

Aus dem Anatomischen Institut der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen
Abteilung Experimentelle Embryologie
Sektion Tissue Engineering

DISSERTATION

**„Molekulare Charakterisierung der intestinalen epithelialen
Stammzellnische“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Murat Gördük

aus Eleskirt/Türkei

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Skutella
 2. Prof. Dr. rer. nat. Ch. Behl
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Sittinger

Datum der Promotion: 19.09.2008

1. Einleitung	Seite
1.1 Rolle der Stammzellforschung in der Medizin des 21. Jahrhunderts.....	5
1.1.1 Embryonale Stammzellen	5
1.1.2 Fetale Stammzellen.....	6
1.1.3 Adulte Stammzellen.....	7
1.1.4 Epitheliale Stammzellen der Darmmukosa.....	9
1.1.5 Stammzellnische.....	11
1.1.6 Aufbau und Funktion des Verdauungsapparates.....	12
1.1.7 Aufgabenstellung.....	15
2. Material und Methoden	
2.1 Genepaint.org.....	17
2.1.1 Annotation von Expressionsmustern.....	18
2.1.2 Beispiele für die Expressions- und Verteilungsmuster.....	18
2.1.3 Durchführung einer Analyse bei Genepaint.org.....	21
2.1.4 Beschreibung der Excel-Tabelle.....	22
2.2. Ingenuity Pathway Analyse System.....	25
2.2.1 Durchführung einer IPA-Analyse.....	26
3. Ergebnisse	
3.1 Rolle der analysierten Faktoren im Organismus.....	30
3.1.1 Ergebnis-Tabelle.....	31
3.1.2 Faktoren ohne Expressionsbild bei Genepaint.org.....	34
3.2 Beschreibung von Pathway-Analysen.....	35
3.2.1 Network 1 Analyse.....	35
3.2.1 A) Pathway im epithelialen Kompartiment.....	35
3.2.1 B) Pathway im subepithelialen Kompartiment.....	39
3.2.2 Network 2 Analyse.....	42
3.2.2 A) Pathway im epithelialen Kompartiment.....	42
3.2.2 B) Pathway im subepithelialen Kompartiment.....	45

4. Diskussion

4.1.1 Epitheliale Faktoren mit „relevanten“ Interaktionsmustern in Network1/2.....	48
A) Focus-Faktoren.....	48
B) Score-Faktoren.....	53
4.1.2 Score-Faktoren, die in beiden Pathways eines Networks vertreten sind.....	57
4.1.3 Subepitheliale Faktoren mit „relevanten“ Interaktionsmustern	62
A) Focus-Faktoren.....	62
B) Score-Faktoren.....	65
4.2 Molekulare Charakterisierung der intestinalen Stammzellen.....	67
4.2.1 Der Hedgehog/Patched-Signalkaskade.....	68
4.2.2 FGF-Signalkaskade	69
4.2.3 TGF/BMP-Signalkaskade.....	71
4.2.4 Wnt/ β -Catenin Signakaskade.....	73
4.2.5 Notch-Signalkaskade.....	75
4.2.6 Retinsäure-Metabolismus.....	76
4.3 Schlussfolgerung.....	77

5. Zusammenfassung.....	78
--------------------------------	-----------

6. Literatur.....	81
--------------------------	-----------

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis.....	87
7.2 Lebenslauf.....	89

1. Einleitung

1.1 Rolle der Stammzellforschung in der Medizin des 21. Jahrhunderts

Die Erforschung der Mechanismen der Proliferation und Differenzierung von embryonalen bis hin zu adulten Stammzellen und damit das Verständnis von Stammzellnischen könnte von hoher Relevanz für die Medizin des 21. Jahrhunderts sein. Die mögliche Entwicklung von Zelltherapien mit Hilfe von Stammzellen und das Engineering von Gewebe zum Ersatz geschädigter Zellen, Gewebe oder Organen ist ein viel versprechender Weg für die klinische Anwendung und könnte für viele Patienten zu einer wichtigen Heilungschance werden und reparative durch regenerative Strategien ersetzen. Diese Ansätze könnten auch zu einem wichtigen Beitrag in der palliativen Medizin werden, da frühzeitig in die Alterungs- und Degenerationsprozesse des menschlichen Organismus eingegriffen werden könnte. Allerdings kann das Verhältnis von therapeutischem Nutzen zu den möglichen Risiken bisher nur begrenzt abgeschätzt werden. Zurzeit befassen sich zahlreiche Stammzellforscher mit der Entwicklung von Therapieansätzen für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen.

Je nach Ursprungsort der Stammzellen, werden diese in embryonale, fetale und adulte (einschließlich postnatale und adoleszente) Stammzellen eingeteilt (2, 9).

Die allgemeine Frage was eine Stammzelle ist, kann ohne weiteres nicht eindeutig beantwortet werden. Nach der heutigen Erkenntnis werden die Stammzellen nach mehreren Kriterien charakterisiert (1, 2, 11).

