1 Peptide und Zusätze

Calbiochem (San Diego, CA):

TGF α

Gibco Laboratories (Grand Island, NY):

DMEM

FCS

HEPES-Puffer

NEA

Penicillin

RPMI 1640

Streptomycin

Trypsin- EDTA Lösung

ICN (Irvine, CA):

Glucagon

GLP 1 (7-36NH₂)

Methyl-³H-Thymidin

Peninsula Laboratories (Belmont, CA):

Bombesin

GLP 2

Substanz P

VIP

R&D Systems (Minneapolis, Mn):

TGF β1

Sigma:

BSA

CCK

EGF

Fetuin

Gastrin

GIP

GRP

Insulin

Natrium-Pyruvat

Natrium-Selenit

Transferrin

Sämtliche Peptide wurden in möglichst hohen Konzentrationen aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.2 Zellen und Zellkultur

American Type Culture Collection:

Zelllinie IEC-6 (intestinal epithelial cells of rats)

2.1.3 Geräte

Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA):

Facsggerät FacsCalibur™

Clean Air:

Sterilbank NSF 49 BS5726 DIN 12950 (1-4), Patent Nummer: 0.106.382

Hereaus:

Brutschrank CO₂- Auto- Zero

Hettich:

Zentrifuge Rotina 46 R

Zentrifuge Universal 30F

Marienfeld:

Neubauer Zählkammer

Olympus:

Mikroskop BH

Ricoh:

Kamera XR-X 3000

Skatron Instruments:

Harvester Micro96™ Harvester 1105

Wallac EG&G:

Beta Counter 1450 MicroBeta® Trilux

Cassetten 1450-107

Filter 1450-432

Szintillationsflüssigkeit 1450—440 Betaplate Scint

Zeiss:

Mikroskop ID 03

Mikroskop Axiovert 25

2.1.4 Spezielle Materialien

Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, USA):

Plastikröhrchen 5 ml 35-2063

Plastikröhrchen 15 ml 35-2095

Plastikröhrchen 50 ml 35-2070

Software Modfit LT

Wellplatten Falcon Plastics 96 Well (0,32 cm²/Well)

Wellplatten Falcon Plastics 6 Well (9,6 cm²/Well)

Zellkulturflaschen Falcon Plastics 25 cm²

Zellkulturflaschen Falcon Plastics 75 cm²

Zellzyklusassay Cycle Test Plus Kit

2.2 Zellkultur

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde die Zelllinie IEC-6 verwendet und in flüssigem Stickstoff bei -70°C aufbewahrt. Für die Versuche wurde ausschließlich eine Charge der IEC-6-Zellen benutzt und darauf geachtet, Versuche nur zwischen der 18. und 20. Passage durchzuführen.

Die Aufzucht der IEC-6-Zellen erfolgte in einem auf DMEM basierenden Medium, dem 20% RPMI 1640, 5% FCS, 1mM Natriumpyruvat, 1% essentielle Aminosäurelösung, 1% HEPES, 25U/ml Penizillin und 25 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin zugefügt wurden (FCS-haltiges Medium). Die IEC-6-Zellen wurden in H_2O gesättigter Atmosphäre unter Zugabe von 5% CO_2 inkubiert. Die Zellerntung der ^3H -Thymidin markierten Zellen erfolgte unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung.

Versuche wurden nur durchgeführt, nachdem die Zellen mikroskopisch gesichtet wurden. Wenn kein morphologischer Unterschied zu den ursprünglichen Zellen festzustellen war, wurden sie verwendet, ansonsten verworfen.

2.3 Wachstumsassay

Als Maß der DNA-Synthese wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA von IEC-6-Zellen nach der Methode von Harkonen et al.²⁵ gemessen. Hierbei wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in 96 Wellplatten (0,32 cm^2/Well) ausgesät. Die folgenden 24h wurden die Zellen, um ein Anwachsen zu ermöglichen, mit FCS-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit SF-A-Medium, dem die entsprechenden zu untersuchenden Substanzen zugegeben wurden, inkubiert.

Die letzten vier Stunden der Inkubation wurde Methyl-[³H]-Thymidin (spezifische Aktivität: 77Ci/mmol) in einer Gesamtkonzentration von 90µCi/ml zugegeben. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimal mit PBS gewaschen und Trypsin-EDTA zugegeben (50 µl/Well über 5 Minuten), um die Zellen mit einem Skatron Microbeta 96 Harvester zu ernten und somit die radioaktiv markierte DNA auf speziellen Fiberglasfiltern zu erhalten. Die inkorporierte Aktivität wurde mit einem 1450 Microbeta Trilux Liquid and Luminescence Counter gemessen.⁷⁸

Methyl-[³H]-Thymidin-Inkorporations-Assay

1. Mikroskopieren der sich in Zellkulturflaschen befindlichen Zellen
 - 1.1. Kontrolle, ob die Zellen einen konfluenten Zellrasen bilden
 - 1.2. Überprüfung der Zellform (Vergrößerungen 3,2 bis 20fach)
 - 1.3. Beurteilung des Zytoplasmas (Granula)^a
 - 1.4. Kontrolle, ob eine Kontamination vorliegt
2. Absaugen des Nährmediums
3. Zugabe von 1–max. 2ml Trypsin
4. Flasche 1 mal schwenken
5. Trypsin absaugen
6. Zugabe von 1ml Trypsin
7. 5 min. bei 37°C im Brutschrank inkubieren
8. Mikroskopische Untersuchung, ob Zellen abgelöst sind und keine Zellkonglomerate vorliegen
9. Zugabe von 5-10ml RPMI 1640, um Trypsin zu neutralisieren
10. Abpipettieren der Zellsuspension in ein FALCON-Röhrchen
11. 5min. bei 1000U/min zentrifugieren
12. Überstand absaugen
13. Pellet in 5ml FCS-haltigem Medium resuspendieren
14. 10µl Suspension + 10µl Trypanblau vermischen
15. 10µl Suspension in Neubauer-Zählkammer geben
16. Auszählen der 4 Kammern
17. Ergebnis /4 = K1

^a Starke Granulierung gilt als Indikator für progrediente Zellalterung und in Kombination mit der Passagezahl als Ausschlusskriterium für eine Versuchsdurchführung.

18. $K1 * 2 * 10^3 = K1 * 2 * 10000$ =Konzentration der Suspension pro ml
an Zellen c pro ml = Zellen pro ml (in allen vier Quadranten
insgesamt 10Zellen)
19. Nochmals kontrollieren = Schritte 14-18
20. Es sollen ca. 5000Zellen pro 100 μ l vorliegen
21. Mit Combitips je 100 μ l in 96-Wellplatte pipettieren
22. 96-Wellplatte in Brutschrank geben, 18h +/-2h anwachsen lassen
23. Medium durch Auskippen der 96-Wellplatte auf sterile saugfähige
Unterlage entfernen
24. Jedes Well mit 100 μ l RPMI 1640 oder sterilem PBS waschen
25. Schritt 23 und 24 wiederholen
26. Medium durch Auskippen der 96-Wellplatte auf sterile saugfähige
Unterlage entfernen
27. In Well A1-A4 100 μ l FCS-haltiges Medium (FCS-Medium), in Well
A5-A8 100 μ l serumfreies Medium (SF-A-Medium) geben
28. In die übrigen Wells Zugabe der Suspensionen aus serumfreiem
Medium und jeweiliger zu testender Substanz (SF-A-Medium +
Testsubstanz) in entsprechender Konzentration, wobei in je vier
aufeinanderfolgende Wells die gleiche Suspension gegeben wird
29. 4h bzw. 20h bei 37°C im Brutschrank inkubieren
30. Zugabe von ^3H -Thymidin
31. 4h bei 37 °C im Brutschrank inkubieren
32. Medium und freie Radioaktivität durch Auskippen der 96-Wellplatte
auf sterile saugfähige Unterlage unter Beachtung der
Strahlenschutzanforderungen entfernen
33. Jedes Well mit 100 μ l RPMI 1640 oder sterilem PBS waschen
34. Medium durch Auskippen der 96-Wellplatte auf sterile saugfähige
Unterlage entfernen
35. 50 μ l Trypsin/Well zugeben
36. 10min im Brutschrank einwirken lassen
37. Harvesterung der Platte
38. Filter im Brutschrank mindestens 6h, max. 24h trocknen lassen
39. Filter in Kassette einlegen und im β -Counter vermessen
40. Ausgabe der Werte durch den β -Counter in Form von CCPM

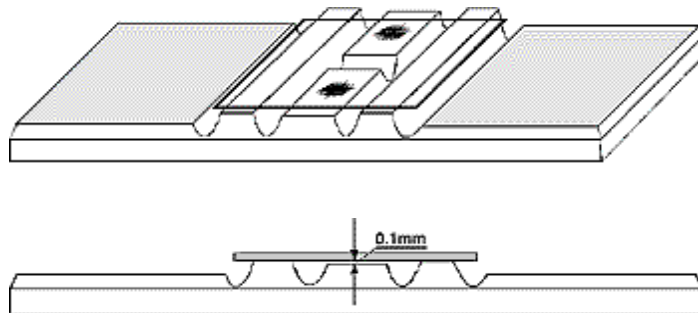
41. Auswertung der Daten mit Hilfe der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 97 und SPSS 10.0

2.4 Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl verwendeten wir 6-Wellplatten und säten die IEC-6-Zellen in einer Konzentration von 5000 Zellen/100 μ l aus, beließen die Platten für 24h im Brutschrank und wuschen sie zweimal mit sterilem PBS. Das jeweilige Medium wurde auf die Zellen gegeben und nach Inkubation die Zellzahl manuell mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gemessen .

Dazu wurden 10 μ l der zu zählenden Zellsuspension mit Hilfe einer Pipette entnommen und mit 10 μ l Trypanblau vermischt. Von dieser gefärbten Lösung wurden 10 μ l in die mit Spezialdeckglas bedeckte Neubauer-Zählkammer gegeben.

Die Zählkammer weist folgende Maße auf: Tiefe 0,100mm, Fläche 1mm²; sie beinhaltet ein Gitternetz, das aus 4 Quadranten á 16 Quadraten besteht (Fläche je Quadrat 0,0025 mm²).



Grafik1: schematische Darstellung einer Neubauerzählkammer mit 2 Zählnetzen

Es wurden alle 4 Quadranten ausgezählt. Die dabei erhaltene Zellzahl wurde mit 4 dividiert (Zellzahl je Quadrant), anschließend mit 2 (Verdünnung der Zellen mit Trypanblau) und dann mit 10^4 multipliziert, womit man die Zellzahl pro ml Suspension erhält.

Mathematische Darstellung:

$$X = x_n / 4 * 2 * 10^4 = x_n * 5000 \text{ wobei gilt:}$$

X = Zellzahl/ml Suspension

x_n = Gesamtzahl der Zellen aller vier Quadranten

Bei der Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ist besonders darauf zu achten, dass keine Luftblasen vorhanden sind, die Kammer und Suspension nicht durch Staub o.ä. verschmutzt ist und dass die Bedienung des Mikroskops regelgemäß erfolgt, um eine Artefaktbildung zu verhindern.

Die Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer ist besonders vorteilhaft, da sich avitale apoptotische Zellen nicht mit Trypanblau anfärben lassen und somit eine Unterscheidung zwischen lebender und abgestorbener Zelle möglich ist.

Des Weiteren ist diese Methode wegen ihrer Genauigkeit der maschinellen Zählung von Suspensionen mit geringer Zellzahl oder Zellkonglomeraten deutlich überlegen, weswegen im Rahmen dieses Forschungsprojektes nach Abschluss der Etablierungsphase vollständig auf die maschinelle Zählung verzichtet wurde.

2.5 Zellphotografie

Es wurde eine Ricoh Kamera XR-X 3000 und ein Zeiss Axiovert 25 Mikroskop mit den Vergrößerungen 10-, 20-, 32-fach verwendet.

Die IEC-6-Zellen wurden in 25cm² Zellkulturflaschen mit 5ml FCS-haltigem Medium bei einer Konzentration von 5000 Zellen/ml ausgesät:

1. Inkubation für 24h
2. mikroskopische Kontrolle
3. zweimaliges Waschen der Zellen mit DMEM
4. Jeweils Zugabe von 5ml unterschiedlicher Medien
5. 24-stündlich Mediumwechsel
6. Zellphotografie nach 1, 3 und 7 Tagen Inkubationsdauer.

2.6 FACS-Analyse

Im Rahmen der Durchführung von Wachstumsversuchen liefert die Kenntnis der Zyklusphasen sowie des DNA-Gehaltes wichtige Informationen über Mitoseverhalten, Syntheseaktivität, aber auch Apoptose. Zellzyklusanalysen erfolgten unter Verwendung des Becton-Dickenson-Bausatzes Cycle-Test-Plus für nukleäre DNA-Gehalt-Analysen. Dieser Kit erlaubt es, eine Zellpopulation nach ihren Zyklusphasen unter Verwendung eines Facscalibur-Zytometers zu unterteilen. Die Ergebnisauswertung erfolgte mit der Software Modfit LT. Die Flowzytometrie ermöglicht die Beurteilung von Zellen in wässriger Lösung und nützt spezielle Gegebenheiten von in verschiedenen Zyklusstadien befindlichen Zellen aus, um sie ihrer Zyklusphase zuzuordnen. Somit lassen sich apoptotische, nekrotische und vitale Zellen unterscheiden.

Jede Zelle wird einzeln beurteilt nach:

- Zellgröße (Engwinkelstreulicht)
- Granularität (Seitwärtsstreulicht)
- DNA-Gehalt (DNA-Farbstoffe, hier Propidium-Jodid)
- Apoptose (enzymatischer Einbau von fluoreszentelem Nukleotid in DNA-Strangbrüche)
- nekrotische Zellen (Verlust von Membranschrankenfunktion und Enzymaktivität).

Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen zeigen nekrotische keine Abnahme des DNA-Gehalts, was zur Unterscheidung von G_{0/1}-, S- und G₂- Phase genutzt wird. Die Fraktion nekrotischer Zellen lässt sich durch fehlende Propidium-Jodid-Aufnahme und den Verlust ihrer Membranschrankeigenschaften und Enzymaktivität von vitalen Zellen abgrenzen, die den Farbstoff aufnehmen. Die proportional zum DNA-Gehalt ansteigende Propidium-Jodid-Aufnahme ermöglicht eine Zyklus und Ploidiebestimmung, wobei der DNA-Gehalt zwischen einfachem und doppeltem Chromosomensatz schwankt.⁴⁸

2.7 Statistische Auswertung

Jede Substanz und Konzentration einer Substanz sind innerhalb eines Versuches viermal getestet und jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt worden. Von den Ergebnissen bildeten wir den Mittelwert, berechneten die Standardabweichung und gaben die Resultate als prozentuale Abweichung von der Kontrolle (SF-A-Medium) an. Die Ergebnisse überprüften wir mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests ($p \leq 0,05$) für den Gesamtversuch und mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unverbundene Stichproben, um signifikante Abweichungen zwischen zwei Konzentrationen einer Substanz und eine mögliche Dosisabhängigkeit festzustellen. Signifikante Unterschiede der ³H-Thymidininkorporation zwischen SF-A (Kontrolle) und jeweiliger Substanz-

konzentration sind für $p \leq 0,05$ mit * gekennzeichnet worden (** bei $p \leq 0,001$).
Unterschiede im Proliferationsgrad zwischen zwei Konzentrationen einer
Substanz mit $p \leq 0,05$ wurden mit + markiert (++ bei $p \leq 0,001$).

3. Ergebnisse

Im Anschluss sind die Resultate der Entwicklung eines FCS freien Mediums und der Festlegung geeigneter Versuchsintervalle dargelegt. Im folgenden werden die Effekte der getesteten Substanzen unter serumfreien Bedingungen auf die IEC-6-Zellen sowie die Ergebnisse von Koinkubation mit proliferationsinhibierenden Peptiden beschrieben.

3.1 IEC-6-Wachstum unter serumfreien Bedingungen

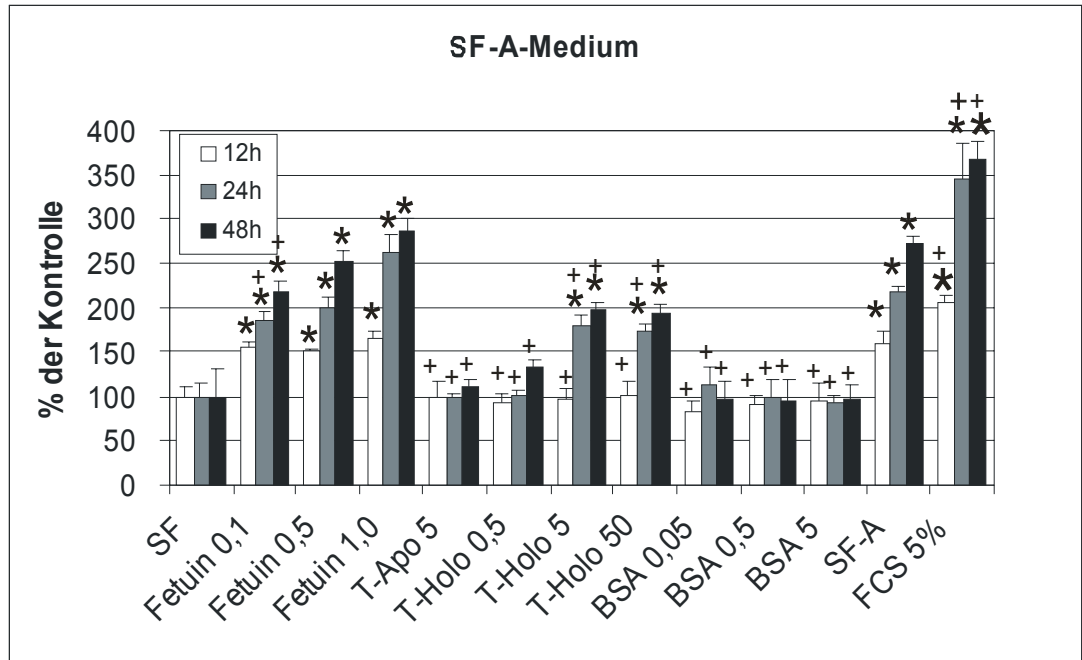
Das Ziel dieser Arbeit war es zunächst, ein Medium zu entwickeln, mit dem es möglich ist, diskrete Effekte verschiedener Substanzen auf das Wachstum der IEC-6-Zellen nachzuweisen. FCS wird häufig in der Zellkulturforschung mit intestinalen Zellen den Versuchsmedien zugegeben. Als potenter Wachstumsstimulator interagiert es mit anderen Substanzen und maskiert diskrete Effekte geringer stimulierender Zusätze, weswegen wir zunächst unser Augenmerk auf den Ersatz von FCS durch andere Substanzen konzentrierten.

Zur Aufzucht haben wir ein auf DMEM basierendes Medium verwendet, das neben 20% RPMI 1640, 1mM Natriumpyruvat, 1% essentielle Aminosäurelösung, 1% HEPES, 25U/ml Penizillin und 25µg/ml Streptomycin, auch 5% FCS enthielt (FCS-haltiges Medium).

Im Rahmen der Entwicklung unseres serumfreien Mediums haben wir zunächst bei dem zuvor beschriebenen Medium auf den Zusatz von FCS verzichtet (SF-Medium). Im weiteren entwickelten wir ein Medium, in dem FCS durch eine Reihe anderer Substanzen substituiert wurde.

Hierzu wurden unterschiedliche Zusätze getestet (Diag.1). Die IEC-6-Zelllinie zeigte bei Zugabe von Fetuin sowie Transferrin eine signifikante Zunahme in der ³H-Thymidininkorporation. Fetuin hatte den deutlichsten Effekt auf die Proliferationsrate. Dieser Effekt lag nur knapp unter der stimulierenden Wirkung von FCS. Ein proliferationsmodulierender Effekt von Transferrin scheint vom

Eisengehalt abhängig zu sein, da die Apo-Form, die nur in sehr geringem Maß Eisenreste enthält, die ^3H -Thymidinaufnahme nicht erhöht, wohingegen die Holo Form des Transferrins einen Einfluss auf die Proliferation zeigte.



Diag.1: Effekt verschiedener Medienzusätze auf die ^3H -Thymidininkorporation anhand der IEC-6-Zelllinie. Zusatzfreies DMEM Medium diente als Kontrolle (SF) und wurde auf 100% normiert. Es wurden die folgenden Zusätze untersucht: Fetuin 0,1, 0,5, 1,0mg/ml; Transferrin Apo $5\mu\text{g/ml}$, Transferrin Holo 0,5, 5, $50\mu\text{g/ml}$; BSA mit 0,05, 0,5, 5mg/ml; SF-A-Medium: 0,1mg/ml Fetuin, $5\mu\text{g/ml}$ Transferrin Holo, $0,5\mu\text{g/ml}$ BSA, 0,5mg/ml Natriumselenit; FCS 5%: Kontrollmedium mit 5% FCS Zusatz. IEC-6 Zellen wurden für 12h, 24h und 48h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. * $p \leq 0,05$ im Vergleich mit SF; + $p \leq 0,05$ im Vergleich mit SF-A

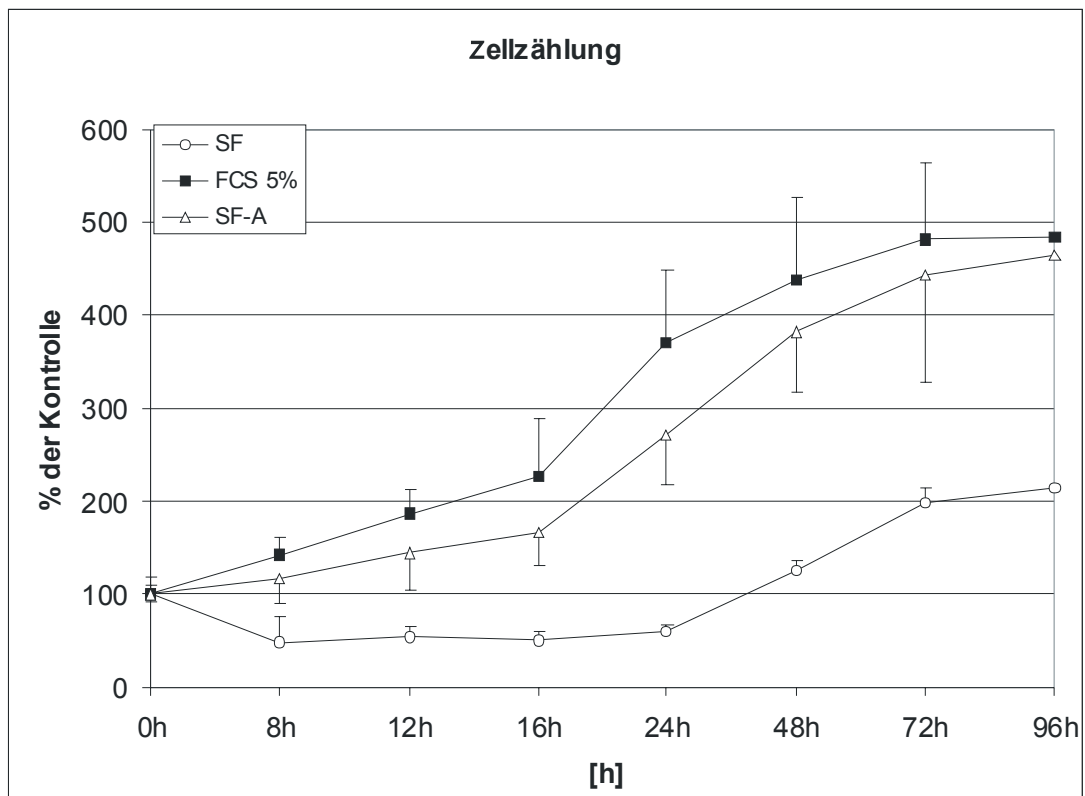
Um eine starke Vorstimulation zu vermeiden, haben wir die geringsten Konzentrationen von Fetuin (0,1mg/ml) und Transferrin Holo (0,5 $\mu\text{g/ml}$) für unser serumfreies Medium (SF-A-Medium) verwendet, für die ein statistisch signifikanter Einfluss auf das Zellwachstum in den Etablierungsversuchen gezeigt werden konnte.

Das entgeltige SF-A-Medium enthält 0,1mg/ml Fetuin, 5ng/ml Natrium Selenite, 0,5mg/ml Bovines Serum Albumin und $5\mu\text{g/ml}$ Transferrin (Holo-Form).

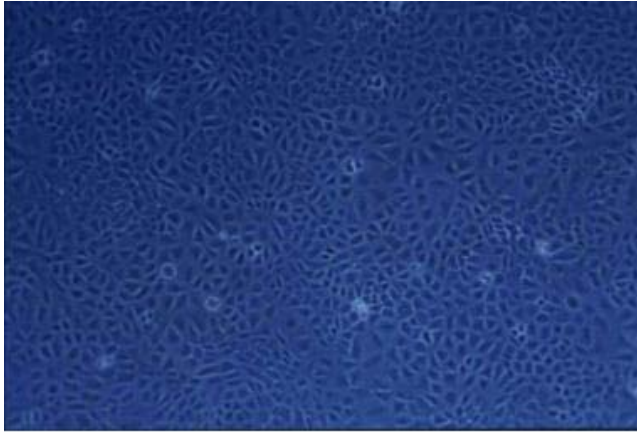
SF-A-Medium ruft eine geringe, aber signifikante Zunahme der ^3H -Thymidininkorporation im Vergleich mit den Einzelsubstanzen hervor, wenngleich der Effekt nicht additiv ist. Sowohl Fetuin, die Hauptglobulinfraktion in FCS, als auch

das SF-A-Medium zeigten einen im Vergleich zu FCS-haltigem-Medium deutlich geringeren stimulierenden Effekt.

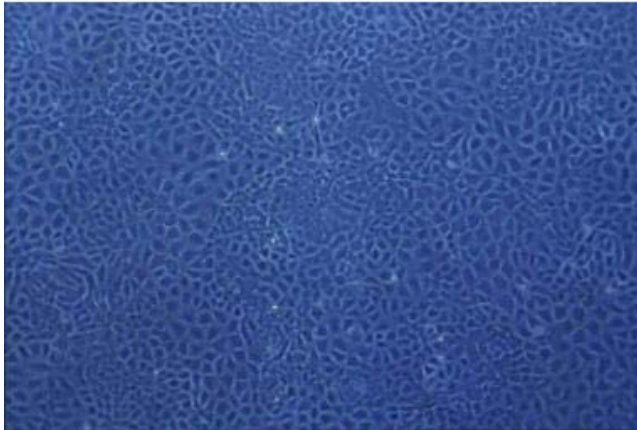
Es wurde auch die Veränderung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (Diag.2): sowohl FCS-haltiges Medium sowie SF-A-Medium zeigten zu Beginn der Kulturphase ein exponentielles Wachstumsverhalten, welches in etwa nach 72h, bei Erreichen der Konfluenz, in eine stationäre Phase überging. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Bedingungen festgestellt werden, wenn auch die mit SF-A-Medium kultivierten Zellen in ihrem Wachstum zurücklagen. Zur genaueren Analyse der Effekte von FCS- und SF-A-Medium wurden IEC-6-Zellen mit zusatzfreiem SF-Medium inkubiert. Bemerkenswert ist eine stationäre Phase bzw. ein Rückgang der Zellzahl zu Beginn der Kultur, gefolgt von einer erhöhten Proliferationsgeschwindigkeit am zweiten Tag. Dieser Wachstumsschub korreliert mit veränderter Zellmorphologie, die sich bei Untersuchung im Lichtmikroskop zeigte, während sowohl mit FCS wie auch mit SF-A-Medium gezüchtete Zellen nur minimale Veränderung der Morphologie und Apoptose (Grafik 2-4) aufwiesen.



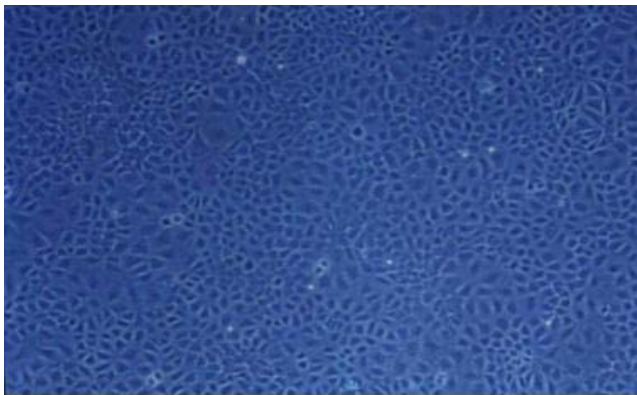
Diag.2: Darstellung des Zellwachstums unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Die Zellzahl zu Beginn der Inkubation mit SF-Medium, SF-A-Medium oder FCS-Medium. Die Zellzahl ist nach 6h, 12h, 18h, 24h, 48h, 72h und 96h bestimmt worden.



Grafik 2a: Lichtmikroskopische Fotografie von IEC-6-Zellen nach 24h Inkubation mit 5% FCS-Medium.



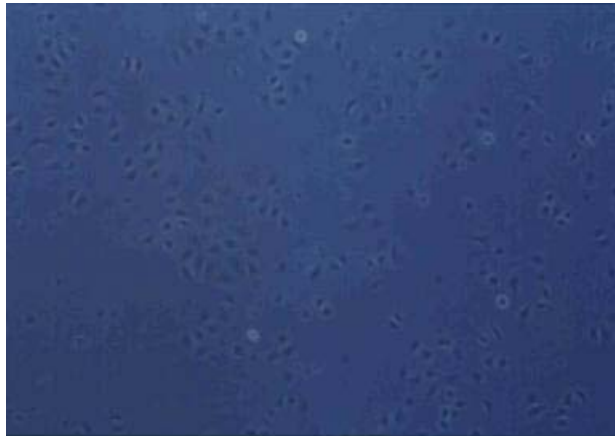
Grafik 2b: Lichtmikroskopische Fotografie von IEC-6-Zellen nach 48h Inkubation mit 5% FCS-Medium, Konfluenz wurde nach 48h erreicht.



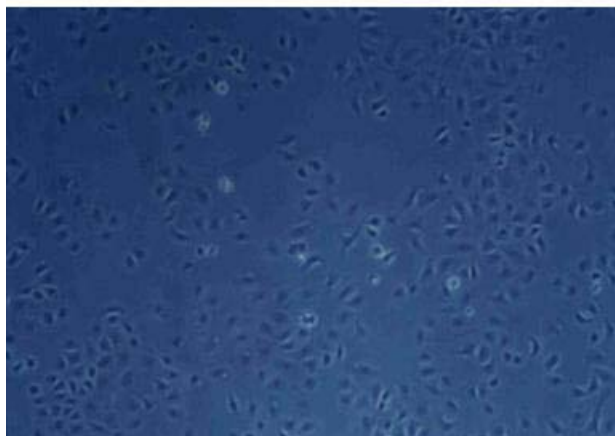
Grafik 3a: Lichtmikroskopische Fotografie von IEC-6-Zellen nach 24h Inkubation mit SF-A-Medium. Es ist kein morphologischer Unterschied zu in FCS-haltigem Medium inkubierten Zellen erkennbar.



Grafik 3b: Lichtmikroskopische Fotografie von IEC-6 Zellen nach 48h Inkubation mit SF-A-Medium, Konfluenz wurde nach 48h erreicht. Es ist kein morphologischer Unterschied zu mit FCS-haltigem Medium inkubierten Zellen erkennbar.



Grafik 4a: Lichtmikroskopische Fotografie von IEC-6-Zellen nach 24h Inkubation mit zusatzfreiem DMEM. Die Zellen zeigen veränderte Zellmorphologie und merklich reduziertes Proliferationsverhalten.

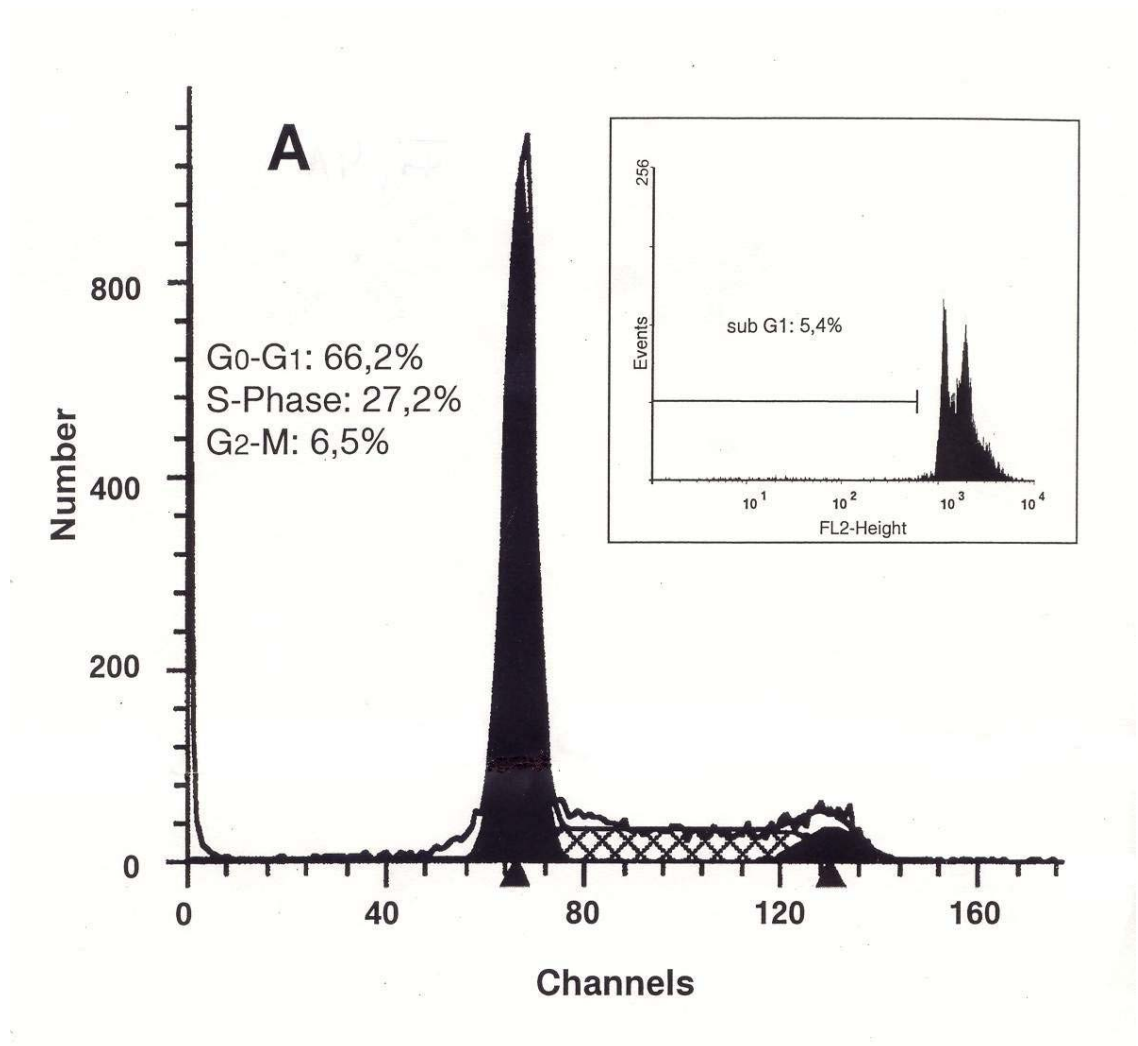


Grafik 4b: Lichtmikroskopische Fotografie von IEC-6-Zellen nach 48h Inkubation mit zusatzfreiem DMEM. Die Zellen zeigen veränderte Zellmorphologie und merklich reduziertes Proliferationsverhalten.

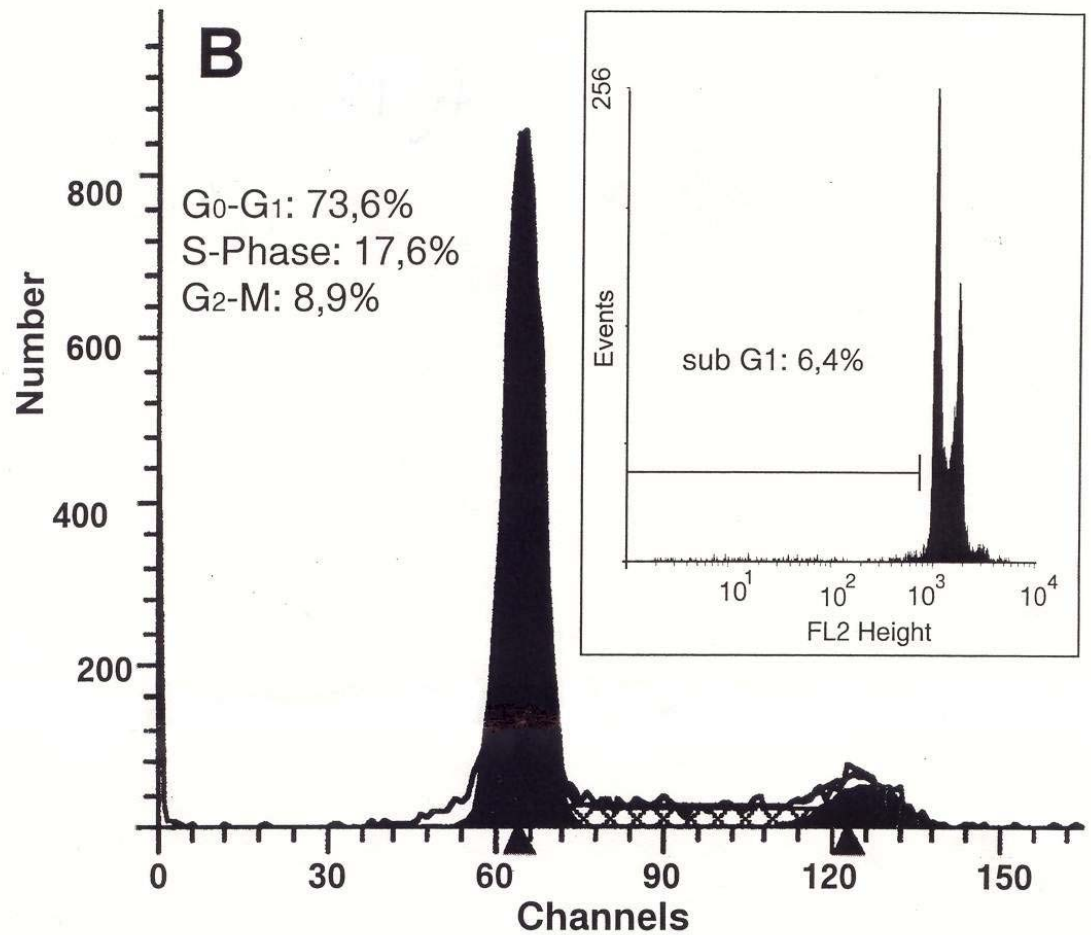
Da das Fehlen von Nährstoffen und Serumbestandteilen zu einem G_0 -Arrest führt, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt und die Verteilung der Zellzyklen unter Inkubationsbedingungen mit SF-A-Medium sowie zusatzfreiem Medium (SF-Medium) untersucht (Diag.3 A-C).

Die unter zusatzfreien Bedingungen gezüchtete Zellpopulation zeigte eine deutliche Aggregation von Zellen im Bereich des G_0/G_1 -peaks. Ein G_0 -Arrest konnte so bestätigt werden. Es wurde eine vermehrte Apoptoserate mit reduzierter DNA-Anfärbbarkeit der entsprechenden Zellen und eine Zunahme des sub- G_1 -peak-Bereiches gefunden. Im Gegensatz dazu zeigten mit SF-A-Medium inkubierte Zellen erhalten gebliebenes proliferatives Potential und eine Erhöhung der Zellzahl im Bereich der S- und G_2 - Phase. Die Population der in FCS-Medium kultivierten Zellen zeigte eine Zunahme des proliferierenden Pools und weist somit auf eine relevante Vorstimulation unter serumhaltigen Wachstumsbedingungen hin.