1. Fähigkeit zur langfristigen Proliferation und Selbsterneuerung,
2. Fähigkeit zur „Pluripotenz“ („sich in Gewebe aller drei Keimblätter zu differenzieren“),
3. Fähigkeit veraltetes oder verletztes Gewebe zu erneuern und
4. Möglichkeit in Ruhephasen einzutreten

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Die Isolierung und Kultivierung der ersten embryonalen Stammzelllinie wurde Anfang der achtziger Jahre von Sir Martin J. Evans an der Universität Cambridge in England und etwas später von Gail Martin (1981) etabliert (1, 11). Als embryonale Stammzellen im lebenden Organismus können hierbei die befruchtete Eizelle, die Blastomeren und die Zellen der inneren

Zellmasse von Blastozysten angesehen werden. Der Ursprung einer Stammzelle ist dabei die totipotente (omnipotente) befruchtete Eizelle, aus der alle embryonalen und extraembryonalen Zelltypen gebildet werden (1, 9, 11).

Im Laufe der Ontogenese nimmt die Fähigkeit von Zellen, sich in verschiedene Phänotypen zu entwickeln, ab. So sind die Zellen der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste zwar in der Lage sich in alle adulten Gewebe zu differenzieren aber nicht fähig, extraembryonales Gewebe zu bilden, sie sind daher nur noch pluripotent (1). Die Blastozyste (Bläschenkeim) entwickelt sich ca. eine Woche nach der Befruchtung der Eizelle und besteht aus 100 bis 150 undifferenzierten Zellen (1).

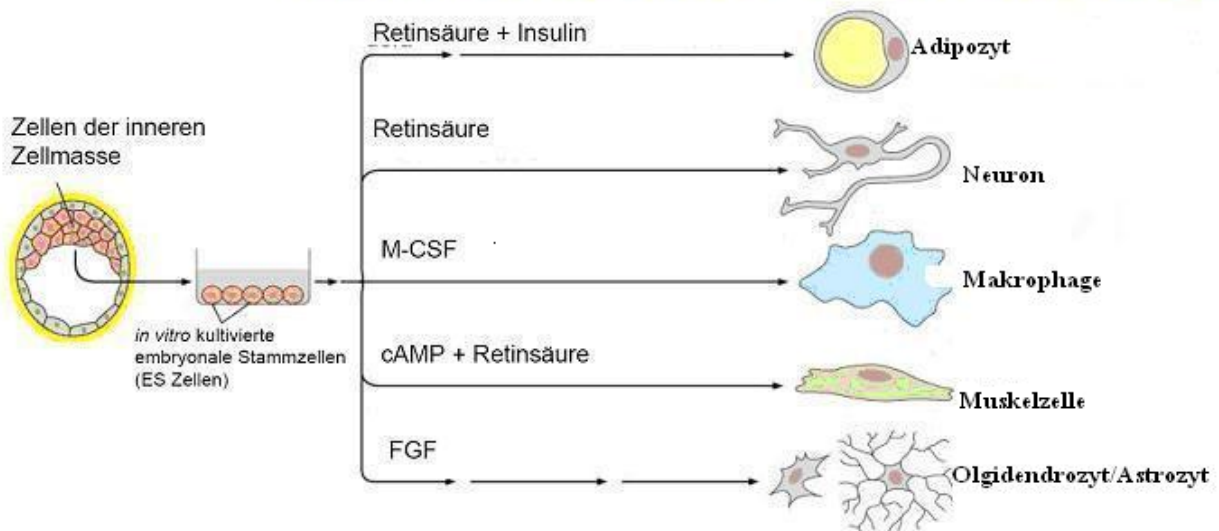


Abb. 1: Differenzierung der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste, die *in vitro* durch unterschiedliche Faktoren (Differenzierungsstimuli), wie z.B. FGF, Retinsäure etc. in ihrem Wachstum und Differenzierung beeinflusst werden, so dass durch die Induktion die Zellen der ICM in verschiedene Zelllinien differenziert werden (entnommen aus: Molecular Biology of the Cell, 4th Edition).

1.1.2 Fetale Stammzellen

Die fetalen Stammzellen sind Zellen der Leibesfrucht nach Abschluss der Organogenese bis zum Zeitpunkt der Geburt. Die fetalen Stammzellen sind zudem Vorläufer von Ei- und Spermazellen (sog. "primordiale Keimzellen"). Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass aus Keimzellen gewonnene Stammzellen die Fähigkeit besitzen, sich in unterschiedlichste Zelltypen auszudifferenzieren, wenngleich sie in dieser Hinsicht eingeschränkter sind als embryonale

Stammzellen (1, 11). Je nach Typ der eingesetzten Wachstumsfaktoren sind daraus wie bei den embryonalen Stammzellen schon ganz unterschiedliche Zelltypen, wie Herz-, Nerven-, Blut-, Muskel- und Knorpelzellen hergestellt worden (1, 2). Da aber vor allem auch neuronale Stammzellen in großen Mengen im fetalen Gehirn vorkommen, finden diese Stammzellen bevorzugt in diesem Forschungsbereich ihre Anwendung (1, 2, 9).