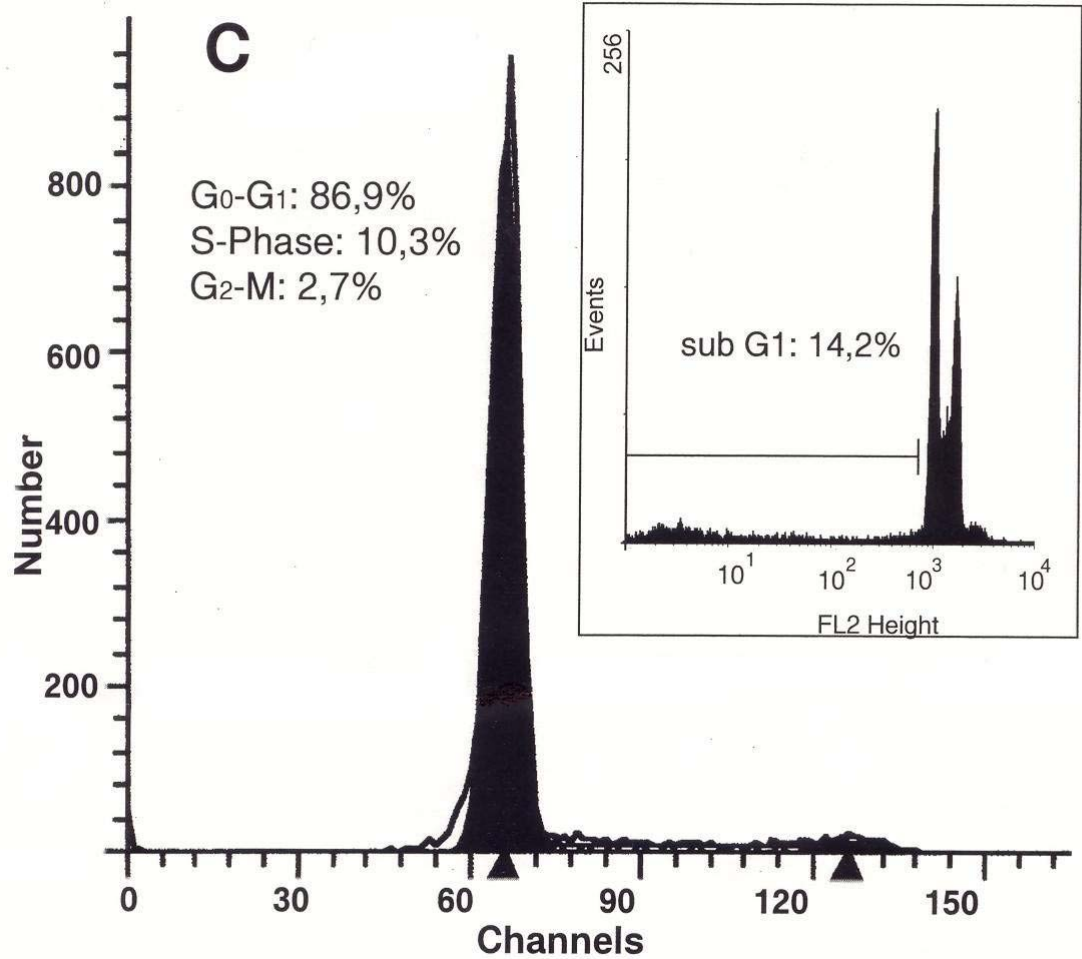
Aufgrund der beschriebenen Effekte wurde SF-A Medium als Basismedium verwendet, dem bei Durchführung der Versuche die verschiedenen getesteten Substanzen in definierten Konzentrationen zugesetzt wurden.



Diag.3a: Zellzyklusanalysen an IEC-6-Zellen. Kultur mit 5% FCS haltigem Medium. Die Analyse zeigt im Vergleich zur Analyse mit SF-A-Medium (Diag.3b) eine geringe Erhöhung der sich in S- und G₂-Phase befindlichen Zellen.



Diag.3b: Kultur unter serumfreien Bedingungen (SF-A-Medium); die Analyse zeigt, abgesehen von einer Zunahme im sub-G₁-peak-Bereich, der die Fraktion apoptotischer Zellen darstellt, keine Änderung zu den mit FCS-haltigem Medium untersuchten Zellen (Diag. 3a)



Diag.3c: Kultur mit zusatzfreiem DMEM; die Analyse weist im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen ein Pooling von Zellen im Bereich von G₀- und G₁-peak und eine Zunahme der apoptotischen Zellen auf.

3.2 Etablierung der optimalen Versuchsbedingungen

Unsere Aufmerksamkeit galt zunächst der Festlegung der optimalen Zellkonzentration/Well und effektiver Messzeiträume. Es zeigte sich, dass die Zelldichte Einfluss auf die Empfindlichkeit der IEC-6-Zellen gegenüber wachstumsregulierenden Peptiden hat. Daraufhin wurden Versuche mit unterschiedlichen Zellzahlen durchgeführt.

IEC-6-Zellen wurden 6, 8, 24 und 48 Stunden mit Insulin, EGF oder Gastrin inkubiert. Es zeigte sich, dass die 6h- und 8h-Werte aufgrund kurzer Einwirkungszeit für unsere Fragestellung suboptimal sind. Der Kruskal-Wallis-Test für k unverbundene Stichproben zur Bestimmung des Signifikanzniveaus erbrachte bei allen getesteten Substanzen für diese Inkubationszeiten nichtsignifikante Unterschiede mit $p \geq 0,05$.

Der 48h-Wert weist seinerseits eine andere Problematik auf. Die Wellgröße der von uns verwendeten 96-Wellplatte limitiert bereits ab einer Anfangszellzahl von 5000Zellen/100 μ l und 48-stündiger Inkubation das Wachstum wegen bestehender Subkonfluenz, die im Rahmen der Adhärenz und der intakten Zellkontaktfähigkeiten der IEC-6-Linie zu einer Proliferationshemmung führt.

Eine geringere Ausgangszellzahl wurde ebenfalls untersucht. Hierbei ergab sich das Problem, dass die IEC-6-Zellen ein alteriertes Wachstumsverhalten zeigten, da sie aufgrund der unzureichenden Zelldichte und der daraus resultierenden fehlenden Einbindung in den Zellverband langsamer und geringer proliferierten und eine erhöhte Apoptoserate aufweisen.

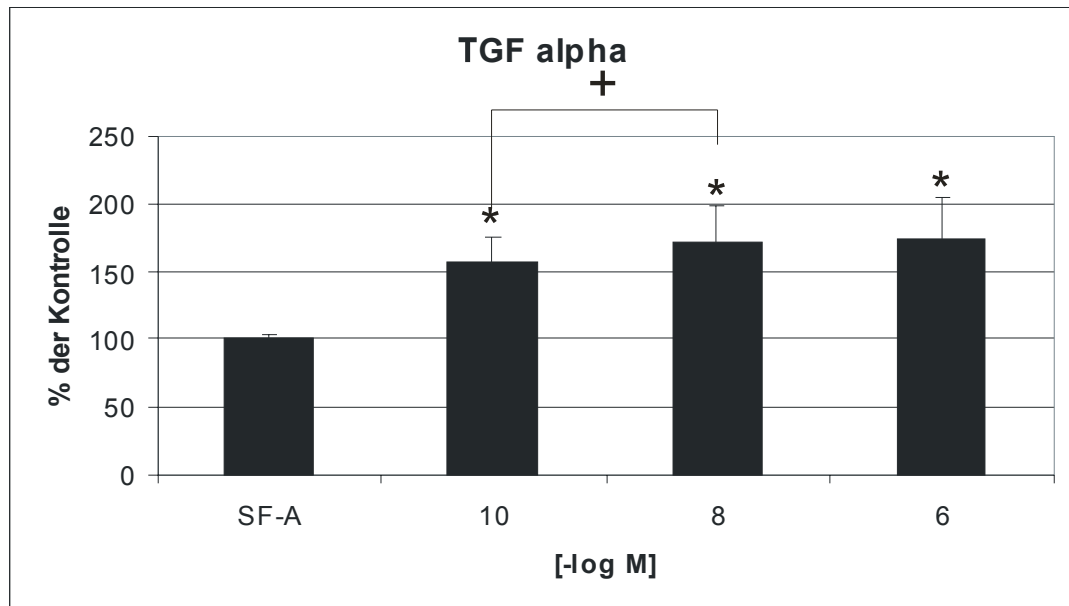
Basierend auf diesen Vorversuchen wurde eine Konzentration von 5000Zellen pro 100 μ l gewählt, 100 μ l/Well zugegeben und die Zellen 24h mit SF-A-Medium und Testsubstanz inkubiert.

3.3 Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren auf IEC-6-Zellen

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Methode untersuchten wir den Einfluss von Faktoren wie Insulin und Gastrin, deren Effekt auf die Modulation des Wachstums der nichttransformierten Zellreihe IEC-6 bereits untersucht worden ist. Nach Abschluss dieser Sondierungsphase sind weitere Peptidhormone, Neuropeptide und Wachstumsfaktoren bezüglich ihres Einfluss auf das Wachstum von IEC-6-Zellen getestet worden. Von allen untersuchten Substanzen hatten TGF α , IGF-1, EGF und Insulin den stärksten stimulierenden Effekt. In Versuchen mit TGF β_1 und Somatostatin konnte ein proliferationsinhibierender Effekt nachgewiesen werden. Im folgenden wird die Wirkung jeder einzelnen Substanz im Detail dargelegt.

3.3.1 TGF α , IGF-1, EGF

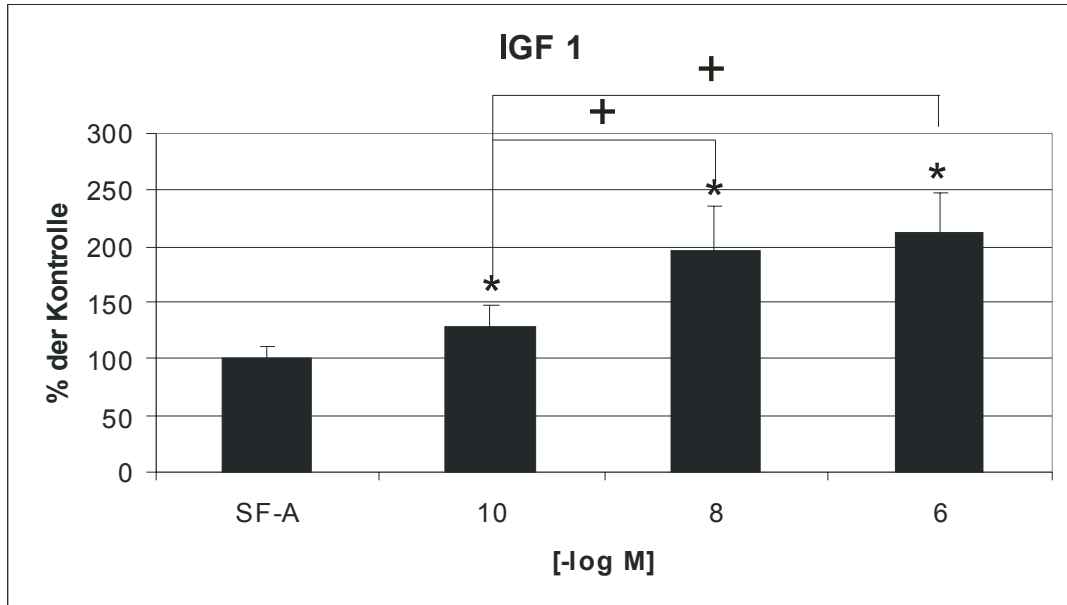
IEC-6-Zellen wurden mit 10^{-10} M, 10^{-8} M und 10^{-6} M TGF α untersucht und bei jeder dieser Konzentrationen konnte ein signifikanter proliferationsfördernder Effekt beobachtet werden. Eine maximale Zunahme der 3 H-Thymidininkorporation um 73,57% im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich bei einer Stimulation mit 10^{-6} M. Assays mit geringeren Peptidkonzentrationen stimulierten IEC-6-Zellen ebenfalls signifikant. Eine Inkubation mit 10^{-10} M bzw. 10^{-8} M TGF α resultierte in einer um 56,27% und 72,03% erhöhten Proliferation im Vergleich zum Zellwachstum in SF-A-Medium (Diag.4). Innerhalb der getesteten Konzentrationen von TGF α zeigte sich ein signifikanter dosisabhängiger Effekt zwischen 10^{-10} M und 10^{-8} M ($p=0,033$).



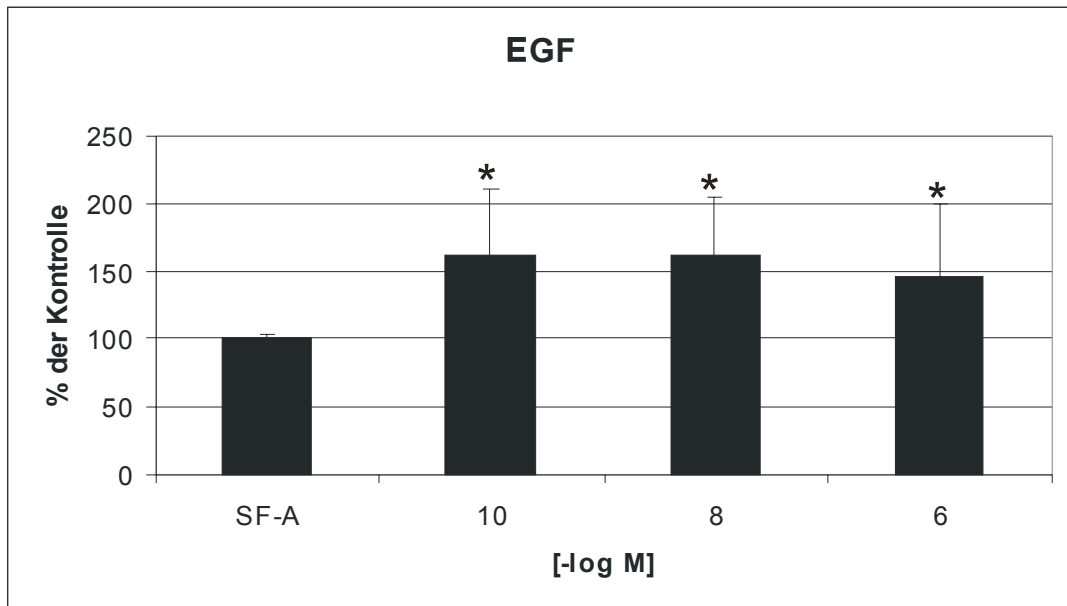
Diag.4: Effekt von TGF α auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von TGF α wurde in Konzentrationen von 10^{-10}M , 10^{-8}M und 10^{-6}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration, + $p \leq 0,05$ für zwei Konzentrationen einer Substanz untereinander

Versuche mit IGF-1, der in unserer Studie das Zellwachstum am stärksten stimulierenden Substanz, zeigten in allen untersuchten Konzentrationen einen deutlichen Effekt. Die Versuche wurden mit 10^{-10}M , 10^{-8}M und 10^{-6}M IGF-1 durchgeführt und ergaben bei sämtlichen Substanzkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (SF-A) statistisch signifikante Ergebnisse. Die ^3H -Thymidininkorporation in IEC-6 Zellen nahm dosisabhängig zu (Diag.5). Es wurde eine signifikante Stimulation um 27,96%, 94,96% und 112,57% bei Inkubation mit 10^{-10}M , 10^{-8}M und 10^{-6}M IGF-1 registriert.

Die dritte Substanz mit starkem proliferogenem Effekt auf das Wachstum der nichttransformierten Epithelzellreihe IEC-6 in unserem In-vitro-Modell ist EGF. Ebenfalls mit Konzentrationen von 10^{-10}M , 10^{-8}M und 10^{-6}M durchgeführte Versuche erbrachten für alle getesteten Konzentrationen einen signifikanten, nicht dosisabhängigen Effekt von EGF auf das Wachstum der IEC-6-Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit SF-A-Medium inkubiert wurden. Die stärksten Effekte konnten wir bei 10^{-8}M und 10^{-10}M beobachten, hier betrug die Zunahme des ^3H -Thymidineinbaus 61,39% bzw. 61,30%. Eine Inkubation mit 10^{-6}M (46,10%) war ebenfalls statistisch signifikant (Diag.6).



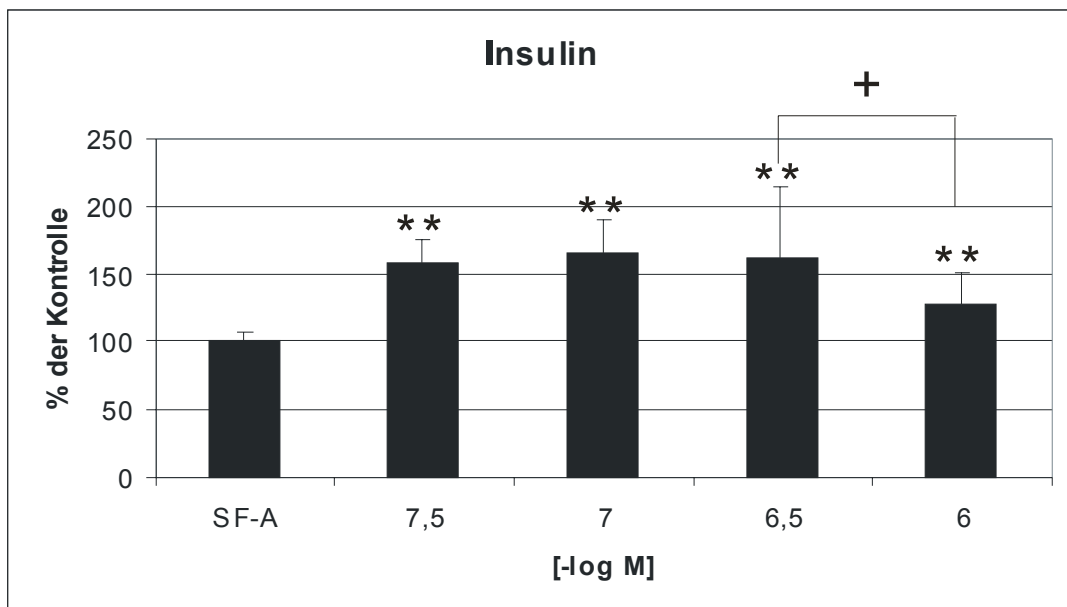
Diag.5: Effekt von IGF-1 auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von IGF-1 wurde in Konzentrationen von 10⁻¹⁰M, 10⁻⁸M und 10⁻⁶M untersucht. * p≤0,05 für SF-A gegen getestete Konzentration, + p≤0,05 für zwei Konzentrationen einer Substanz untereinander



Diag.6: Effekt von EGF auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von EGF wurde in Konzentrationen von 10⁻¹⁰M, 10⁻⁸M und 10⁻⁶M untersucht. * p≤0,05 für SF-A gegen getestete Konzentration

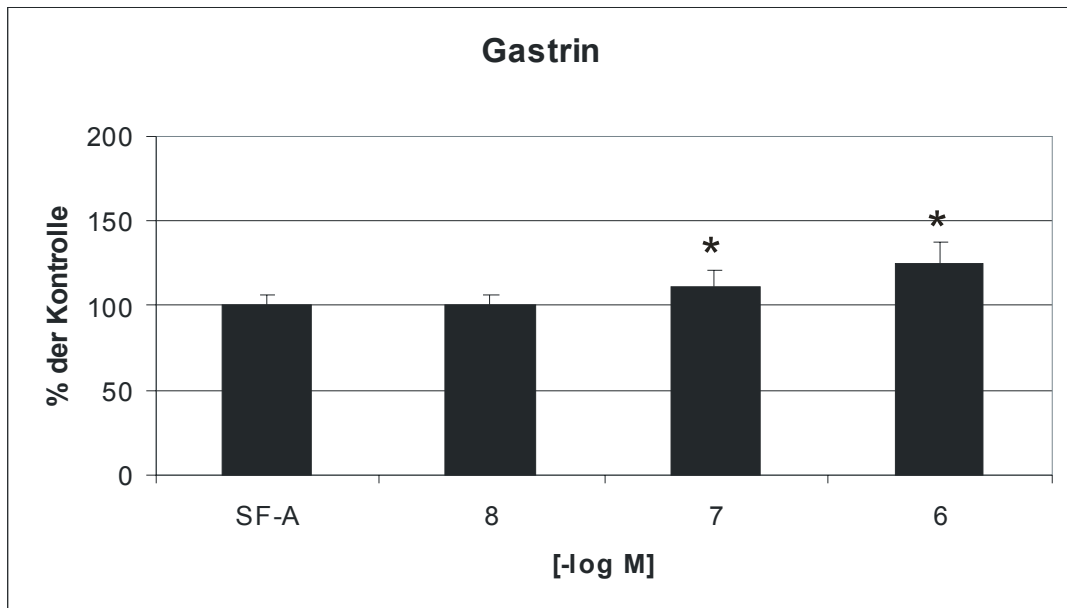
3.3.2 Insulin-Gastrin-Gruppe und CCK

Insulin wurde in Konzentrationen von $5 \times 10^{-7} \text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-6} \text{M}$ und 10^{-6}M untersucht. Es konnte ein signifikanter Effekt bei allen untersuchten Dosierungen nachgewiesen werden, der zu einer Wachstumszunahme um 57,82% bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-7} \text{M}$ und um 66,19% bei 10^{-7}M führte (Diag.7). Durch Zugabe höherer Konzentrationen konnte die ^3H -Thymidininkorporation nicht weitergesteigert werden, vielmehr beobachteten wir eine Abnahme der Proliferation. Bei $5 \times 10^{-6} \text{M}$ ging die Stimulation auf 61,73%, bei 10^{-6}M sogar auf 28,00% zurück.



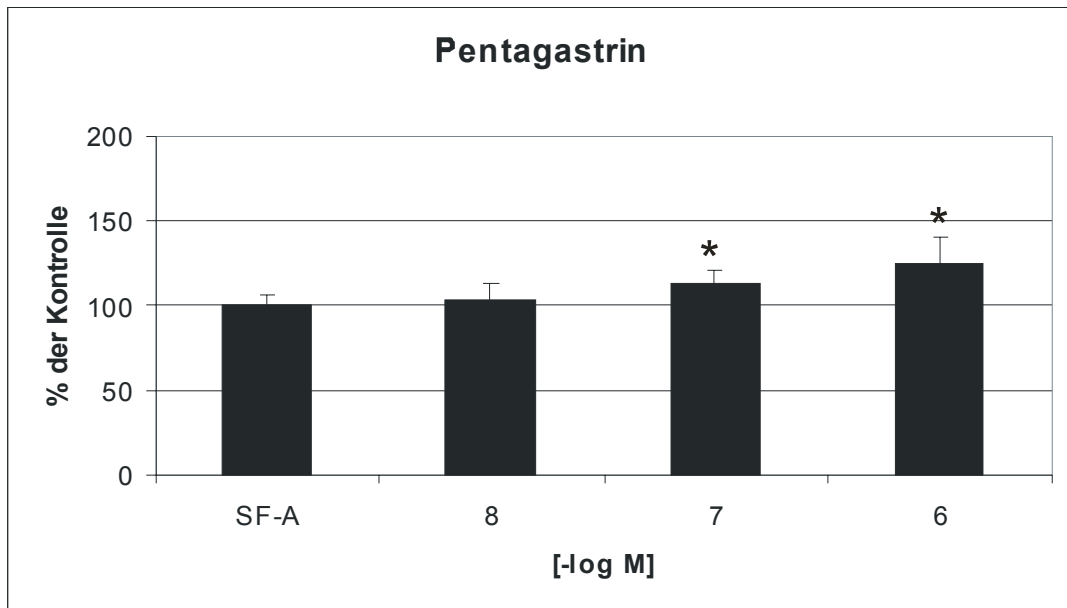
Diag.7: Effekt von Insulin auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von Insulin wurde in Konzentrationen von $10^{-7,5} \text{M}$, 10^{-7}M , $10^{-6,5} \text{M}$ und 10^{-6}M untersucht. ** $p \leq 0,001$ für SF-A gegen getestete Konzentration, + $p \leq 0,05$ für zwei Konzentrationen einer Substanz untereinander;

Des weiteren konnte auch Gastrin in unserem Modell eine signifikante Zunahme des IEC-6-Zellwachstums bewirken (Diag.8a). Der maximale Effekt von 24,49% verglichen mit in SF-A-Medium inkubierten Zellen wurde bei einer Stimulation mit 10^{-6}M beobachtet. Versuche mit 10^{-7}M Gastrin ergab eine statistisch relevante Stimulation um 10,94%, wohingegen eine Inkubation mit 10^{-8}M keine signifikante Proliferationssteigerung (0,38%) zeigte.



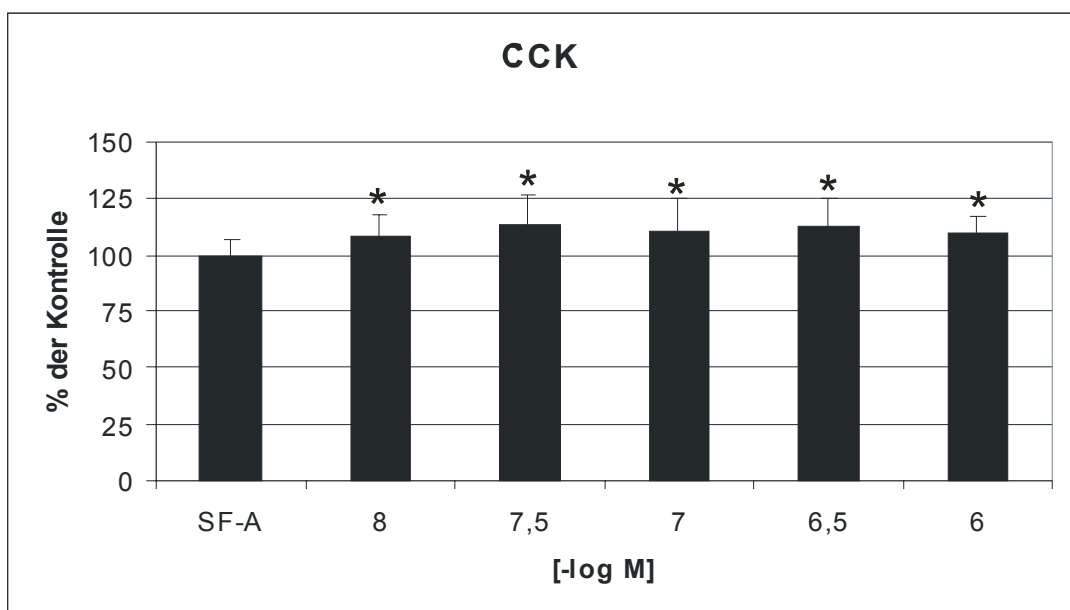
Diag.8a: Effekt von Gastrin auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von Gastrin wurde in Konzentrationen von 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration

Nach Abschluss der Testung des Peptids Gastrin interessierte der Vergleich zwischen Gastrin und Pentagastrin, um zu eruieren, ob verschiedene Gastrinformen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation von IEC-6-Zellen haben. Wir testeten Pentagastrin (Diag.8b) ebenfalls in Konzentrationen von 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M . Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigten eine Proliferationssteigerung um 4,13% (nicht signifikant), 13,03% (signifikant) und 24,78% (signifikant) bei Inkubation mit 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M und waren somit nahezu mit den bei Gastrintestung erzielten Daten identisch.



Diag.8b: Effekt von Pentagastrin auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von Pentagastrin wurde in Konzentrationen von 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration

CCK, ein in Struktur und Funktion dem Gastrin ähnliches Peptid, wurde in Konzentrationen von 10^{-8}M , $5 \times 10^{-7}\text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ und 10^{-6}M untersucht und es konnte in allen getesteten Konzentrationen ein signifikanter Effekt registriert werden (Diag.9). Dieser lag zwischen 7,59% und 13,51% bei 10^{-8}M bzw. $5 \times 10^{-7}\text{M}$. Bei Zugabe höherer Konzentrationen CCK lagen die Ergebnisse mit 10,56%, 12,86% und 9,42% für 10^{-7}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ und 10^{-6}M im selben Bereich.

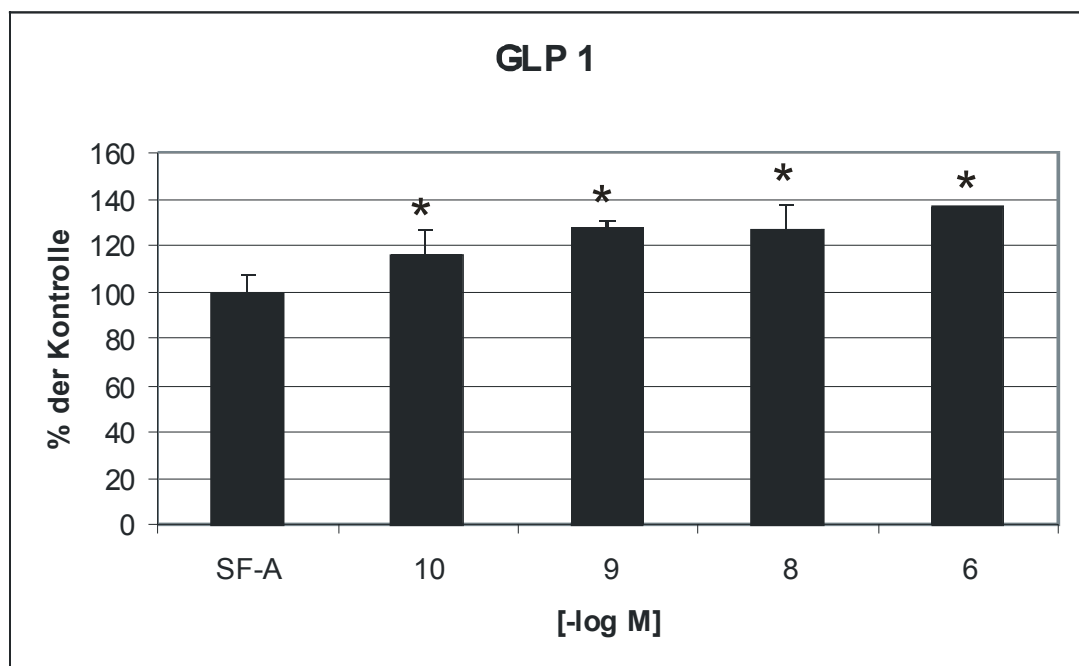


Diag.9: Effekt von CCK auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von CCK wurde in Konzentrationen von 10^{-8}M , $5 \times 10^{-7}\text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ und 10^{-6}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration

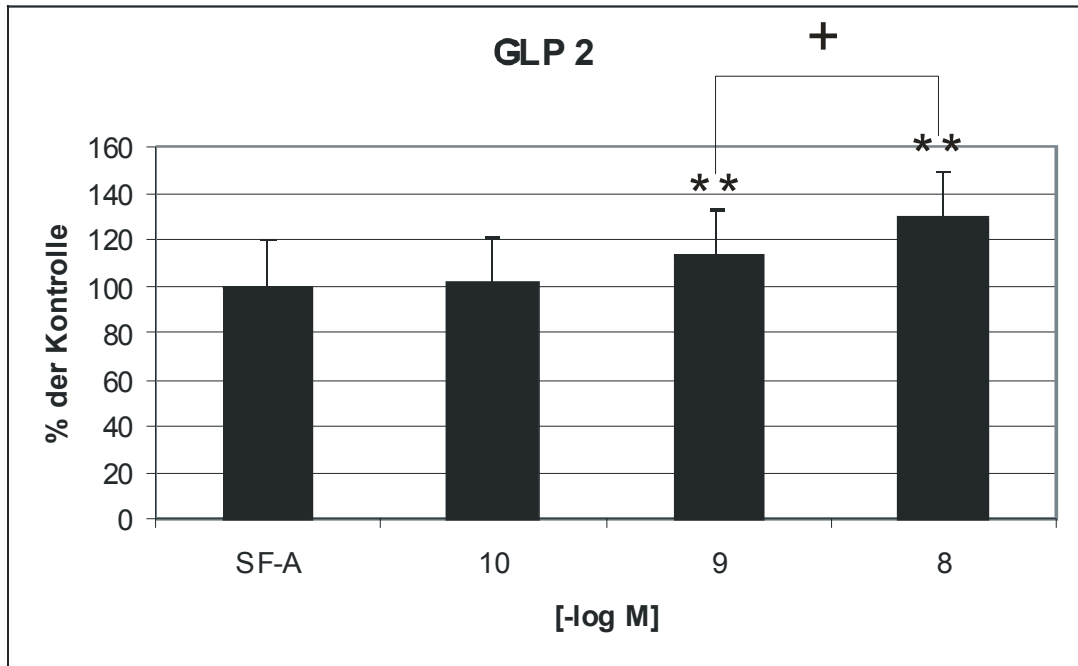
3.3.3 Glucagon-Gruppe

Es wurde der Einfluss von GLP-1 (7-36NH₂), GLP-2, GIP und Glucagon auf das Wachstum der Zelllinie IEC-6 untersucht. Sowohl GLP-1 (Diag.10) wie GLP-2 (Diag.11) zeigten deutliche proliferationsfördernde Effekte im Rahmen unseres Modells. Wir erhielten vergleichbare Resultate, wenngleich GLP-2 10-fach höhere Konzentrationen benötigte, um ähnlich starke Effekte hervorzurufen.

GLP-1 zeigte bereits bei einer Konzentration von 10⁻¹⁰M einen signifikanten Effekt, mit einer ³H-Thymidininkorporationszunahme um 16% und bei einer Konzentration von 10⁻⁶M eine Zunahme um 36,74%. GLP-2 dagegen zeigte erst ab Konzentrationen von 10⁻⁹M (0,98% bei 10⁻¹⁰ M) signifikante Änderungen der Proliferation um 13% und 29,69% bei 10⁻⁸M.

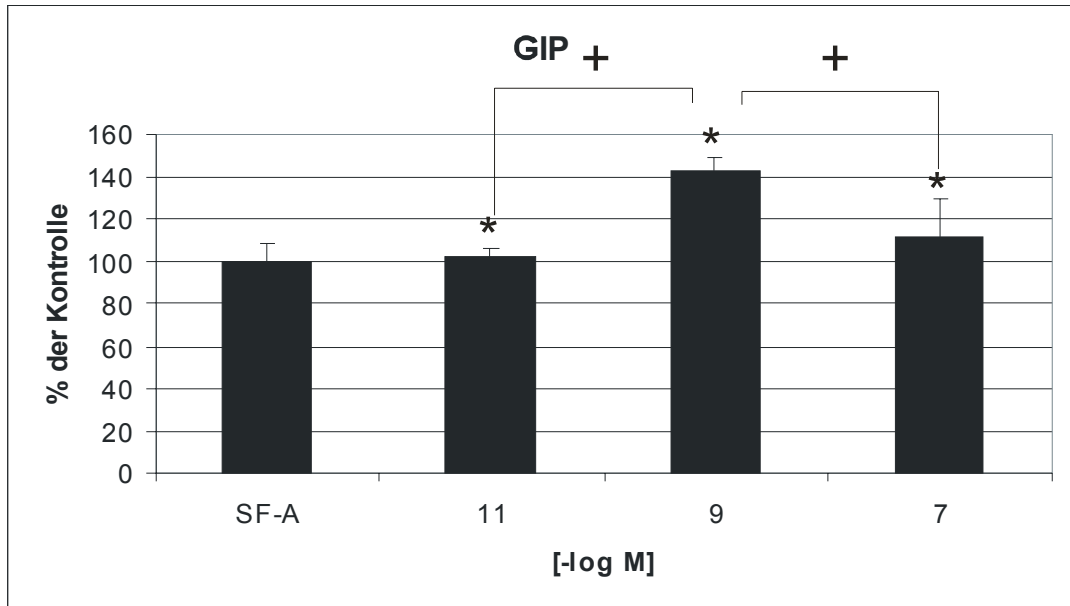


Diag.10: Effekt von GLP-1 auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von GLP-1 wurde in Konzentrationen von 10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M und 10⁻⁶M untersucht. * p≤0,05 für SF-A gegen getestete Konzentration



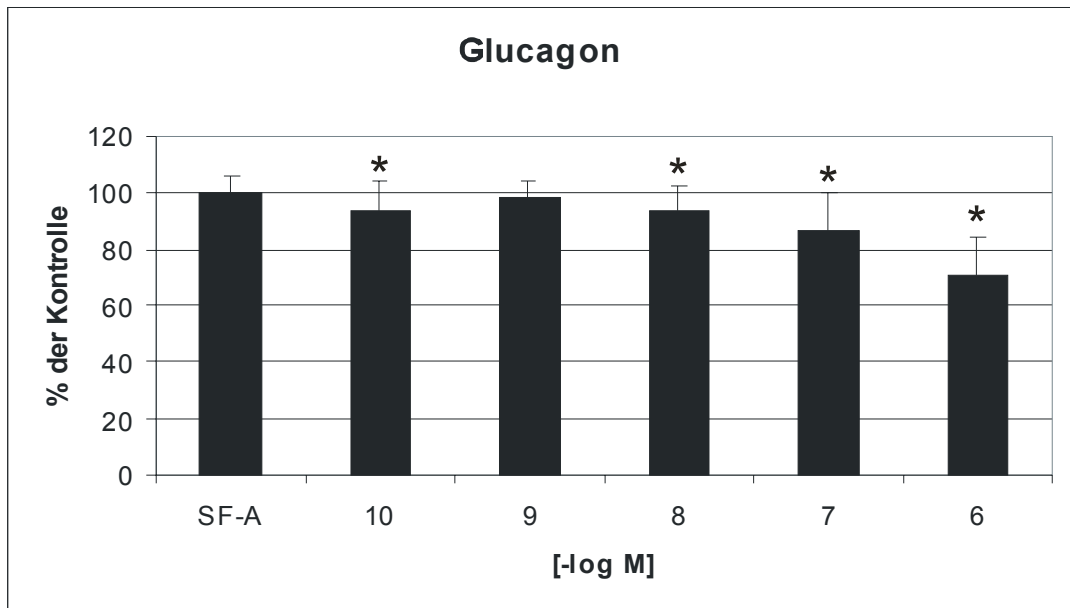
Diag.11: Effekt von GLP-2 auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von GLP-2 wurde in Konzentrationen von 10^{-10}M , 10^{-9}M und 10^{-8}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration, + $p \leq 0,05$ für zwei Konzentrationen einer Substanz untereinander

GIP, eine andere Substanz aus der Glucagon-Sekretin-Familie, zeigte ab einer Konzentration von 10^{-11}M eine signifikante Proliferationssteigerung der IEC-6-Zellen (Diag.12), wenngleich der beobachtete Effekt mit 2,32% gering war; der höchste Einbau von ^3H -Thymidin erfolgte bei 10^{-9}M mit 42,47% Zunahme des Wachstums im Vergleich zu Kontrollbedingungen (SF-A). Eine Zellstimulation mit 10^{-7}M GIP führte zu einer geringeren, aber ebenfalls signifikanten Proliferationszunahme um 11,08%.



Diag.12: Effekt von GIP auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von GIP wurde in Konzentrationen von 10^{-11} , 10^{-9}M und 10^{-7}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration, + $p \leq 0,05$ für zwei Konzentrationen einer Substanz untereinander;

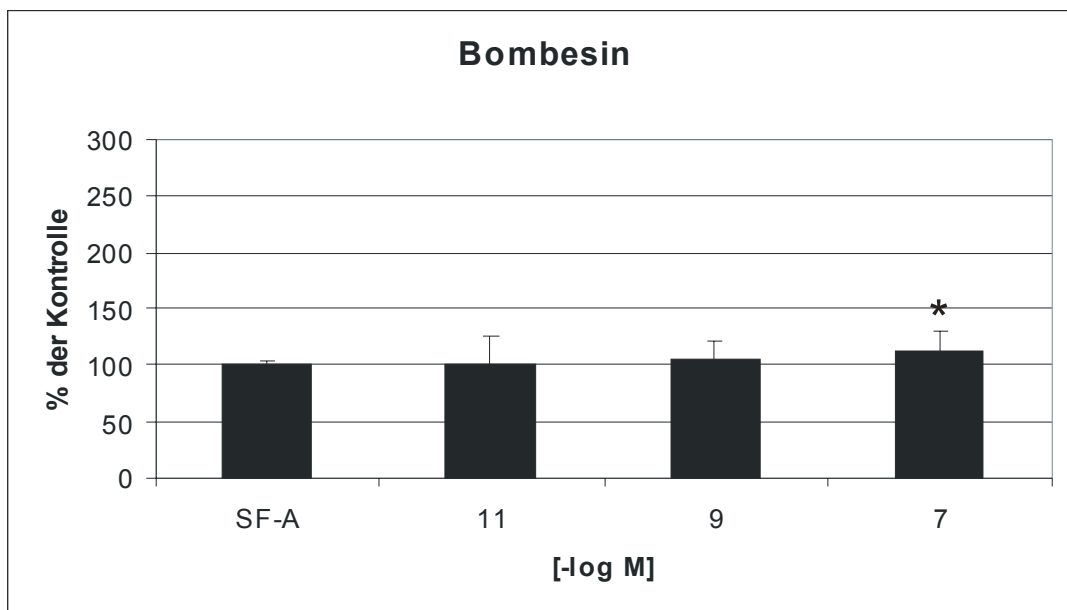
Glucagon, die letzte von uns untersuchte Substanz der Glucagon-Sekretin-Gruppe, wurde in Dosierungen von 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M getestet (Diag.12). Keine dieser Konzentrationen führte zu einer Zunahme der ^3H -Thymidininkorporation, vielmehr zeigten mit Glucagon inkubierte IEC-6-Zellen eine geringgradige, bereits signifikante Reduktion ihres Wachstum. Der deutlichste Effekt wurde bei einer Konzentration von 10^{-6}M beobachtet: Hier lag das Wachstum um 28,73% unter dem der Kontrolle. Andere getestete Substanzen ergaben geringfügige bereits signifikante Abnahmen der Proliferation um 6,38%, 6,17% und 13,94% bei 10^{-10}M , 10^{-8}M und 10^{-7}M . Bei 10^{-9}M zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme des Wachstums um 1,66%.