1.1.3 Adulte Stammzellen

Die in Deutschland vorherrschenden gesetzlichen und ethischen Probleme im Umgang mit humanen embryonalen Stammzellen haben dazu geführt, dass sich die Stammzellforscher zunehmend auf adulte Stammzellen konzentrieren. Das Entwicklungspotential von adulten Stammzellen ist nach dem gegenwärtigen Forschungsstand gegenüber fetalen und embryonalen Stammzellen reduziert, so dass die adulten Stammzellen nicht mehr pluripotent, sondern nur noch multipotent sind, d.h. dass diese Zellen die Fähigkeit besitzen, mehr als einen differenzierten Zelltyp zu bilden (1, 11). Sie entstehen nach heutiger Erkenntnis auf dem Weg von der Zygote zum erwachsenen Organismus und verbleiben während der Entwicklungsphase auf bestimmten Zellvorstufen bzw. Zellzwischenstufen in unterschiedlichen Gewebetypen (z.B. Haut, Muskulatur, Knochenmark, Darmtrakt u.a.). Im erwachsenen Organismus dienen sie dann als eine Art „Reparatur- oder Regenerationspool“ für gealterte oder geschädigte Zellen des entsprechenden Gewebes (8, 9, 11).

Adulte Stammzellen sind schwer zu identifizieren und noch schwerer von anderen Zellen der jeweiligen Organe zu isolieren (6). Daher gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt einige Hürden, die überwunden werden müssen, bevor man adulte Stammzellen für die Therapie bestimmter Erkrankungen (wie Alzheimer, Parkinson, kardiovaskuläre Erkrankungen, Morbus Hirschsprung und andere) einsetzen kann. Das erste Problem besteht darin, dass Stammzellen nur in geringer Zahl vorhanden sind. So ist z.B. nur eine Zelle unter 10.000 Knochenmarkszellen eine hämatopoetische Stammzelle (9, 19, 20). Um adulte Stammzellen sinnvoll einsetzen zu können, müssen Stammzellen aber in größeren Mengen erzeugt werden. Dies führt direkt zum zweiten Problem, dem der mangelnden Kenntnis der Kulturbedingungen von adulten Stammzellen. Aufgrund dieser Tatsachen ist es nicht möglich, intestinale epitheliale Stammzellen in Kultur zu vermehren. Dies liegt zum großen Teil daran, dass man über die zelluläre Umgebung von Stammzellen im Gewebe bzw. Organ (sog. „Stammzellnischen“) und die Wachstumsfaktoren, die in diesen Nischen gebildet werden, bisher noch zu wenig weiß (17, 18). Gerade hier sollten große

Anstrengungen unternommen werden, um Kulturbedingungen zu etablieren, die eine Proliferation und Differenzierung von intestinalen epithelialen Stammzellen ermöglichen. Dazu wird es wichtig sein, die Stammzellnische im Organismus besser zu verstehen.

Im menschlichen Körper kennt man bislang über zwanzig verschiedene gewebespezifische adulte Stammzellen (2, 9, 11). Hierzu sind tabellarisch einige Beispiele dargestellt:

Gewebestammzellen	Lokalisation	Eigenschaften
Knochenmarkstammzellen/ Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	Knochenmark	Regeneration von Zellbestandteilen des Blutes und des Immunsystems
Neuronale Stammzellen (NSC)	Gehirn (z.B. Zellen in der subventrikulären Zone, ependy- male Zellen u.a.)	Regeneration von verschiedenen Zelltypen des Gehirns
Neonatale Stammzellen	Nabelschnurblut	Regeneration von Zellbestandteilen des Blutes und des Immunsystems
Stammzellen im Skelettmuskel (Satellitenzellen)	in der Basallamina der multinukleären Muskelfasern	Skelettmuskelregeneration
Intestinale Stammzellen	Darmtrakt	Darmtraktregeneration
Stammzellen in der Haut	Stratum basale	Regeneration von Keratinocyten
Hepatische Stammzellen	Leber	Regeneration von Leberzellen
Stammzellen des Fettgewebes	Fettgewebe	Regeneration von Fettgewebe
Endotheliale Stammzellen	Knochenmark, Gefäße	Angiogenese

Tab. 1 zeigt die Eigenschaften von einigen adulten Stammzellen mit unterschiedlicher Funktion und Lokalisation im Organismus.