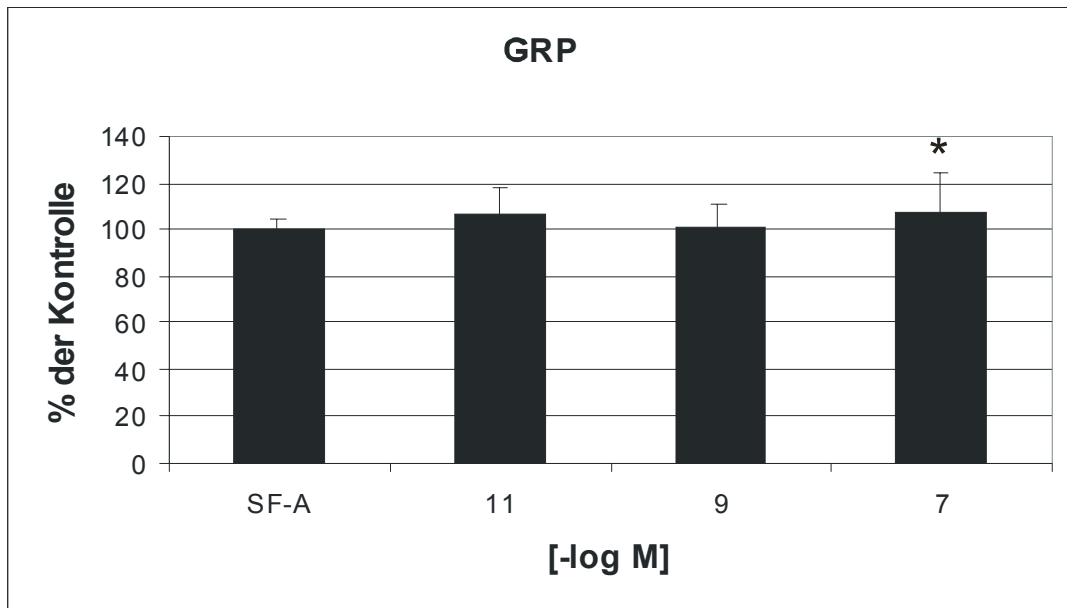
Diag.13: Effekt von Glucagon auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von Glucagon wurde in Konzentrationen von 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration, + $p \leq 0,05$ für zwei Konzentrationen einer Substanz untereinander

3.3.4 Neuropeptide

Im Rahmen unserer Versuche wurden die Neuropeptide Bombesin, GRP, Substanz P, Galanin, Neurotensin, CGRP sowie VIP untersucht. Bombesin und das bei Säugetieren vorkommende Analogon GRP zeigten einen proliferationsfördernden Effekt bei einer Konzentration von 10^{-7} M. Hierbei betrug die Zunahme der 3 H-Thymidininkorporation bei Inkubation mit Bombesin 13,8%. GRP stimulierte die Zellproliferation um 7,15%. Versuche mit 10^{-11} M und 10^{-9} M erbrachten nicht signifikant von der Kontrolle unterschiedene Ergebnisse mit Ergebnissen von 0,76% und 5,52% für Bombesin sowie 6,51% und 1,12 % für GRP.

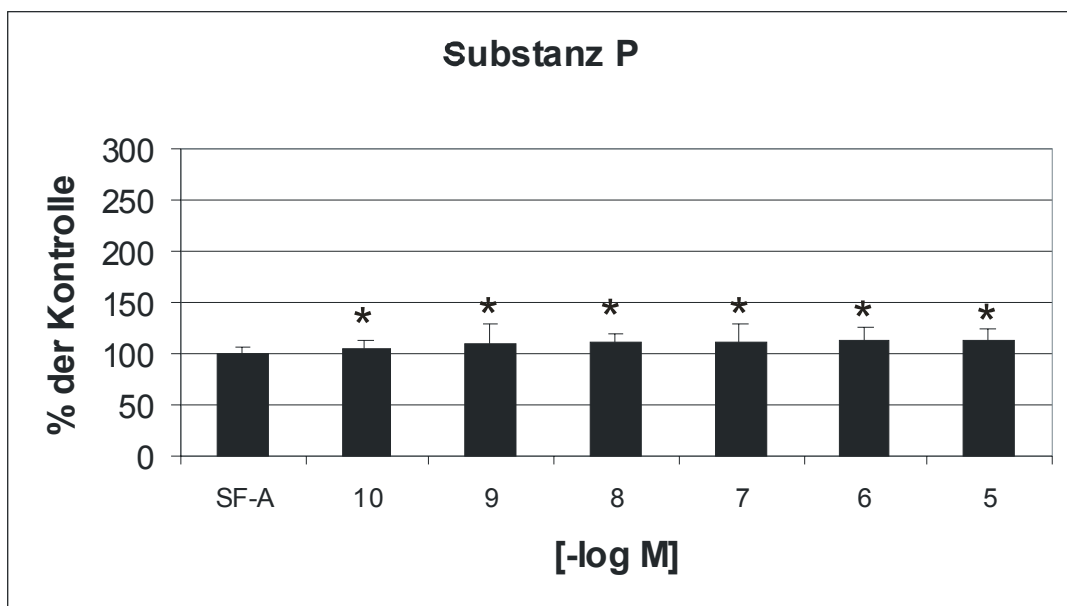


Diag.14: Effekt des Neuropeptides Bombesin auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch 3 H-Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von Bombesin wurde in Konzentrationen von 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration



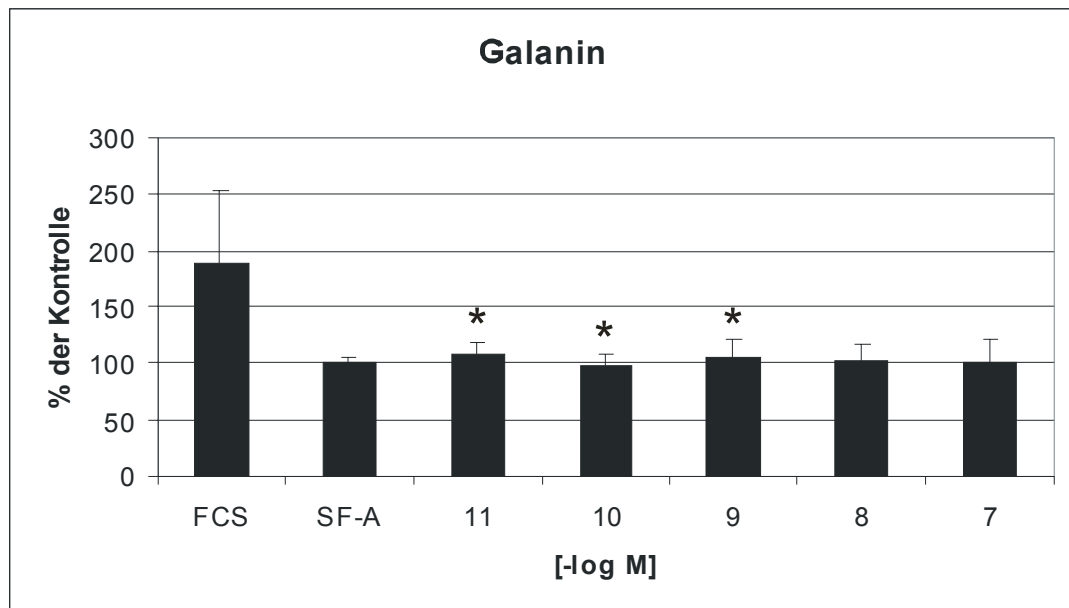
Diag.15: Effekt von GRP auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von GRP wurde in Konzentrationen von 10⁻¹¹M, 10⁻⁹M und 10⁻⁷ M untersucht. * p≤0,05 für SF-A gegen getestete Konzentration

Substanz P wurde in jeweils um eine 10er Potenz ansteigenden Konzentrationen von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁵ M untersucht und zeigte in allen getesteten Dosierungen einen signifikanten wachstumsfördernden Effekt. Dieser reichte von 4,88% (10⁻¹⁰M) über 9,11% (10⁻⁹M), 11,63% (10⁻⁸M), 10,53% (10⁻⁷M) 12,18% (10⁻⁵M) bis zu einem Maximum von 14,08% bei 10⁻⁶ M.



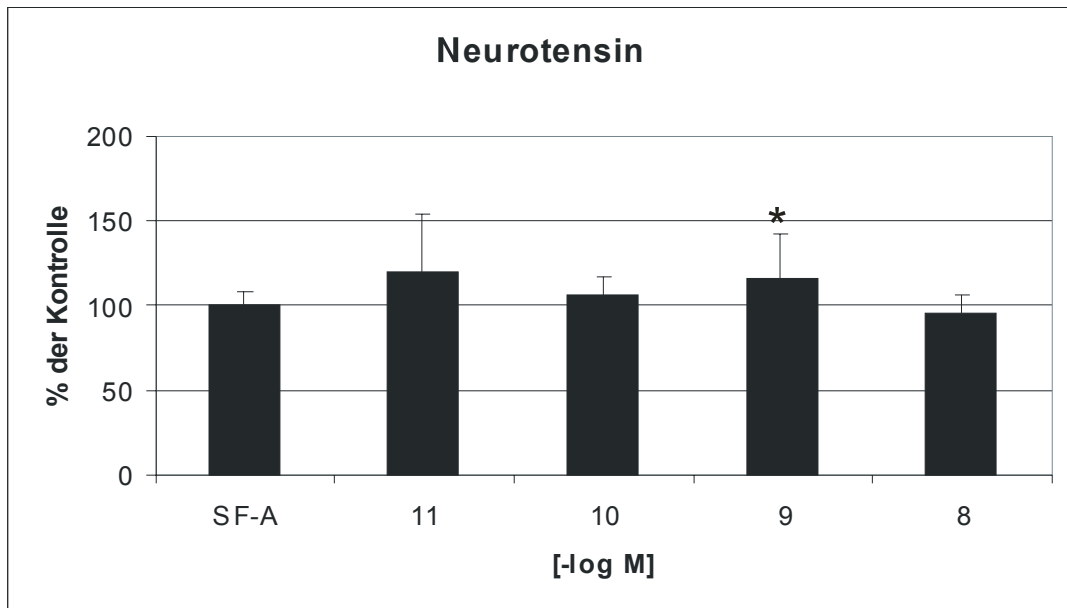
Diag.16: Effekt von Substanz P auf das Wachstum der IEC-6-Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Substanz P wurde in Konzentrationen von 10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M und 10⁻⁵ M untersucht. * p≤0,05 für SF-A gegen getestete Konzentration

Die Stimulationsversuche mit Galanin ergaben einen proliferationsfördernden Effekt auf IEC-6 Zellen bei Stimulation durch 10^{-11} M (8,52%) und 10^{-9} M (6,58%) Galanin. Die größte Wachstumszunahme wurde mit 8,52% bei 10^{-11} M beobachtet. Versuche mit 10^{-8} M und 10^{-7} M ergaben keine signifikanten Änderungen der Proliferation. Eine Inkubation mit 10^{-10} M Galanin bewirkte eine sehr geringe, allerdings bereits signifikante Wachstumshemmung (-1,72%).



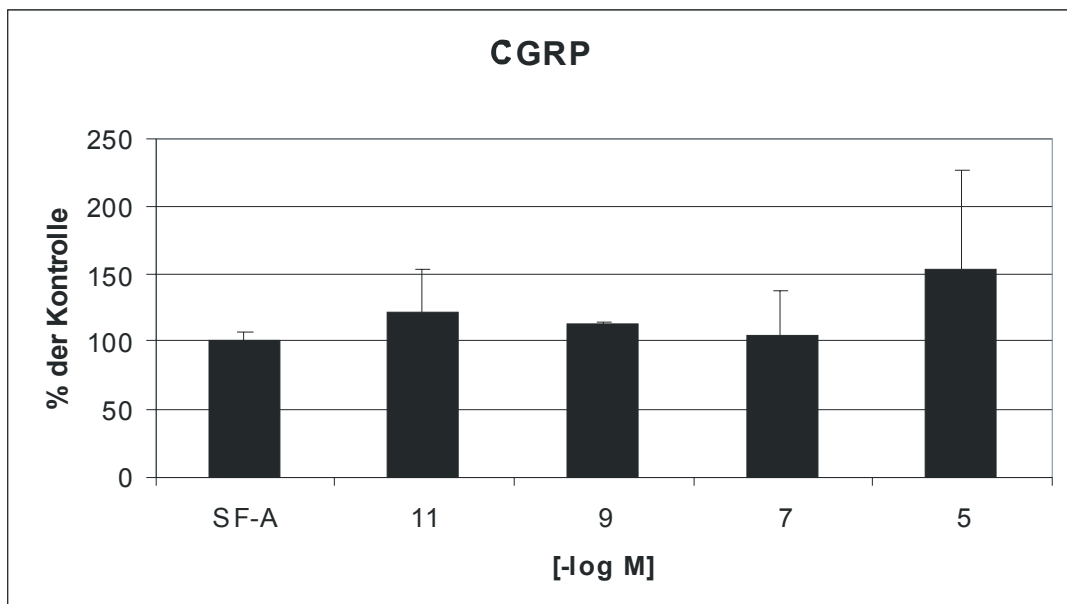
Diag.17: Effekt von Galanin auf das Wachstum der IEC-6-Zelllinie durch 3 H-Thymidininkorporationsassay. Galanin wurde in Konzentrationen von 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M untersucht. * $p \leq 0,05$ für SF-A gegen getestete Konzentration

Neurotensin ist in Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-8} M untersucht worden. Es konnte eine Zunahme der 3 H-Thymidininkorporation um 19,11% (10^{-11} M), 6,13% (10^{-10} M) und 16,23% (10^{-9} M) gemessen werden, wobei lediglich Versuche mit 10^{-9} M signifikante Ergebnisse erbrachten. Bei Zugabe von 10^{-8} M zeigte sich eine Abnahme des Zellwachstums.

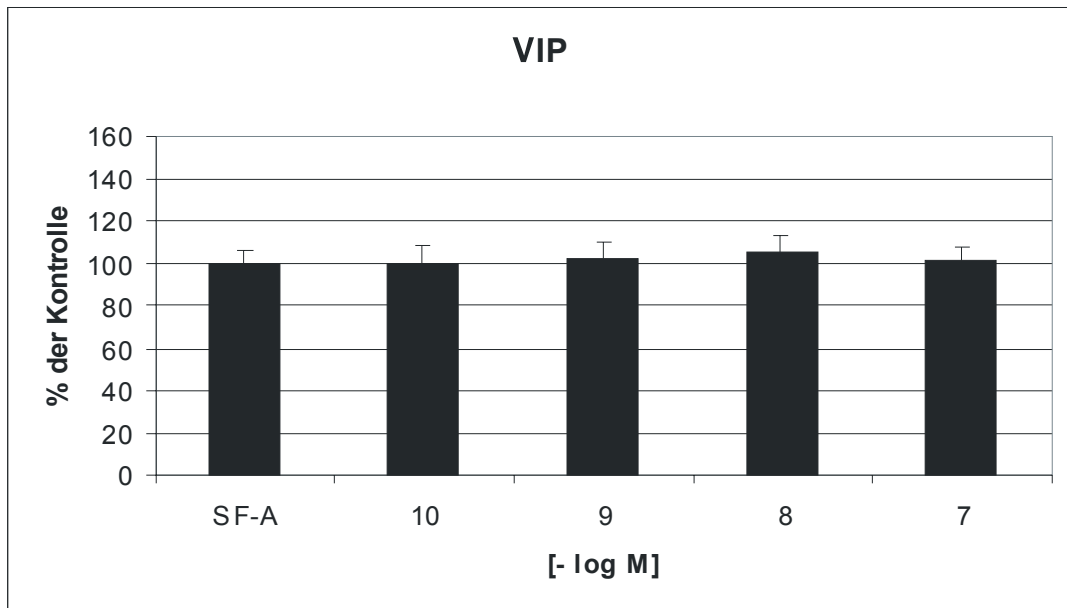


Diag.18: Effekt von Neurotensin auf das Wachstum der IEC-6-Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Neurotensin wurde in Konzentrationen von 10⁻¹¹M, 10⁻¹⁰M, 10⁻⁹ M und 10⁻⁸M untersucht. * p≤0,05 für SF-A gegen getestete Konzentration.

Die im weiteren untersuchten Neuropeptide CGRP und VIP zeigten keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Epithelzellreihe IEC-6 (Diag.19 und Diag.20).



Diag.19: Effekt von CGRP auf das Wachstum der IEC-6-Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. CGRP wurde in Konzentrationen von 10⁻¹¹M, 10⁻⁹M, 10⁻⁷M und 10⁻⁵M untersucht. CGRP zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Epithelzellreihe IEC-6.



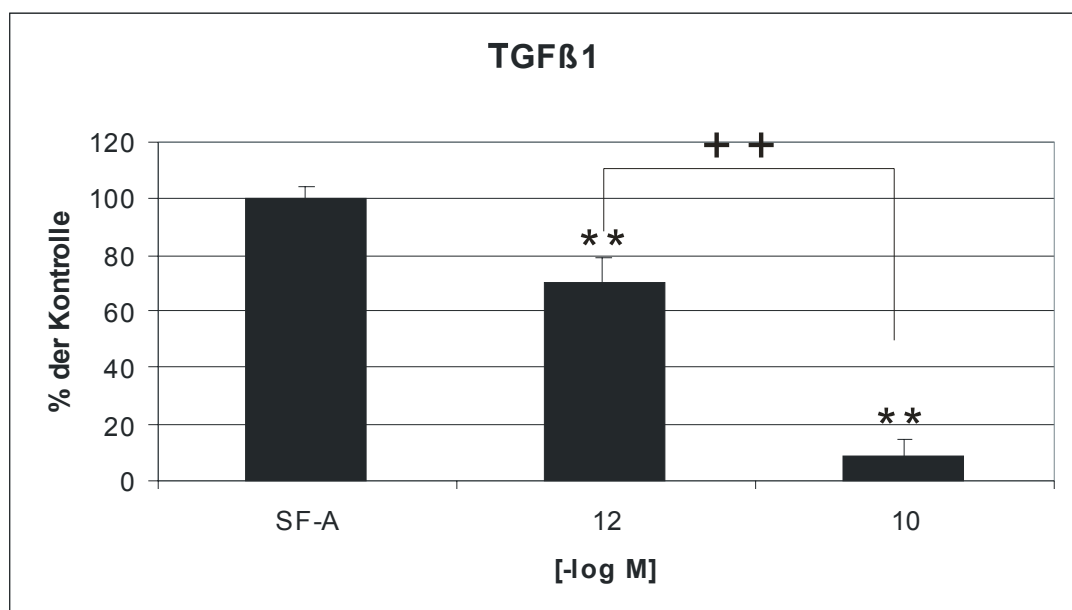
Diag.20: Effekt von VIP auf das Wachstum der IEC-6-Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. VIP wurde in Konzentrationen von 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M und 10^{-7}M untersucht. VIP zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Epithelzellreihe IEC-6.

3.3.5 TGF β ₁ und Somatostatin

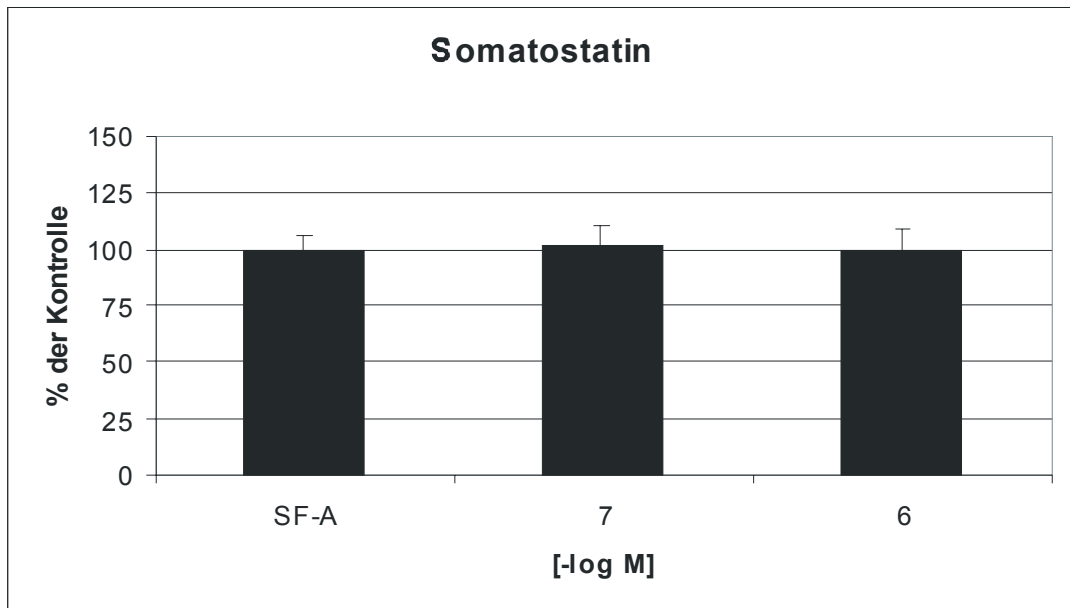
Besonders interessant erscheinen Peptide, die als Einzelsubstanz oder in Kombination mit anderen, einen proliferationshemmenden Einfluss auf das IEC-6-Zellwachstum haben. Einen inhibierenden Effekt konnten wir im Rahmen unseres Projektes für Somatostatin und TGF β ₁ nachweisen.