Besonders anschaulich und zum Teil auch recht gut erforscht sind die Mechanismen vor allem bei den Blutstammzellen. Diese Zellen regenerieren im erwachsenen Organismus zeitlebens und zeigen ein außerordentlich starkes Regenerationspotential, so dass bereits eine einzelne hämatopoetische Stammzelle ausreicht, um das gesamte Blut letal bestrahlter Mäuse wieder zu bilden (9, 19). Dabei sind die hämatopoetischen Stammzellen nicht nur in der Lage das blutbildende System nach einer Zerstörung (z.B. durch Chemo- oder Strahlentherapie) komplett

zu regenerieren, sondern besitzen auch die Fähigkeit, die Zellbestandteile des Immunsystems zu bilden (9, 20). Zudem sind die Blutstammzellen auch in der Lage, sich in verschiedene mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten sowie in nicht-mesenchymale Zellen wie Kardiomyozyten, Zellen des Lungenepithels und neuron-ähnliche Zellen zu differenzieren (2). Dieser besondere Eigenschaft wird als „Plastizität“ bezeichnet und erhöht die Hoffnung darauf, dass durch eine Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen die Heilungschance vieler Erkrankungen verbessert werden könnte, z.B. Induktion der Angiogenese durch Transplantation von Blutstammzellen bei vaskulären Erkrankungen oder Ersatz von geschädigten Herzmuskelgewebe nach einem Herzinfarkt (2, 9, 20).

1.1.4 Epitheliale Stammzellen der Darmmukosa

Obwohl das intestinale Epithel ein hohes Regenerationspotential zeigt, ist bei diesem Gewebetyp im Gegensatz zu den hämatopoetischen Stammzellen nur wenig über die Mechanismen der Aufrechterhaltung der Stammzellpotenz, Proliferation, Differenzierung und Regeneration bekannt. Da der Darm zu den regenerativsten Geweben des Organismus gehört, bietet er sich als ein attraktives Forschungsbereich an, um die molekularen Interaktionen der adulten Stammzellnische aufzuklären und ist daher als eine wichtige Grundlage für die Tissue Engineering des endodermalen Gewebekomplexes anzusehen. Zurzeit ist es nicht möglich, die intestinalen Stammzellen aus dem Darm zu isolieren und sie als Einzelzellen in Kultur zu halten und weiterhin zu expandieren. Da die Darmstammzelle aus dem endodermalen Keimblatt entsteht, wäre es jedoch denkbar, dass aus diesen adulten Stammzellen alle aus diesem Keimblatt abgeleiteten Zelltypen differenziert werden könnten. Dies würde z.B. bedeuten, dass nicht nur das Darmepithel selbst, sondern auch alle intestinalen Drüsen (Leber, Gallenblase, Pankreas und Speicheldrüsen) und das Lungengewebe aus diesem Stammzellpool abgeleitet werden könnten.

Bei der Maus liegen die Stammzellen im Dickdarm in der Basis der Darmkrypte und im Dünndarm in der Zellposition 4-6 (5, 6, 43). Ein Dickdarmschleimhautbezirk des Menschen von 0.5 mm enthält ca. 200 Krypten, wobei pro Krypte 4 bis 30 Stammzellen angenommen werden, aus denen sich alle Zellen des Darmepithels (Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen, immunkompetente M-Zellen und Paneth-Zellen) entwickeln (4, 5).

Während der fortschreitenden Differenzierung wandern die Stammzellen nach apikal in Richtung der Villi und bilden während der Wanderung zunächst undifferenzierte Vorläuferzellen. Die Vorläuferzellen differenzieren sobald sie die Krypten-Villi-Grenze erreicht haben, zu

Enterozyten, Becherzellen, M-Zellen oder zu enteroendokrine Zellen aus. Im Gegensatz zu diesen Zellen verbleiben die differenzierten Paneth-Zellen immer am Grund der Krypte und erfahren daher keine apikale Wanderung in Richtung der Villi (4, 5). Die Homöostase der ständigen Zellerneuerung durch die Stammzellen wird durch Apoptose und Ablösung von Zellen an der Spitze der Villi im Ileum bzw. auf der Epithelzelloberfläche im Colon kompensiert. Dabei befindet sich die gesamte Epithelzellschicht in einer kontinuierlichen Bewegung nach luminal, wobei die Lebenszeit dieser epithelialen Zellen ca. 3 bis 5 Tage beträgt. Nur die spezifischen Zelltypen, zu denen die Paneth-Zellen (mit einer Lebensdauer von ca. 20 Tagen und die immortalen Stammzellen gehören, sind davon ausgenommen) (10, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

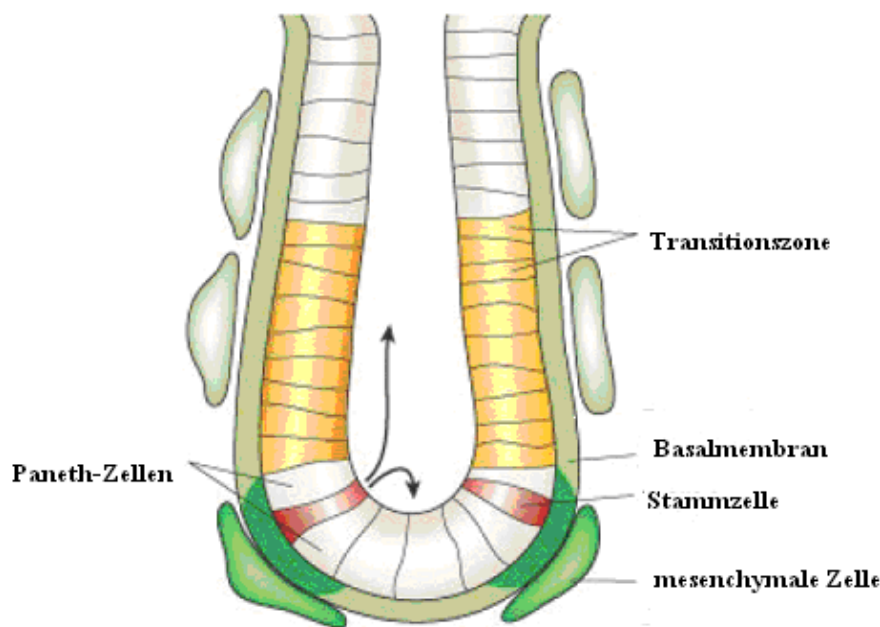


Abb. 2: Schematische Darstellung der Topographie von Kolonkrypten. Am Grund der Krypte (Kryptenbasis) befindet sich die Proliferationszone der Stammzellen. Auf ihrem Weg entlang der Kryptachse in Richtung Darmlumen erlangen die Zellen durch Differenzierung ihre funktionellen Eigenschaften (Transitionszone). Nach 3 bis 5 Tagen werden die Kolonepithelzellen ins Darmlumen abgeschilfert oder degenerieren durch Apoptose (entnommen aus: Potten und Löffler 1990).

1.1.5 Stammzellnische

Die Stammzellnische ist ein sogenanntes „Mikro-Kompartiment“, das aus dem Stammzellkompartiment selbst, dem umgebenden Mesenchym und der extrazellulären Matrix gebildet wird (17, 18). Dabei gelten die Komponenten der extrazellulären Matrix als Signalvermittler innerhalb der Stammzellnische (17). Hier werden Signalproteine produziert, die das weitere Schicksal von Stammzellen in der Stammzellnische bestimmen. Es ist davon auszugehen, dass durch die Adhäsionsmoleküle die Stammzellen in der Nische verbleiben und sich selbst vermehren. Ohne diese Moleküle verlassen sie die Nische und gehen den Weg der Spezialisierung (4, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 21). Über die Faktoren, die für die Bildung oder Hemmung von Adhäsionsmoleküle verantwortlich sind, ist derzeit nur wenig bekannt. Dabei wird bei der Teilung der Stammzellen zwischen einer symmetrischen und einer asymmetrischen Teilung unterschieden. Bei der symmetrischen Teilung verbleiben die Stammzellen innerhalb der Nische und reproduzieren sich selbst. Bei der asymmetrischen Teilung lösen sich die Zellen von der Nische ab, wobei die Hälfte zu einer erneuten Stammzelle und die andere Hälfte zu Vorläuferzellen für spezialisierte Zellen ausdifferenzieren (17, 19). Neben der extrazellulären Matrix üben auch andere Zellen, die in der Stammzellnische lokalisiert sind, eine regulative Wirkung auf die Nische aus. Hierzu gehören unter anderem die Stromazellen, die benachbarten mesenchymalen Zellen, Makrophagen, Lymphozyten, Myofibroblasten, Gefäßendothelzellen und neuronale Zellen (10, 18). Diese Zellen kommunizieren innerhalb der Nische miteinander mittels parakrinen, endokrinen, metabolischen und neuronalen Signale. Ferner beeinflussen zahlreiche regulative Signalkaskaden und metabolische Prozesse aus dem Umfeld der Stammzellen die Aktivität dieser Zellen. Zu den wichtigsten Signalkaskaden und metabolische Prozesse gehören unter anderem die TGF β -, Wnt-, Notch-, Hedgehog- und FGF-Kaskade (15, 24, 33). Inwieweit diese verschiedenen Faktoren (Enzyme, Rezeptoren, Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine etc.), Zellen, Signalkaskaden und Stoffwechselprozesse innerhalb der Stammzellnische miteinander kommunizieren und welchen Einfluss sie auf die Stammzellen ausüben, ist weitgehend noch unbekannt.

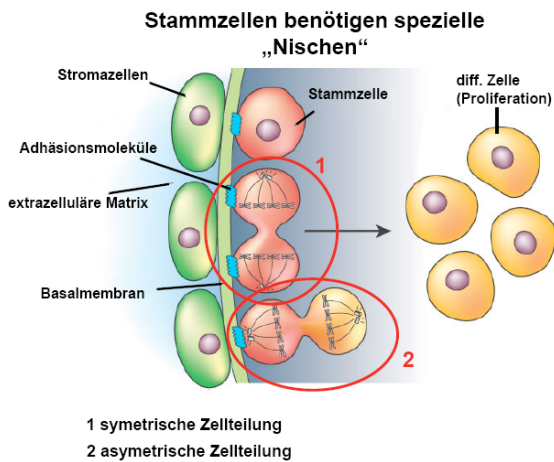
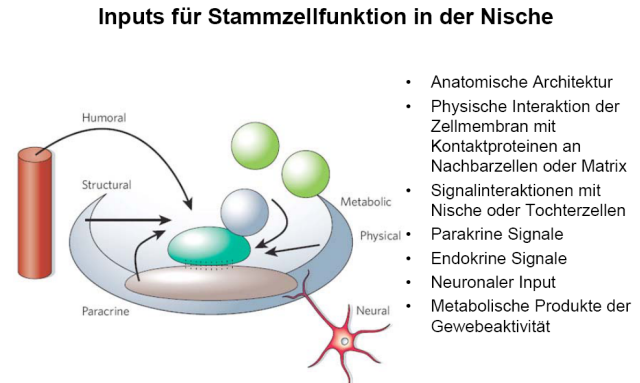
A**B**