TGF β ₁ führte in allen untersuchten Konzentrationen zu einer sehr deutlichen Reduktion des Zellwachstums. Es wurde bereits für Konzentrationen ab 10^{-12} M ein signifikanter ($p \leq 0,001$) Effekt beobachtet; Eine maximale Wachstumsinhibition erfolgte bei einer Inkubation mit 10^{-10} M. Es wurde eine dosisabhängige Abnahme der ³H-Thymidininkorporation in IEC-6-Zellen auf 70,18%, bzw. 8,60% gemessen. Dieser Effekt war nicht von der Anwesenheit anderer Faktoren abhängig, wurde aber auch in Kombination mit allen anderen, simultan getesteten Substanzen beobachtet (Diag.21).

Somatostatin zeigte als Monosubstanz keinen signifikant inhibierenden Effekt auf mit SF-A-Medium inkubierte IEC-6-Zellen. Mit 10^{-7} M und 10^{-6} M durchgeführte Versuche ergaben nicht signifikante Ergebnisse mit 1,82% bzw. -0,13% für 10^{-7} M bzw. 10^{-6} M (Diag.22).



Diag.21: Effekt von TGF β ₁ auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie durch ³H-Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von TGF β ₁ wurde in Konzentrationen von 10^{-12} und 10^{-10} M untersucht. ** $p \leq 0,001$ für SF-A gegen getestete Konzentration, ++ $p \leq 0,001$ für zwei Konzentrationen einer Substanz



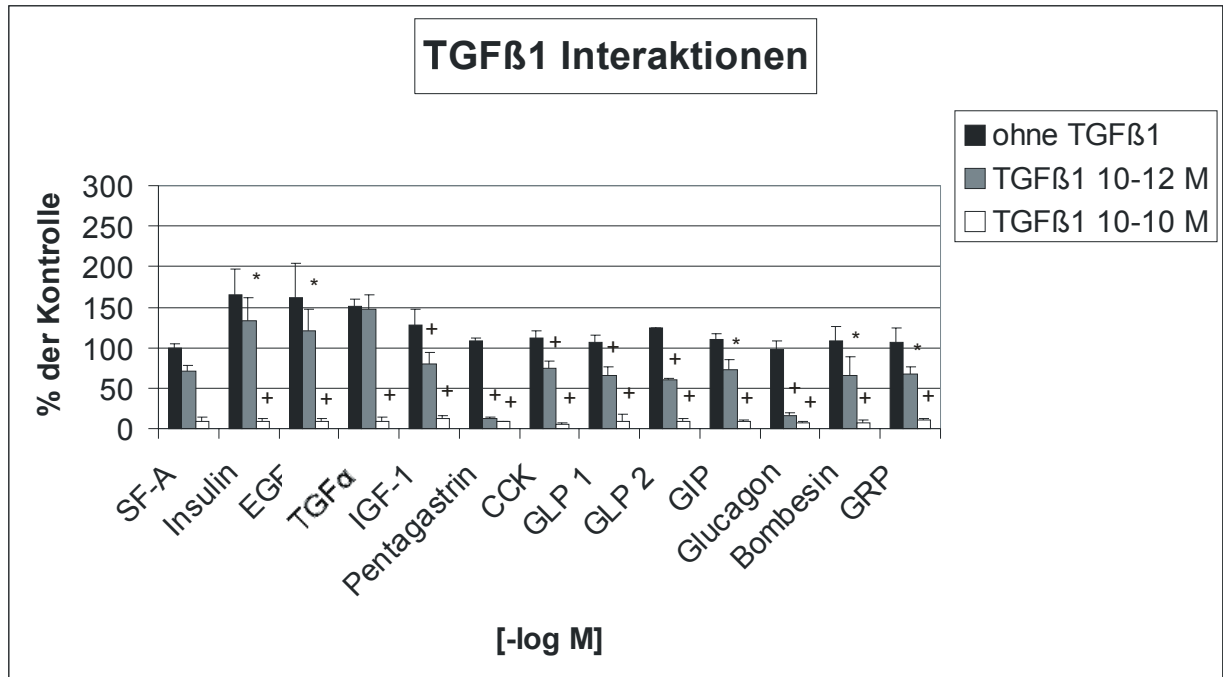
Diag.22: Effekt von Somatostatin auf das Wachstum der IEC-6-Zelllinie durch ^3H -Thymidininkorporationsassay. Die Wirkung von Somatostatin wurde in Konzentrationen von 10^{-7}M und 10^{-6}M untersucht, es konnte keine signifikante Änderung der Proliferation nachgewiesen werden.

3.3.6 Interaktionen getesteter Peptide mit TGF β ₁ und

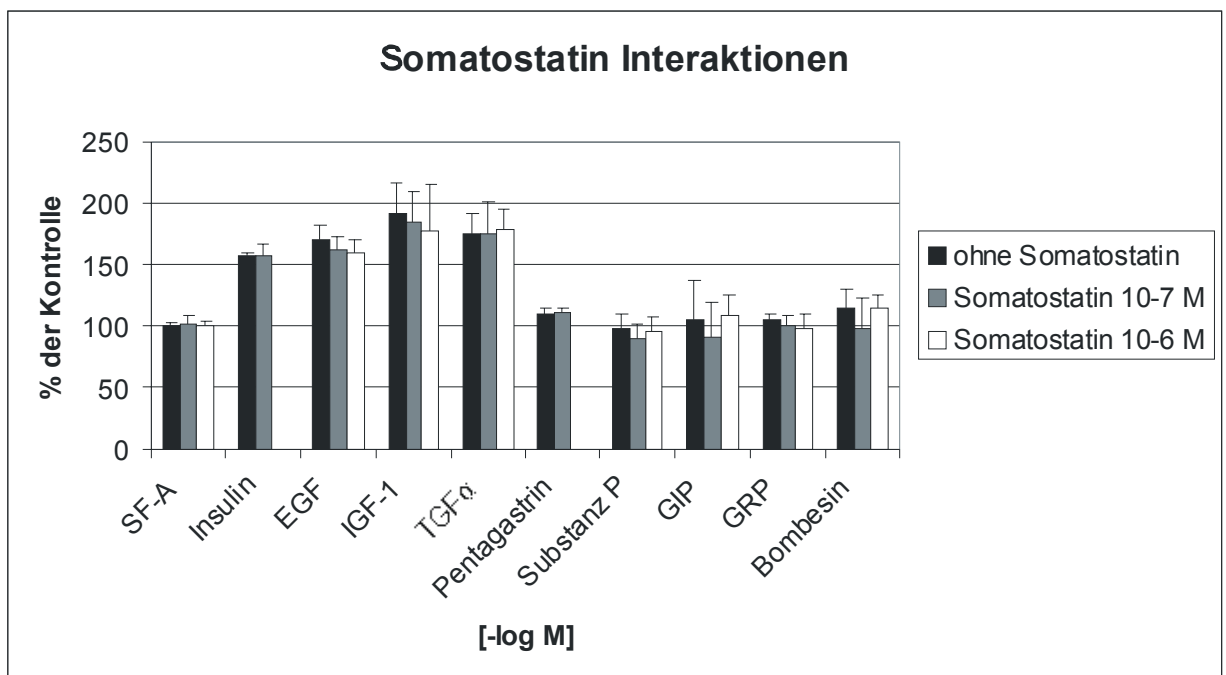
Somatostatin

Aufgrund der stark wachstumshemmenden Wirkung von TGF β ₁ auf mit SF-A-Medium inkubierte IEC-6-Zellen wurden weitere Versuche mit TGF β ₁ durchgeführt. Nun interessierte, ob TGF β ₁ in Kombination mit anderen Peptiden ebenfalls eine wachstumshemmende Wirkung hat und somit durch andere Peptide hervorgerufenes Wachstum reduzieren oder sogar aufheben kann. TGF β ₁ wurde zusammen mit Insulin, EGF, TGF α , IGF-1, Pentagastrin, CCK, GLP-1, GLP-2, GIP, Glucagon, Bombesin und GRP jeweils in Konzentrationen von 10⁻¹²M und 10⁻¹⁰M inkubiert (Diag.23). Wir stellten bei Kombination von TGF β ₁ mit sämtlichen getesteten Substanzen einen inhibierenden Effekt fest. Es konnte gezeigt werden, dass TGF β ₁ in einer Konzentration von 10⁻¹²M eine partiell antagonisierende Wirkung hat. In einer Konzentrationen von 10⁻¹⁰M wurde ein maximaler Effekt beobachtet (Tab.2), hier ging die ³H-Thymidinaufnahme um 85%- 94% im Vergleich zur Inkubation der respektiven Substanz ohne TGF β zurück.

Da Somatostatin als Monosubstanz im Rahmen unseres In-vitro-Modells keinen modulierenden Einfluss auf das Wachstum der in SF-A-Medium inkubierten Zellen zeigte, sollte untersucht werden, ob in Kombination mit anderen Faktoren und somit auf vorstimulierte Zellen ein Effekt auftritt. Hierzu wurde Somatostatin in Kombination mit Insulin, EGF, IGF-1, TGF α , Pentagastrin, Substanz P, GIP, GRP und Bombesin inkubiert (Diag.24, Tab.3). Versuche mit IGF-1 zeigten eine geringe, nicht signifikante Abnahme der ³H-Thymidinaufnahme. Ansonsten konnte bei keiner der getesteten Substanzen eine Modulation des IEC-6-Zellwachstums durch Zugabe von Somatostatin beobachtet werden.⁷



Diag.23: Kostimulation von TGFβ₁ in Konzentrationen von 10⁻¹²M und 10⁻¹⁰M mit verschiedenen Peptiden. Insulin, Pentagastrin, GLP-1, GLP-2, GIP, Bombesin und GRP sind in Konzentration von 10⁻⁷M untersucht worden, EGF, TGFα, IGF-1 und Glucagon wurden in Konzentrationen von 10⁻⁸ M getestet. CCK wurde in einer Konzentration von 10⁻⁶M für die Versuche verwendet. Die Zugabe von 10⁻¹²M TGFβ₁ führte bei allen untersuchten Substanzen zu einer signifikanten Reduktion des IEC-6-Zellwachstums, bei Testung mit TGFβ₁ in einer Konzentration von 10⁻¹²M konnte eine Wachstumssuppression um 85%-94% im Vergleich zum Ausgangswert festgestellt werden. * für p≤0,05 zwischen getesteter Substanz ohne TGFβ₁ und mit TGFβ₁; + für p≤0,001 zwischen getesteter Substanz ohne TGFβ₁ und mit TGFβ₁



Diag.24: Kostimulation von Somatostatin in Konzentrationen von 10⁻⁷M und 10⁻⁶M mit Insulin, EGF, IGF-1, TGFα, Pentagastrin, Substanz P, GIP, GRP und Bombesin

4. Diskussion

Die für diese Arbeit verwendeten IEC-6-Zellen sind aus der Gattung *rattus norvegicus* (Ratte) stammende, nicht entartete Dünndarmzellen, die von dieser Spezies isoliert worden sind. Im Rahmen der Etablierung dieser Zelllinie wurden Antikörperuntersuchungen durchgeführt, um die genaue Herkunft der Zellen zu klären. Dabei sind antigene Determinanten, die sowohl in Dünndarmkryptenzellen wie auch in Villuszellen vorkommen, nachgewiesen worden. Allerdings fehlten die für differenzierte Villuszellen typischen Proteine auf der Oberfläche, wohingegen Oberflächenproteine undifferenzierter Kryptenzellen nachgewiesen werden konnten.⁵⁵ Dennoch zeigen IEC-6-Zellen vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens²⁸ und bei Wachstum auf extrazellulärer Matrix⁸ die funktionellen und morphologischen Kriterien von Enterozyten des Villusbereiches. Es handelt sich um epitheloide Zellen mit großem zentralgelegenen Kern und einer Zyklusdauer von 19-22h. Es finden sich Kolonien polygonaler Zellen mit relativ weiten Interzellularspalten.⁵⁴ Nach Quaroni et al.⁵⁴ zeigten Analysen der Ultrastruktur das Vorkommen von Mikrovilli, Tight Junctions und einen ausgeprägten Golgi-Apparat; sie weisen einen normalen diploiden Karyotyp auf und bilden in Monolayerkulturflaschen einen konfluenten Zellrasen. Nichttransformierte Dünndarmepithelzellen von Ratten stellen ein gutes Substrat für In-vitro-Kultur über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten dar, weswegen sie auch für unsere Versuche verwendet worden sind.

4.1 Zellwachstum unter serumfreien Bedingungen

Das Wachstum der nichttransformierten intestinalen Epithelzellreihe IEC-6 ist vornehmlich von FCS und Insulin abhängig, weswegen diese Substanzen vielen Kulturmedien zugesetzt werden, um eine Proliferation der Zellen sicherzustellen. Bei der Durchführung von Proliferationsversuchen ist es unter diesen Bedingungen allerdings problematisch, beobachtete Effekte allein der untersuchten Substanz und nicht einer unbekanntem Interaktion mit diesen Mediumbestand-

teilen zuzuordnen. Deshalb wurde von uns ein Medium entwickelt bei dem FCS durch andere Substanzen ersetzt worden ist.

Bei der Entwicklung von Zellkulturmedien ist besonders darauf zu achten, dass hiermit kultivierte Zellen keine degenerativen Veränderungen wie z.B. eine fibroplastische Struktur aufweisen, keine erhöhte Apoptoserate besitzen, sich weiterhin in den Zellverband eingliedern und eine normale Mitoserate aufweisen.

Jumarie et al.³³ etablierten anhand der Zelllinie Caco-2 ein FCS-freies Medium, welches stattdessen eine Kombination aus Insulin, Transferrin und Selen enthält. In weiteren Studien erfolgte die Aussaat auf eine mit Kollagen und FCS belegte Platte, wobei die Zellen in einem serumfreien, 0,1% BSA (Rinderserumalbumin) enthaltenden Medium suspendiert waren. Ko et. al.^{39,40} konnten in ihren Versuchen zeigen, dass sogar der stark proliferative Effekt von EGF durch die Zugabe von FCS maskiert worden ist. Daher erscheint es erst recht wahrscheinlich, dass der mitogene Stimulus von FCS den Nachweis weit weniger potent wirkender Polypeptide verhindert.

Andererseits führt die Kultur von IEC-6 Zellen in Mangelmedien wie DMEM, ohne weitere Zusätze, zu einer Alteration der Zellmorphologie. Versuche von Scheving sowie Nicoletti et al. zeigten, dass die Inkubation von IEC-6-Zellen unter Mangelbedingungen zu einem Arrest von Zellzyklus⁶⁵ und Apoptose⁴⁹ führt. Dies hat wiederum eine Alteration der Rezeptorenexpression, z.B. des EGF-Rezeptors, zur Folge und kann darüber hinaus die Zellempfindlichkeit gegenüber Wachstumsmodulatoren verändern⁶¹.

Durch Entwicklung des SF-A-Mediums steht nun ein FCS-freies Zellkulturmedium zur Verfügung, mit dem IEC-6-Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden können, ohne eine Veränderung ihrer morphologischen Struktur oder eine Alteration ihres Wachstumsverhaltens zu zeigen. Der Ersatz des stark mitogenen FCS durch Fetuin und Transferrin sowie der Verzicht auf Insulin hat zu einem Medium geführt, das den geringst möglichen stimulierenden Effekt auf IEC-6-Zellen hervorruft.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Mit SF-A-Medium gezüchtete Zellen verändern weder ihre Struktur noch weisen

sie eine erhöhte Apoptoserate auf und besitzen eine gewisse Grundproliferationsaktivität.

Des weiteren verhalten sich mit SF-A-Medium inkubierte Zellen ähnlich wie mit FCS-haltigem Medium kultivierte, weisen aber eine geringere Mitoserate und Proliferationsgeschwindigkeit auf. Es ist somit erstmals möglich, geringgradige Effekte verschiedener Peptidhormone aufzuzeigen, die bisher durch die starke Grundstimulation FCS- oder insulinhaltiger Medien maskiert waren.

Die Anwendung von SF-A-Medium und FCS-haltigem Medium bei der Durchführung des ^3H -Thymidineinbaus hat weitere Vorzüge:

In jedem Versuch ist mit Zugabe des SF-A-Mediums ein Grundwert enthalten, der das Basiswachstum der IEC-6-Zellen repräsentiert.

Daneben wird durch Inkubation der Zellen mit FCS-haltigem Medium ein sehr starker Wachstumsstimulus appliziert, so dass man eine Kontrolle erhält, ob die Zellen auf Proliferationsreize reagieren und somit der Versuch verwertbar ist.

Es zeigte sich, dass um verwertbare Versuche zu erhalten, eine Inkubationsdauer von mehr als 8h erforderlich ist. Dies führen wir darauf zurück, dass IEC-6-Zellen eine Latenzzeit benötigen, um auf verschiedene Peptidhormone mit einer Proliferationssteigerung zu reagieren. Dies zeigte sich in negativen Ergebnissen bei Inkubationszeiten bis 8h. Wohingegen dieselben Substanzen bei längerer Inkubation eine deutliche Proliferation zeigten.

Das Wachstum von IEC-6-Zellen ist des weiteren von der Zelldichte⁶ abhängig, da nur so Nebeneffekte durch verminderten Zellkontakt bzw. durch Wachstumshemmung bei erreichter Subkonfluenz verhindert werden können, wie auch Björk et al.⁶ zeigen konnten.

4.2 Intestinale Wachstumsregulation

Für die Regulation des intestinalen Wachstums sind neben Art und Menge des sezernierten Hormons und Wachstumsfaktors auch unterschiedliche Freisetzungswegen entscheidend. Neben der endokrinen und parakrinen Sekretion interessiert zunehmend auch eine Sekretion direkt in das gastrointestinale Lumen.

Die Freisetzung verschiedener Hormone und Wachstumsfaktoren in das Darm-lumen erfolgt in hohen Konzentrationen und ist neurohormonell reguliert. All dies weist darauf hin, dass es sich hierbei nicht um eine Randerscheinung der endokrinen Sekretion handelt. Vielmehr wird wegen der Stabilität⁶⁷ und der biologischen Aktivität im Lumen davon ausgegangen, dass dies ein Vorgang mit erheblicher physiologischer Bedeutung ist.⁵⁷ Die Erforschung derjenigen Faktoren, die das Wachstum intestinaler Epithelzellen regulieren, ist ein essenzieller Bestandteil für das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der gastrointestinalen Schleimhaut.

Nach partieller Dünndarmresektion, wegen neoplastischer Erkrankungen oder Stenosen wie z.B. bei Morbus Crohn, unterliegen die verbleibenden Darm-anteile einer strukturellen sowie funktionellen Anpassung. Dies führt zu einer Zunahme der verbleibenden Darmoberfläche und vermehrter Nährstoff-absorptionsfähigkeit, um den Verlust funktioneller Darmschleimhaut zu kompensieren.