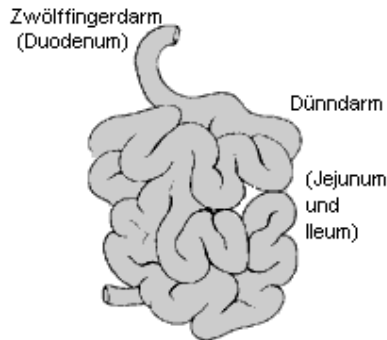
Abb. 3: Schematische Darstellung der intestinalen Stammzellnische, bestehend aus Zellen der extrazellulären Matrix, Stromazellen, Adhäsionsmolekülen und anderen, die eine regulative Wirkung auf die Stammzellen ausüben. Die Stammzellen gehen einerseits in eine symmetrische (1) und andererseits in eine asymmetrische Zellteilung ein (2) (A). Schematische Darstellung der möglichen Inputs auf die Stammzellen, die eine regulierende Wirkung auf die Stammzellnische ausüben (B) (entnommen aus: Spradling et al: Nature 2001; 414: 98-104).

1.1.6 Aufbau und Funktion des Verdauungsapparates

Der menschliche Darm wird anatomisch grob in Dünndarm, Dickdarm und Mastdarm unterteilt. Der Dünndarm reicht vom Pylorus des Magens bis zur Ileozökalklappe und wird in Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt. Mit 5-7 Metern Länge bildet der Dünndarm den längsten Teil des Verdauungsapparates. Die Funktion des Dünndarms ist die Digestion (Verdauung), Resorption (Aufnahme) und Weiterleitung von Nahrungsbestandteile über Blut- und Lymphwege in die Leber. Zudem spielt der Darmtrakt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und besitzt wichtige endokrinologische Funktionen im Organismus. Dabei dienen die Schleimhautfalten (Kerckring'sche Falten), die Zotten, die Krypten und die Mikrovilli der Enterozyten einer Oberflächenvergrößerung der Epithelzelloberfläche und bewirken dadurch die hohe Resorptionsleistung des Dünndarms (3). Der Dickdarm als Ausscheidungsorgan hat neben Resorptions- und Sekretionsvorgängen auch wichtige Funktionen bei der immunologischen Abwehrfunktion. Er ist ca. 1.5 Meter lang und wird in Zäkum, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens und in einen Colon sigmoideum unterteilt. Der Dickdarm ist zottenlos und besitzt flache, mit Krypten durchsetzte

Schleimhaut. Die Hauptaufgabe vom Dickdarm ist die Resorption von Salz und Wasser. Der Dickdarm mündet im Enddarm und bildet mit dem Anus die Verbindung nach außen (3).

A



B

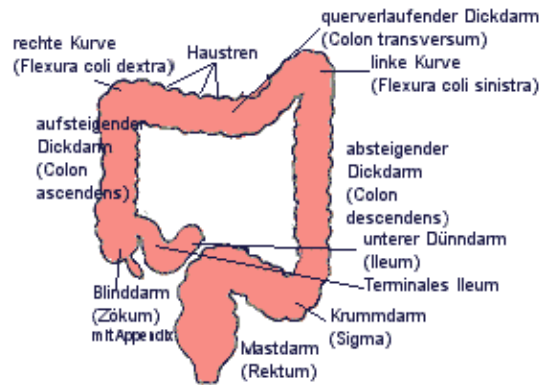


Abb. 4: Anatomisch-topographische Darstellung des Dünndarms (**A**) und des Dickdarms (**B**) (entnommen aus: endoline.de).

Die Histologie des Darmtraktes ist im Grunde in allen Abschnitten ähnlich aufgebaut. Dabei bildet die Darmschleimhaut, Tunica mucosa die innerste Schicht der Darmwand und gliedert sich in drei Schichten. Das Epithel ist einschichtig und seine Zellen sind hochprismatisch. In der Epithelzellschicht kommen vier verschiedene Zelltypen vor. Die Enterozyten (das Resorptionsepithel) machen mit ca. 80% den Hauptteil der epithelialen Zellen im Darmtrakt aus (3, 4). Die Becherzellen bilden ca. 5% der epithelialen Zellen im Darmtrakt aus und sind bevorzugt in der Mitte der Krypten sowie im apikalen Region der Epithelzellen lokalisiert (5, 6). Die enteroendokrinen Zellen machen nur einen kleinen Anteil der Zellen aus. Die Hormone, die durch enteroendokrine Zellen produziert werden (z.B. Serotonin, Gastrin, Substanz P und Sekretin) regulieren die Darmmotilität sowie die Sekretions- und Verdauungsvorgänge. Die Paneth-Zellen sind im Gegensatz zu den anderen Zelltypen wesentlich langlebiger (ca. 20 d) und liegen am Basis der Krypten. Die Paneth-Zellen bilden antimikrobieller Substanzen wie Lysozyme und Defensine und schützen dadurch die epitheliale Barriere (4, 9). Die Epithelschicht wird von einer Basalmembran abgegrenzt. Unter der Basalmembran befindet sich die Lamina propria mucosae. Diese dünne bindegewebige Schicht enthält retikuläre und kollagene Fasern mit eingelagerten Gefäßen und Nervenfasern. Die Propria wird gegen die Submucosa durch die Lamina muscularis mucosae begrenzt. In der Submukosa enden sehr feine Blutgefäße, Lymphbahnen und neuronale Äste. Der Submukosa folgt die Tunica muscularis, die aus zwei

Muskelschichten besteht. In der deutlich dickeren inneren Schicht sind die Fasern senkrecht und in der äußeren Schicht sind die Muskelfasern parallel zur Längsachse des Darmrohres ausgerichtet. Durch die Innervation der glatten Muskelzellen kommt es zu einer koordinierten Kontraktion und es entsteht eine gerichtete Peristaltik im Darmtrakt, der den Nahrungsbrei von oral nach aboral transportiert. Die äußerste Schicht der Darmwand wird von einer einschichtigen, flachen Epithelschicht (Mesothel) und einer sehr dünnen Bindegewebsschicht (Serosa) gebildet. Die Darmtätigkeit wird durch das autonome Nervensystem reguliert. Die Verdauungsvorgänge werden durch den Sympathikus gehemmt und durch den Parasympathikus stimuliert. Ferner verfügt der Darm über ein eigenes, intramurales Nervensystem, den Plexus entericus, der dem Darm unabhängige motorische und sekretorische Tätigkeiten erlaubt (3, 7).

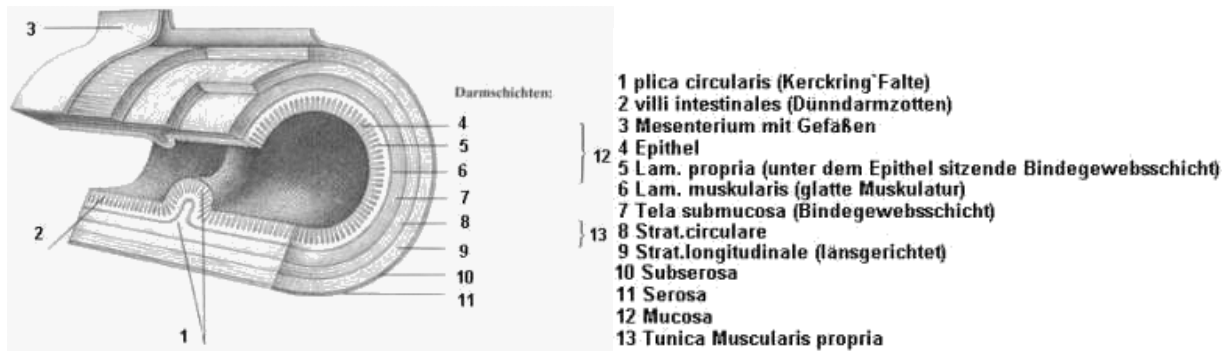


Abb. 5: Histologische Darstellung der einzelnen Darmschichten (entnommen aus: endoline.de).

1.1.7 Aufgabenstellung

Die genauen Mechanismen der molekularen Interaktion innerhalb der Stammzellnische sind weitgehend unbekannt. Dies ist auch ein wesentlicher Grund dafür, dass adulte Stammzellen im Labor nicht gezüchtet werden können. Beim Versuch, die Zellen in Kultur zu halten, gehen diese schnell verloren, weil sie sich spezialisieren und ihre eigene Regeneration vernachlässigen. Wüsste man, wie sich Stammzellen im Körper erneuern und welche Faktoren (z.B. Enzyme, Hormone, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine etc.) die Stammzellregeneration beeinflussen, so könnte dies ihre gezielte Vermehrung im Labor verbessern, was der Entwicklung neuer Therapien dienen würde. Mit Hilfe dieser Faktoren wäre es möglich, über den extrazellulären Raum oder über die äußere Zellmembran (Oberflächenproteine/Rezeptoren) die Proliferation und Differenzierung von intestinalen Stammzellen in Zellkultur günstig zu beeinflussen. So wäre es denkbar, dass man durch die Applikation bestimmter Faktoren bzw. Faktorkandidaten oder deren Derivaten *in vitro* verschiedene intrazellulären Kaskaden aktiviert, die für die Proliferations- und Differenzierungsmechanismen der intestinalen Stammzellnische essentiell sind. Dies ist die Grundlage für die Entwicklung von neuen Methoden zur Vermehrung adulter Stammzellen. Dabei gibt es Hinweise, dass viele entwicklungsentscheidende Transkriptions- und Regulationsgene in unterschiedlichen Stammzellpopulationen ein ähnliches Expressionsmuster und damit auch wahrscheinlich entsprechend ähnliche Funktionen aufweisen. Mittlerweile sind verschiedene Faktoren beschrieben worden, die das Stammzellkompartiment darstellen könnten.