Die Aufnahme von Nahrungsstoffen scheint den stärksten Stimulus für diese Adaptation zu liefern. Allerdings sind untergeordnete Faktoren noch nicht hinreichend erforscht. Enterale Ernährung kann direkt eine Anpassung der Darmschleimhaut bewirken, wohingegen über das Gefäßsystem bereitgestellte Substrate ineffektiv sind und keine intestinale Adaptation hervorrufen. Gastrointestinale Hormone und Neuropeptide werden ebenfalls durch im Lumen vorhandene Nahrungsbestandteile aktiviert, wohingegen intravaskulär vorhandene Nährstoffe keinen Effekt zeigen. Somit scheinen intraluminale Hormone und Neuropeptide ebenfalls als Mediatoren für die enterale Adaptation zu dienen. Im Falle kompletter parenteraler Ernährung (TPN) prädisponiert die

intestinale Atrophie zur systemischen Ausbreitung von Bakterien und Toxinen¹ und erschwert den Wiederaufbau einer enteralen Nutrition. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von Wachstumsfaktoren zur Nahrung die Nährstoffabsorption fördert.⁷

4.2.1 Intestinotrophe Peptidhormone

Die Peptidhormone EGF und IGF-1 gehörten zu den ersten Substanzen, bei denen sich nach enteraler Zufuhr ein intestinotropher Effekt zeigte^{45,50,79}. Dieser der intestinalen Atrophie entgegenwirkende Einfluss gastrointestinaler Hormone scheint von physiologischer Bedeutung zu sein, da die Sekrete des oberen Gastrointestinaltraktes reich an EGF und IGF-1 sind und diese Substanzen eine relativ hohe Resistenz gegenüber Inaktivierung durch Trypsin oder niedrigen pH-Wert zeigen. Darüber hinaus demonstrierten Ulshen et al.⁷⁴, dass enteral zugeführtes EGF die Ausbildung einer TPN induzierten intestinalen Atrophie verhindert und die gemessenen Konzentrationen im physiologischen Bereich liegen.^{74,75} Im Rahmen dieser Versuche wurde erwachsenen Ratten über eine chirurgisch implantierte Ileumsonde EGF infundiert und im Anschluss eine signifikante Zunahme von Ornithine-Carboxylase und DNA-Gehalt der Schleimhaut gemessen ($p \leq 0,05$).⁷⁴

Schwartz et al.⁶⁶ zeigten, dass sowohl die systemische wie auch die luminale Applikation von EGF, bei kontinuierlicher Zufuhr über 14 Tage, zu einer signifikanten Zunahme der Absorption von Galaktose und Glycin führt, wenngleich in diesem Modell die Zunahme der DNA-Konzentration statistisch nicht signifikant war.^{66,75}

Versuche mit IGF-1-transgenic-Mäusen zeigten eine dissimierte Organomegalie, weswegen die Zufuhr von systemisch zugeführten Wachstumsfaktoren Grund zur Vorsicht gibt.⁴⁶ Vor allem im Hinblick auf neoplastische Erkrankungen werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um potentiellen Nutzen und Risiken einer Therapie mit intestinotropen Substanzen abschätzen zu können.

Einer der in diesem Rahmen untersuchten Faktoren ist GLP-2, ein potentes intestinotrophes Hormon, das in L-Zellen des Ileums sowie des Colons produziert wird. Intraperitoneal zugeführtes GLP-2 erhöht die Proliferation der Kryptenzellen und ruft eine Dickenzunahme der Dünndarmschleimhaut nach Resektion von Darmanteilen hervor und verhindert TPN induzierte Villusatrophie.¹⁷ Unsere Versuche zeigten, dass GLP2 einen wachstumsfördernden Effekt auf IEC-6 Zellen hat, wenngleich Jasleen et. al einen wachstumsfördernden Effekt nur für Caco-2 und T84 Zellen und nicht für IEC-6-Zellen nachweisen konnten.³⁰

Ein direkt wachstumsstimulierender Effekt durch Phosphatidylinositide-(PI)3-kinase und mitogenaktivierte Proteinkinase ist beobachtet worden.^{29,72} Neuere Untersuchungen festigen die Ergebnisse vorangegangener Studien⁶⁰ an L-Zellen und weisen darauf hin, dass die Sekretion von GLP-2 in gesunden Menschen ernährungsabhängig variiert und teilweise durch GIP vermittelt wird⁷⁸. GIP ebenso wie GLP-1, die vornehmlich nach Nahrungszufuhr sezerniert werden, sind wichtige Stimulatoren der glukoseabhängigen Insulinsekretion^{3,73} und zeigten in unseren Experimenten beide einen direkten mitogenen Effekt auf das Wachstum der IEC-6 Zelllinie.

4.2.2 Neuropeptide

Die Ergebnisse unserer Versuche deuten auf einen direkten wachstumsregulierenden Effekt der Neuropeptide Bombesin, GRP, Substanz P, Galanin und Neotensin hin, ein Effekt, der bisher noch nicht an nichttransformierten Epithelzellreihen untersucht und nachgewiesen werden konnte.

Bombesin und das bei Säugetieren vorkommende Analogon GRP zeigten an verschiedenen Adenokarzinomzelllinien²³ in vitro eine proliferationssteigernde Wirkung. Im Tierversuch mit Katzen erhöhten intravenös appliziertes Bombesin und Somatostatin die Gastrinfreisetzung. Im Gegensatz dazu wurde bei luminaler Applikation von Somatostatin eine Hemmung der Gastrinsekretion beobachtet⁵⁷. Auch Änderungen des intraluminalen pH-Wertes sowie der Nahrungszusammensetzung modulieren die luminal Peptidfreisetzung.⁵⁷

GRP bindet an den aus 7 Transmembrandomänen bestehenden G-Protein gekoppelten GRP-Rezeptor (GRP-R)⁷¹, der in submukösen und myenterischen Nervenplexi vorkommt und die anliegende glatte Muskelschicht innerviert. Daraus resultiert eine Modulation der intestinalen Kontraktion und Peristaltik. In Mäusen, Schweinen und Ratten exprimieren auch intestinale Epithelzellen im gesamten Gastrointestinaltrakt diesen Rezeptor. Im Gegensatz dazu befinden sich im menschlichen Gastrointestinaltrakt GRP-Rezeptoren nur im Magen-antrum.²² Besonders hervorzuheben ist, dass bei Kolonkarzinomen in 24–40%⁵⁵ eine Expression dieses Rezeptors gefunden werden konnte.

Neben den Effekten von GIP und GLP-1 konnten wir im Gegensatz zu Björk et al., dessen Experimente mit 2,5% FCS-haltigem Medium durchgeführt wurden⁶, einen leichten, aber signifikanten proliferativen Effekt von Substanz P nachweisen. Es wird diskutiert, dass Peptide wie z. B. Substanz P von peripheren Nerven als Antwort auf Entzündung und Gewebereparatur freigesetzt werden^{26,51}. Eine wachstumsmodulierende Wirkung konnte bisher nur für mesenchymale Zelllinien gezeigt werden.

Auch die Neuropeptide Galanin und Neurotensin riefen in unserem Modell eine geringgradige, bereits signifikante Wachstumsstimulation an IEC-6-Zellen hervor, wengleich andere Neuropeptide keine Proliferationsänderung bewirkten. Zachrisson et al. hingegen konnten keine Änderung des Zellwachstums von IEC-6 und FHS-74 durch Inkubation mit Neurotensin nachweisen, wengleich Sie bezüglich EGF und CGRP mit unseren Ergebnissen vergleichbare Resultate erzielten.⁸¹

VIP, dessen Rezeptorexpression in einigen epithelialen Karzinomzelllinien ebenfalls einen wachstumsregulierenden Effekt auf intestinale Epithelien vermuten ließ, zeigte ebenso wie CGRP in unseren Versuchen und in denen anderer^{6,81}, keine Veränderung des Wachstums der nichttransformierten IEC-6-Zellreihe.

4.2.3 Proliferationsinhibierende Substanzen

Die Forschung der letzten Jahre hat für eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Peptidhormonen und, wie unsere Experimente zeigten, von Neuropeptiden eine proliferationsfördernde Wirkung auf intestinale Zellen nachgewiesen. Allerdings sind nur wenige Faktoren bekannt, die zu einer Wachstumshemmung führen. Bereits 1939 wurde über eine die Magensäuresekretion inhibierende Substanz diskutiert. Wobei es sich scheinbar um Somatostatin handelte, zumal mittlerweile bekannt ist, dass Somatostatin ein potenter Magensäuresekretionshemmer ist und in Antral- und Duodenalperfusate abgegeben wird. Somatostatin produzierende D-Zellen finden sich vornehmlich in antraler Mucosa sowie im Dünndarm. Bei Erwachsenen findet man vor allem Somatostatin 14 im Magensaft. Das Pankreas produziert Somatostatin in den D-Zellen der Langerhansschen-Inseln. Diese sezernieren Somatostatin endokrin, parakrin und ins gastrointestinale Lumen.² In früheren Studien mit Ratten konnte gezeigt werden, dass Somatostatin die DNA-Synthese in der Jejunalschleimhaut reduziert und zu einer Abnahme des Organgewichtes führt.⁵⁹

Ein proliferationsinhibierender Effekt konnte von uns nur bei simultaner Stimulation mit IGF-1 beobachtet werden: Bei diesen Versuchen führte die Zugabe von Somatostatin zu einer Reduktion der EGF induzierten Proliferationssteigerung. Weder in unseren Versuchen noch in denen von Björk et al.⁶ zeigte Somatostatin als Monosubstanz einen messbaren Einfluss auf das Zellwachstum. Durch IGF-1 hervorgerufene Proliferationssteigerungen konnten durch die Zugabe von Somatostatin verringert werden. Wenngleich der genaue Wirkungsmechanismus der somatostatinvermittelten Inhibition des Zellwachstums noch nicht erforscht ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt auf einer Aktivierung der GTP abhängigen Untereinheit der Adenylatzyklase oder einer Aktivierung der zytosolischen Phosphoproteinphosphatase beruht.⁴²

Im Gegensatz zu der durch Somatostatin bewirkten partiellen Reduktion des ³H-Thymidineinbaues in Anwesenheit von IGF-1 zeigt TGF β_1 einen deutlich ausgeprägteren Effekt. TGF β_1 rief bei allen getesteten Substanzen eine Wachstumshemmung hervor. Die Effekte des Transforming Growth Factors β_1

werden einer zellzyklusspezifischen Kontrolle der Genexpression zugeschrieben. Diese beruht auf einer Blockade der Zyklusprogression in der Mitte der G₁-Phase, die vermutlich durch Regulation der cdc2 Genexpression bewirkt wird.⁴⁰

Barnard et al.⁵ konnten eine örtlich genau festgelegte Expression von TGFβ₁ mRNA entlang der Migrationsachse vom Kryptenbereich hin zur Villusspitze zeigen. Die maximale Expression fand sich in den ausdifferenzierten Zellen der Villusspitze, wohingegen die geringsten Konzentrationen in mitotisch noch aktiven Kryptenzellen zu finden waren. Van't Land et al. konnten einen mucosaprotektiven Effekt von TGFβ₂ im Rahmen von Schleimhautschäden durch Radiochemotherapie zeigen.⁷⁶

Neben dem Einsatz intestinotropher gastrointestinaler Peptidhormone im Rahmen einer komplett parenteralen Ernährung kommt den von uns untersuchten inhibierenden Substanzen eine wichtige Rolle zu, da neben der Wachstumshemmung in vitro und ihrem Einfluss auf nichttransformierte Zellen ein Effekt auf maligne neoplastische Zellen möglich ist. Weitere Studien und Versuche sind nötig, um einen möglichen Sinn des Einsatzes von TGFβ₁ oder Somatostatin bzw. von Derivaten dieser Stoffe in der antineoplastischen Therapie zu klären.

5. Schlussfolgerung

Die komplexe Wachstumsregulation des gastrointestinalen Epithels mit endokrinen, parakrinen sowie luminalen Faktoren ist zur Zeit noch nicht gänzlich verstanden. Es wird vermutet, dass verschiedene, bisher nur wenig untersuchte Hormone und Neuropeptide neben bekannten Wachstumsfaktoren ebenfalls einen direkten Effekt auf die Proliferation von intestinalen Epithelzellen besitzen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass IEC-6 Zellen in Zellkultur auf verschiedene Wachstumsfaktoren, gastrointestinale Hormone und Neuropeptide mit Stimulation oder Inhibition der DNA-Synthese reagieren. Durch die Verwendung des FCS-freien Mediums SF-A konnten wachstumsstimulierende Effekte von Polypeptiden wie GLP-1, GLP-2, GIP, Bombesin, GRP, Galanin, Neurotensin und Substanz P nachgewiesen werden, da eine Maskierung der Effekte, wie sie bei Versuchen mit FCS-haltigem Medium zu beobachten waren, wegfällt. Die festgestellten Effekte waren in ihrer trophischen Wirkung geringer als diejenigen von Faktoren, wie IGF-1, EGF oder Insulin, deren proliferative Potenz bereits bekannt ist.^{6,40}

Die Ergebnisse geben weiteren Aufschluss über den Einfluss enteroendokriner Faktoren sowie einiger Neuropeptide auf die Aufrechterhaltung einer intakten Dünndarmschleimhaut. Diese Erkenntnis ist von Bedeutung, weil die Sekretion einiger Substanzen von der enteralen Nahrungsaufnahme abhängig ist und somit eine Substitution bei Patienten, die komplett parenteral ernährt werden müssen, eine TPN induzierte Schleimhautatrophie verhindern kann. Ebenso könnte eine Substitution die enterale Adaptation nach Darmresektion verbessern, obgleich es wegen der Gefahr einer extraintestinalen mitogenen Wirkung noch weiterer Abklärung bedarf.

Das System der Wachstumskontrolle ist immer noch begrenzt verstanden, da die Regulation durch Wachstumsfaktoren, intestinale Hormone, Neuropeptide, und systemische Faktoren sehr komplex ist. Trotz großer Fortschritte sind momentan nur wenige inhibitorisch wirkende Faktoren bekannt. Diese inhibitorisch auf intestinale Zellen wirkenden Substanzen könnten in Zukunft eine wichtige Rolle spielen und auch ihr Einsatz in der Onkologie wird zu

diskutieren sein. Voraussetzung ist die weitere Erforschung der differenzierten Regulationsmechanismen des Gastrointestinaltraktes und eine präzise Kenntnis der Wirkungsweise intestinotropher Substanzen wie IGF-1 oder GLP-2.

6. Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren, Hormone und Neuropeptide, die im Verdauungstrakt von Säugetieren vorkommen wurden bezüglich ihres modulierenden Effektes auf das Wachstum der nichttransformierten Dünndarmepithelzellreihe IEC-6 untersucht. Um ihren Einfluss auf das Wachstum der IEC-6-Zellen zu quantifizieren, verwendeten wir die Methode des ^3H -Thymidineinbaus nach Härkönen et al.²⁵, führten Zellzyklusuntersuchungen mittels FACS-Analyse durch und bestimmten Zellzahl sowie lichtmikroskopische Morphologie der Epithelzellen nach Inkubation mit verschiedenen Kulturmedien.

Um potentielle Effekte diskret stimulierender Substanzen zu demaskieren wurde zunächst ein serumfreies Kulturmedium (SF-A-Medium) entwickelt, das Interaktionen mit Serumbestandteilen sowie eine Vorstimulation, wie sie bei FCS-haltigen Medien auftritt, verhindert. Hierzu ersetzten wir FCS durch unterschiedliche Substanzen und beurteilten Wachstumsverhalten und Morphologie der IEC-6-Zellen nach Inkubation mit diesen Medien.

Das neuentwickelte serumfreie SF-A-Medium enthält 0,1mg/ml Fetuin, 5ng/ml Natrium Selenite, 0,5mg/ml Bovines Serum Albumin und 5 μg /ml Transferrin (Holo-Form).

Durch Verwendung dieses Mediums wurden nicht nur bekannte Resultate mit IGF-1, TGF α , EGF, Insulin und Gastrin reproduziert, es konnte darüber hinaus auch ein direkter mitogener, Effekt weiterer Substanzen aus unterschiedlichen Peptidgruppen nachgewiesen werden. Die Polypeptide CCK (3,51%)^b, GLP-1(7-36NH₂) (36,74%), GLP-2 (26,69%), GIP (42,47%), Bombesin (13,8%), GRP (7,15%), Galanin (8,52%), Substanz P (14,08%) und Neurotensin (19,11%) zeigten einen signifikanten, wenn auch diskreten, proliferationsfördernden Effekt auf das IEC-6-Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle; Andere Substanzen wie CGRP oder VIP hatten in unserem Modell keinen signifikanten Einfluss.

Während die Mehrzahl der Substanzen das Zellwachstum gefördert hat, wirkten nur zwei Substanzen als Inhibitoren: Somatostatin verringerte, grenzwertig nicht

^b Die Zahlen in Klammern geben die größte festgestellte Änderung des DNA-Gehaltes gemessen an der Zunahme des ^3H -Thymidineinbaus in IEC-6-Zellen an. Prozentuale Zunahme im Vergleich zur Kontrolle (100%) nach Inkubation mit SF-A-Medium

signifikant, durch IGF-1 stimuliertes Wachstum, beeinflusste aber weder das Zellwachstum in Kombination mit anderen Substanzen noch das Verhalten unstimulierter Zellen.

TGF β_1 hingegen erwies sich als stark wirksame antiproliferative Substanz, die bei jeder der getesteten Stoffe eine deutliche, signifikante Hemmung des IEC-6-Zellwachstums verursachte. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Proliferationsinhibition zwischen 10^{-12} M und 10^{-10} M TGF β_1 , wobei bei Inkubation mit 10^{-10} M TGF β_1 eine hochgradige Wachstumshemmung zwischen 85% und 94%, im Vergleich zur Kontrolle, auftrat.

Die hier vorliegenden Daten geben einen weiteren Einblick in die Wachstumsregulation des Gastrointestinaltraktes. Die Zufuhr von proliferationsfördernden Peptiden wie z.B. EGF, kann zur Verhinderung einer gastrointestinalen Atrophie und der Unterstützung der intestinalen Adaptation, wie z. B. im Rahmen der komplett parenteralen Ernährung (TPN) oder nach Darmteilresektion, beitragen. Therapeutische Möglichkeiten von, inhibitorisch auf das Wachstum intestinaler Zellen wirkender Substanzen wie TGF β_1 und Somatostatin bedürfen weiterer Studien und ein Nutzen ihres Einsatzes im Bereich der Onkologie wird zu untersuchen sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Alverdy, J.C., Aoye, E. & Moss, G.X. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 185-190 (1988).
2. Arimura, A. & Fishback, J.B. Somatostatin, regulation of secretion. *Neuroendocrinology* 33, 246-256 (1981).
3. Baggio, L., Kieffer, T.J. & Drucker, D.J. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, regulates fasting glycemia and nonenteral glucose clearance in mice. *Endocrinology* 3703-3709 (200).
4. Baliga, B.S., Borowitz, S.M. & Barnard, J.A. Effects of EGF and PMA on the growth and proliferation of IEC-6 cells. *Biochem. Int.* 19, 1045-1056 (1989).
5. Barnard, J.A., Beauchamp, R.D., Coffey, R.J. & Moses, H.L. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1578-1582 (1989).
6. Björk, J., Nilsson, J., Hultcrantz, R. & Johansson, C. Growth-regulatory effects of sensory neuropeptides, epidermal growth factor, insulin and somatostatin on the non-transformed intestinal epithelial cell line IEC-6 and the colon cancer cell line HT 29. *Scand. J. Gastroenterol.* 879-884 (1993).
7. Byrne, T.A., Morrissey, T.B., Nattakom, T.V., Ziegler, T.R. & Wilmore, D.W. Growth hormone, glutamine, and a modified diet enhance nutrient absorption in patients with severe short bowel syndrome. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 19, 296-302 (1995).
8. Carrol, K.M., Wong, T.T., Drabik, D.L. & Chang, E.B. Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am. J. of Physiol.* G355-G360 (1988).
9. Chao, J.C. & Donovan, S. Effects of insulin, insulin-like growth factors and epidermal growth factor on mitogenesis and disaccharidase activity in rat (IEC-6) and human (FHs 74 Int) intestinal cells. *Chin J. Physiol.* 39, 253-263 (1996).
10. Chen, K., Nezu, R., Wasa, M., Sando, K., Kamata, S., Takagi, Y., Okada, A.. Insulin-like growth factor-1 modulation of intestinal epithelial cell restitution. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 23, S89-S92 (1999).
11. Ciacci, C., Lind, S.E. & Podolsky, D.K. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterol.* 105, 93-101 (1993).
12. Conteas, C.N. & Majumdar, A.P. The effects of gastrin, epidermal growth factor, and somatostatin on DNA synthesis in a small intestinal crypt cell line (IEC-6). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 184, 307-311 (1987).
13. Conteas, C.N., McMorrow, B. & Luk, G.D. Modulation of epidermal growth factor-induced cell proliferation and receptor binding by insulin in cultured intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 414-419 (1989).
14. Corps, A.N. & Brown, K.D. Stimulation of intestinal epithelial cell proliferation in culture by growth factors in human and ruminant mammary secretions. *J. Endocrinol.* 113, 285-290 (1987).

15. De Miguel, E., Gomez de Segura, I.A., Bonet, H., Rodriguez Montes, J.A. & Mata, A. Trophic effects of neurotensin in massive bowel resection in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 59-64 (1994).
16. Deeks, S., Richards, J. & Nandi, S. Maintenance of normal rat mammary epithelial cells by insulin and insulin-like growth factor 1. *Exp. Cell Res.* 174, 448-460 (1988).
17. Drucker, D.J., De Forrest, L. & Brubaker, P.L. Intestinal response to growth factors administered alone or in combination with human [Gly2] glucagon-like peptide2. *Am. J. of Physiol.* G1252-G1262 (1997).
18. Drucker, D.J., Erlich, P., Asa, S.L. & Brubaker, P.L. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 7911-7916 (1996).
19. Ethier, S.P., Kudla, A. & Cundiff, K.C. Influence of hormone and growth factor interactions on the proliferative potential of normal rat mammary epithelial cells in vitro. *J. Cell Physiol.* 132, 161-167 (1987).
20. Eysselein, V.E., Reinshagen, M., Cominelli, F., Sternini, C., Davis, W., Patel, A., Nast, C.C., Bernstein, D., Anderson, K., Khan, H. Calcitonin gene-related peptide and substance P decrease in the rabbit colon during colitis. A time study. *Gastroenterol.* 101, 1211-1219 (1991).
21. Fawcett, D.W., Bloom, W. & Raviola, E. A textbook of histology. Chapman & Hall, New York (ed.), 617-626 (1994).
22. Ferris, H.A., Carrol, R.E., Lorimer, D.L. & Benya, R.V. Localization and characterization of the human GRP receptor expressed by gastrointestinal epithelial cells. *Peptides* 663-672 (1997).
23. Ferris, H.A., Carrol, R.E. & Rasenick, M.M. Benya, R.V. Constitutive activation of the Gastrin-releasing peptide receptor expressed by the nonmalignant human colon epithelial cell line NCM 460. *J. Clin. Invest.* 100: 2530-2537, 1997.
24. Guo, Y.S., Townsend, C.M., Jr., Jin, G.F., Beauchamp, R.D. & Thompson, J.C. Differential regulation by TGF-beta 1 and insulin of insulin-like growth factor binding protein-2 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* 268, E1199-E1204 (1995).
25. Härkönen, P.L., Laaksonen, E., Valve, E., Solic, N. & Darbre, P. Temperature-sensitive mutants for steroid-sensitive growth of S115 mouse mammary tumor cells. *Exptl. Cell. Res.* 288-298 (1991).
26. Hodin, R.A., Meng, S. & Shei, A. Bombesin maintains enterocyte phenotype in fasted rats. *Surg.* 426-431 (1994).
27. Hodin, R.A., Saldinger, P. & Meng, S. Small bowel adaptation: counterregulatory effects of epidermal growth factor and somatostatin on the program of early gene expression. *Surg.* 118, 206-210 (1995).
28. Jacobs, E.S., Van Os-Corby, D.J. & Paterson, A.R.P. Expression of sodium-linked nucleoside transport activity in monolayer cultures of IEC-6 intestinal epithelial cells. *Met. Cell. Biol.* 265, 22210-22216 (1990).
29. Jasleen, J. et al. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *Surg. Res.* 13-8 (2000).
30. Jasleen, J., Ashley, S.W., Shimoda, N., Zinner, M.J. & Whang, E.E. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1135-1140 (2002).

31. Jehle, P.M. et al. Differential autocrine regulation of intestine epithelial cell proliferation and differentiation by insulin-like growth factor (IGF) system components. *Horm. Metab. Res.* 31, 97-102 (1999).
32. Johnson, L.R. *Physiology of the gastrointestinal tract.* Raven Press Ltd., 1185, New York (1994).
33. Jumarie, C. & Malo, C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Met. Cell. Biol.* 24-33 (1991).
34. Karimullah, A. Zirvi. Development of serum-free media for the growth of human gastrointestinal adenocarcinoma xenografts as primary tissue cultures. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 515-518 (1991).
35. Karnes, W.E., Jr., Walsh, J.H., Wu, S.V., Kim, R.S., Martin, M.G., Wong, H.C., Mendelsohn, J., Park, J.G., Cuttitta, F. Autonomous proliferation of colon cancer cells that coexpress transforming growth factor alpha and its receptor. Variable effects of receptor-blocking antibody. *Gastroenterol.* 102, 474-485 (1992).
36. King, C.S. & Cooper, J.A. Effects of protein kinase C activation after epidermal growth factor binding on epidermal growth factor receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 261, 10073-10078 (1986).
37. Kissmeyer-Nielsen, P., Christensen, H. & Laurberg, S. Growth hormone treatment of rats with chronic diverting colostomy. Differential response on proximal functioning and distal atrophic colon. *Eur. J. Endocrinol.* 130, 508-514 (1994).
38. Kissmeyer-Nielsen, P., Vinter-Jensen, L. & Smerup, M. Effects of longterm epidermal growth factor treatment on the normal rat colon. *Gut* 38, 582-586 (1996).
39. Ko, T.C., Beauchamp, R.D., Townsend, C.M., Thompson, E.A. & Thompson, J.C. Transforming growth factor β inhibits rat intestinal cell growth by regulating cell cycle specific gene expression. *Am. J. Surg.* 14-20 (1994).
40. Ko, T.C., Yu, W., Sakai, T., Sheng, H., Shao, J., Beauchamp, R.D., Thompson, E.A. TGF-beta1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene* 3445-3454 (1998).
41. Konagaya, T., Kusugami, K., Yamamoto, H., Kaneko, H., Nagai, H., Mitsuma, T. Effect of histamine on thyrotropin-releasing hormone and somatostatin secretion in rat stomach. *Hepatogastroenterology* 45, 567-572 (1998).
42. Kurokawa, M., Lynch, K. & Podolsky, D.K. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor β inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biophys. Res. Com.* 775-782 (1987).
43. Lee, C.Y. & Wright, N.A. Cell proliferation in the small intestine and colon of intravenously fed rats: effects of urogastrone-epidermal growth factor. *Cell Prolif.* 25 (5), 404 (1992).
44. Lewin, M.J.M. Somatostatin receptors. *Scand. J. Gastroenterol.* 42-51 (1986).
45. Litvak, D.A., Evers, B.M., Hellmich, M.R. & Townsend, C.M.Jr. Enterotrophic effects of glucagon-like peptide 2 are enhanced by neurotensin. *Gastrointest. Surg.* 432-439 (1999).
46. Marchbank, T., Goodlad, R.A., Lee, C.Y. & Playford, R.J. Luminal epidermal growth factor is trophic for small intestine of parenterally fed rats. *Clin. Sci.* 117-120 (1995).
47. McCormack, S.A., Viar, M.J. & Johnson, L.R. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. *Am. J. Physiol* 263, G426-G435 (1992).

48. Nebe, Th. Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. Tomas L. (ed.), 1482-1486, TH-Books-Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main,(1998).
49. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Method.* 271-279 (1991).
50. O'Brien, V., Frisch, S.M. & Juliano, R.L. Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation. *Exptl. Cell. Res.* 208-213 (1996).
51. Ohneda, K., Ulshen, M.H., Fuller, C.R., D'Ercole, A.J., Lund, P.K. Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor 1. *Gastroenterol.* 444-454 (1997).
52. Park, J.H., McCusker, R.H., Vanderhoof, J.A., Mohammadpour, H., Harty, R.F., MacDonald, R.G. Secretion of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 by intestinal epithelial (IEC-6) cells: implications for autocrine growth regulation. *Endocrinology* 131, 1359-1368 (1992).
53. Preston, S.R., Woodhouse, L.F., Jones-Blackett, S. & Miller, G.V. High-affinity binding sites for gastrin-releasing peptide on human colorectal cancer tissue but not uninvolved mucosa. *Br. J. Cancer* 1087-1089 (1995).
54. Quaroni, A. & May, R.J. Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Met. Cell. Biol.* 403-427 (1980).
55. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L. & Isselbacher, K.J. Epitheloid cell cultures from rat small intestine. *J. Cell Biol. The Rockefeller University Press* 248-265 (1979).
56. Radulovic, S.S., Miller, G.V. & Schally, A.V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin and somatostatin and their analogues to human colon cancers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 394-401 (2001).
57. Rao, R.K. Biologically active peptides in the gastrointestinal lumen. *Life Sciences* 1685-1704 (1991).
58. Rao, J.N., Li, L., Bass, B.L. & Wang, J.Y. Expression of the TGF-beta receptor gene and sensitivity to growth inhibition following polyamine depletion. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C1034-C1044 (2000).
59. Riegler, M. et al. Effect of substance P on human colonic mucosa in vitro. *Am. J. of Physiol.* G1473-G1483 (1999).
60. Rivard, N. et al. Negative control by Sandostatin on pancreatic and duodenal growth: a possible implication of insulin-like growth factor-1. *Regul. Pepti.* 13-23 (1991).
61. Roberge, J.N. & Brubaker, P.L. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* 233-240 (1993).
62. Ruemmele, F.M., Dionne, S., Levy, E. & Seidman, E.G. TNFalpha-induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of ICE caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 159-166 (1999).
63. Ruemmele, F.M., Gurbindo, C., Mansour, A.M., Marchand, R., Levy, E., Seidman, E.G., Effects of interferon gamma on growth, apoptosis, and MHC class II expression of immature rat intestinal crypt (IEC-6) cells. *J. Cell Physiol.* 176, 120-126 (1998).

64. Ryan, J.M. Effect of different fetal bovine serum concentrations on the replicative life span of cultured chick cells. *In Vitro* 15, 895-899 (1979).
65. Scheving, L.A., Jin, W.H., Chong, K.M., Gardner, W. & Cope, F.O. Dying enterocytes downregulate signaling pathways converging on Ras: rescue by protease inhibition. *Am. J. of Physiol.* C1363-C1372 (1998).
66. Schwartz, M.Z. & Storozuk, R.B. Influence of epidermal growth factor on intestinal function in the rat: comparison of systemic infusion versus luminal perfusion. *Am. J. Surg.* 18-22 (1988).
67. Shen, W.H. & Xu, R.J. Stability of insulin-like growth factor I in the gastrointestinal lumen in neonatal pigs. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30, 299-304 (2000).
68. Summers, S.T. & Bass, B.L. Protein kinase C inhibits epidermal growth factor receptor phosphorylation in enterocytes. *J. Surg. Res.* 69, 208-211 (1997).
69. Tanimura, S., Nomura, K., Ozaki, K., Tsujimoto, M., Kondo, T., Kohno, M. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *J Biol Chem* 277(31):28256-28264 (2002).
70. Tei, T.M., Kissmeyer-Nielsen, P., Christensen, H. & Flyvbjerg, A. Growth hormone treatment increases transmural colonic growth in GH- deficient dwarf rats. *Growth Horm. IGF. Res.* 10, 85-92 (2000).
71. Tokita, K., Hocart, S.J., Coy, D.H. & Jensen, R.T. Molecular basis of the selectivity of gastrin-releasing peptide receptor for gastrin-releasing peptide. *Mol. Pharmacol.* 61 , 1435-1443 (2002).
72. Tortora, G., Pepe, S., Bianco, C., Baldassarre, G., Budillon, A., Clair, T., Cho-Chung, Y.S., Bianco, A.R., Ciardiello, F. The RI alpha subunit of protein kinase A controls serum dependency and entry into cell cycle of human mammary epithelial cells. *Oncogene* 3233-3240 (1994).
73. Tsai, C.H., Hill, M., Asa, S.L., Brubaker, P.L. & Drucker, D.J. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am. J. of Physiol.* E77-E84 (1997).
74. Ulshen, M.H., Lascelles, E., Cook, L. & Raasch, R. Effects of intraluminal epidermal growth factor on mucosal proliferation in the small intestine of adult rats. *Gastroenterol.* 1134-1140 (1986).
75. Ulshen, M.H. & Raasch, R.H. Luminal epidermal growth factor preserves mucosal mass of small bowel in fasting rats. *Clin. Sci. (Lond)* 90, 427-431 (1996).
76. Van't Land, B., Meijer, H.P., Frerichs, J., Koetsier, M., Jager, D., Smeets, R.L., M'Rabet, L., Hoijer, M. Transforming Growth Factor-beta2 protects the small intestine during methotrexate treatment in rats possibly by reducing stem cell cycling. *Br. J. Cancer* 87, 113-118 (2002).
77. Wong, W.M. & Wright, N.A. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth and adaptation. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 83-88 (1999).
78. Wright, N.A. & Irwin, M. Kinetics of villus cell populations in the mouse small intestine: normal villi -the steady state requirement. *Cell Tissue Kinetics* 595-609 (1982).
79. Xiao, Q., Boushey, R.P., Drucker, D.J. & Brubaker, P.L. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterol.* 99-105 (1999).

80. Yang, L., Faris, R.A. & Hixson, D.C. Long-term culture and characteristics of normal rat liver bile duct epithelial cells. *Gastroenterol.* 104, 840-852 (1993)
81. Zachrisson, K. & Uribe, A. Serotonin and neuroendocrine peptides influence DNA synthesis in rat and human small intestinal cells in vitro. *Acta Physiol. Scand.* 163, 195-200 (1998).

8. Danksagung

Für die hilfreiche Unterstützung und freundliche Beratung bei der Durchführung meiner Forschungsarbeit möchte ich mich herzlichst bedanken bei

Professor, Dr. med. Volker Schusdziarra

Prof. Dr. med. Drs. h.c.mult. Meinhard Classen

Prof. Dr. med Christian Lersch

Dr. Florian Eckl

Dr. Johannes Erdmann

Dr. Ulrich Frick

Dr. Jörn Karhausen

Dr. Barbara Seidler

Dr. Wolfgang Reindl

Christina Herda

Monika Werb

und Florian Wickelmaier

Ohne die offene Bereitschaft, bei allen anfallenden Fragen und Problemen tatkräftig mitzuhelfen, wären viele Unwägbarkeiten mühevoller zu überwinden gewesen.

9. Curriculum Vitae

Name: Simon Thomas Schäfer
Geburtsdatum: 14.05.1975
Geburtsort: Regensburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1981-1985 Grundschule Königswiesen, Regensburg
1985-1995 Von-Müller-Gymnasium, Regensburg
1995-1997 Universität Regensburg
1997-2001 Technische Universität München
2001-2002 Universität Regensburg
Ab 06/2002 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Klinik und Poliklinik für Kardiologie als Arzt im
Praktikum

Auslandsstudium:

1998/99 Auslandssemester an Universidad de Málaga,
Spanien
2001 PJ- Praktikum an der University of California,
San Diego

Soziales Engagement:

Seit 1989 regelmäßige ehrenamtliche Tätigkeit im Bereich der Kinder- und Jugendarbeit der evang. Kirchengemeinde St. Johannes Regensburg mit selbständiger, eigenverantwortlicher Planung und Durchführung von Veranstaltungen, Fortbildungen und Freizeiten im In- und Ausland.

Sprachkenntnisse und

Persönliche Interessen: Spanisch, Englisch
Tennis, Volleyball, Klavierspielen

Regensburg, den 1. Juli 2003

10. Anhang

Einzelsubstanzen:

Bombesin	11	9	7				[-log M]
	1,76	5,52	13,8				
CCK	8	7,5	7	6,5	6		[-log M]
	7,59	13,51	10,65	12,86	9,42		
CGRP	11	9	7				[-log M]
	22,32	12,05	4,75				
EGF	10	8	6				[-log M]
	61,30	61,39	46,1				
Galanin	11	10	9,8	7			[-log M]
	8,52	-1,72	6,58	1,99	-0,16		
Gastrin	8	7	6				[-log M]
	0,38	10,94	24,49				
GIP	11	9	7				[-log M]
	2,32	42,47	11,08				
GLP-1	10	9	8	6			[-log M]
	16	27,38	26,56	36,74			
GLP-2	10	9	8				[-log M]
	0,98	13	29,69				
Glucagon	10	9	8	7	6		[-log M]
	-6,38	-1,66	-6,17	-13,94	-28,73		
GRP	11	9	7				[-log M]
	6,51	1,12	7,15				
IGF-1	10	8	6				[-log M]
	27,97	94,96	112,57				
Insulin	7,50	7	6,5	6			[-log M]
	57,82	66,19	61,73	28			
Neurotensin	11	10	9	8			[-log M]
	19,11	6,13	16,23	-4,34			
Pentagastrin	8	7	6				[-log M]
	4,13	13,03	24,78				
Somatostatin	7	6					[-log M]
	1,82	-0,13					
Substanz P	10	9	8	7	6	5	[-log M]
	4,88	9,11	11,63	10,53	14,08	12,18	
TGFβ₁	12	10					[-log M]
	-29,82	-91,4					
TGFα	10	8	6				[-log M]
	56,27	72,03	73,57				
VIP	10	9	8	7			[-log M]
	-0,2	2,75	5,72	1,43			

Tab.1: Proliferative Wirkung verschiedener Peptide im Vergleich mit in SF-A-Medium inkubierten Zellen. Angabe Der Ergebnisse als +/- % der Kontrolle (100%)

TGFβ1 Interaktionen:

Bombesin +	11	9	7	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-4,10	-36,4	-34,02	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-93,79	-93,59	-92,43	
CCK +	8	8	7	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-26,39	-25,17	-24,87	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-93,15	-93,65	-94,19	
EGF +	10	8	6	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-21,74	-21,08	-8,71	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-91,97	-90,99	-91,19	
GIP +	11	9	7	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-27,81	-25,88	-26,55	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-92,20	-92,45	-91,07	
GLP1 +	11	9	7	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-37,12	-40,19	-34,99	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-91,73	-91,72	-90,45	
GLP2 +	9			[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-38,86			
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-91,31			
GRP +	11	9	7	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-34,65	-40,36	-32,91	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-89,13	-89,29	-90	
Glucagon +	10	9	8	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-86,08	-84,54	-82,65	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-92,40	-92,64	-93,35	
IGF-1 +	10	8	6	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-80,21	-20,01	-25,97	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-88,91	-86,96	-85,16	
Insulin +	7,5	7	6,5	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-29,42	-33,95	-19,25	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-92,05	-91,06	-91,05	
Pentagastrin +	-9			[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-87,59			
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-91,66			
TGFα +	11	9	7	[-log M]
TGFβ ₁ 10 ⁻¹² M	-42,81	-47,27	-44,76	
TGFβ ₁ 10 ⁻¹⁰ M	-94,61	-91,25	-90,11	

Tab.2: Wirkung verschiedener Peptide bei Zugabe von TGFβ₁ ,in Konzentrationen von 10⁻¹²M und 10⁻¹⁰M, im Vergleich zur Inkubation der jeweiligen Substanz ohne TGFβ₁; Angabe der Ergebnisse als +/- % der Kontrolle (100%)

Somatostatin Interaktionen:

	11	9	7 [-log M]
Bombesin +	93,19	101,47	114,65
Somatostatin 10⁻⁷ M	99,71	103,18	98,97
Somatostatin 10⁻⁶ M	100,79	106,28	113,90
	10	8	6 [-log M]
EGF +	168,42	169,57	141,93
Somatostatin 10⁻⁷ M	167,22	162,30	140,68
Somatostatin 10⁻⁶ M	169,37	159,37	138,40
	11	9	7 [-log M]
GIP +	101,57	104,48	105,53
Somatostatin 10⁻⁷ M	93,07	98,24	91,93
Somatostatin 10⁻⁶ M	90,19	95,89	108,48
	11	9	7 [-log M]
GRP +	104,59	105,55	109,86
Somatostatin 10⁻⁷ M	100,36	100,52	89,60
Somatostatin 10⁻⁶ M	94,67	98,21	110,04
	10	8	6 [-log M]
IGF1 +	109,73	190,91	233,89
Somatostatin 10⁻⁷ M	100,59	184,67	218,77
Somatostatin 10⁻⁶ M	96,29	176,65	210,47
	7		[-log M]
Insulin +	157		
Somatostatin 10⁻⁷ M	157,8		
	6		[-log M]
Pentagastrin +	107,33		
Somatostatin 10⁻⁶	112,57		
	11	9	7 [-log M]
Substanz P +	97,44	92,35	98,07
Somatostatin 10⁻⁷ M	97,42	89,78	90,33
Somatostatin 10⁻⁶ M	101,20	94,61	95,01
	10	8	6 [-log M]
TGFα +	155,66	175,94	177,00
Somatostatin 10⁻⁷ M	155,49	175,72	171,68
Somatostatin 10⁻⁶ M	148,01	178,75	174,36

Tab.3: Wirkung verschiedener Peptide ohne/mit Zugabe von Somatostatin in Konzentrationen von 10⁻⁷M und 10⁻⁶M im Vergleich mit in SF-A-Medium inkubierten Zellen. Angabe der Ergebnisse +/- % der Kontrolle (100%)