Über eine ausführliche molekulare Charakterisierung der intestinalen Stammzellen wäre es zunächst möglich, Zelloberflächenproteine zu isolieren, mit deren Hilfe die Zellen hochspezifisch z.B. über Zellsortierungsverfahren aufgereinigt werden könnten. Hierzu gibt es momentan keine wirklich gut verwendbaren Kandidaten. Desweiteren wäre es möglich, die molekularen Interaktionen mit anderen Zellen der intestinalen Stammzellnische zu identifizieren, um dadurch die Faktoren einzugrenzen, die für eine *in vitro* Erhaltung, Vermehrung und Differenzierung dieser adulten Stammzellen notwendig sind.

Das Ziel dieser "Dissertationsarbeit" ist es, über eine Analyse der Expressionsmuster von ca. 2000 „Entwicklungsgenen“ (bei Genepaint.org) in dem histologisch funktionellen embryonalen Kompartiment des sich entwickelnden Darms

- a. neue Zellmarker zur Zellauftrennung über neue Oberflächenproteine zu identifizieren,
- b. über Pathway-Analysen nach ECM-Komponenten (extrazellulären Matrix-Komponenten) und Wachstumsfaktoren zu suchen, die für die Proliferations- und Differenzierungsmechanismen der intestinalen Stammzellnische verantwortlich sind und
- c. über Pathway-Analysen weitere molekulare Interaktionspartner zu identifizieren

Über die verschiedenen Analyseebenen soll ein anschauliches Stammzellnischenmodell des Darmtraktes erstellt werden. Desweiteren könnten die generierten Daten eine Translation der determinierten zellulären und molekularen Mechanismen in therapeutische Strategien zur induzierten Organregeneration ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Genepaint.org

Genepaint.org ist eine öffentlich zugängliche Bilddatenbank. Genepaint-Datenbank entstand in Zusammenarbeit zwischen der Abteilung von Prof. Eichele am Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie in Hannover und der Firma Tecan. Dabei ermöglicht die Datenbank mittels Genexpressionsmuster die zeitliche und räumliche Verteilung von mRNA oder Proteinen und stellt dadurch die Aktivität dieser Gene bzw. Genprodukte in den Zellen der verschiedensten Geweben dar (22). Auf diese Weise werden exprimierte Gene in Gewebeschnitten und in Embryonen mittels spezifischer Gensonden angefärbt und erzeugen sog. Genexpressionsbilder, die dann in einen Expressionsatlas kartiert werden. Die Gewinnung von Expressionsdaten erfolgt durch automatisierter in-situ-Hybridisierung und der Annotation von Expressionsmustern. Die Genexpressionsmuster werden über RNA-in-situ-Hybridisierung gewonnen und anschließend mit einem selbst-fokussierenden Mikroskop unter einer digitalen Kamera gescannt (22, 23). Diese Bilddaten werden dann im Internet veröffentlicht (www.Genepaint.org) und sind für alle Forscher weltweit zugänglich. Für die Darstellung von Genexpressionsanalysen wurden bisher hauptsächlich 14.5 Tage alte Mäuseembryonen eingesetzt. In diesem embryonalen Stadium sind bereits die meisten Organe entwickelt und entsprechen dem eines menschlichen Embryos von ca. acht Wochen (22). Da das Maus-Genom große Ähnlichkeit mit dem menschlichen Genom zeigt, eignet es sich für die systematische Genexpressionsanalyse. Die durch die Expressionsinformationen gewonnen Erkenntnisse tragen nicht nur zum Verständnis von entwicklungsbiologischen Prozessen bei, sondern haben auch eine große Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese bestimmter Krankheiten, wie z.B. Trisomie 21, Alzheimer Syndrom, angeborene Herzfehler, Morbus Hirschsprung etc. Von den komplett sequenzierten Genomen des Menschen und der Maus (ca. 30 000-35 000 Gene) sind aktuell (Jan. 2007) ca. 2000 Entwicklungsgene in der Datenbank von Genepaint.org charakterisiert. Aus diesen sequenzierten 2000 Genen spielen wahrscheinlich ca. 497 Entwicklungsgene bei der intestinalen Regeneration eine Rolle, da nur diese Gene in Genepaint.org eine Expression im Darmtrakt aufweisen. Durch die Untersuchung dieser 497 Expressionsbilder in Genepaint.org und die daraus resultierenden Expressionsinformationen wird

die Darstellung eines anschaulichen Regenerationsmodells der Stammzellnische im Darmtrakt angestrebt.

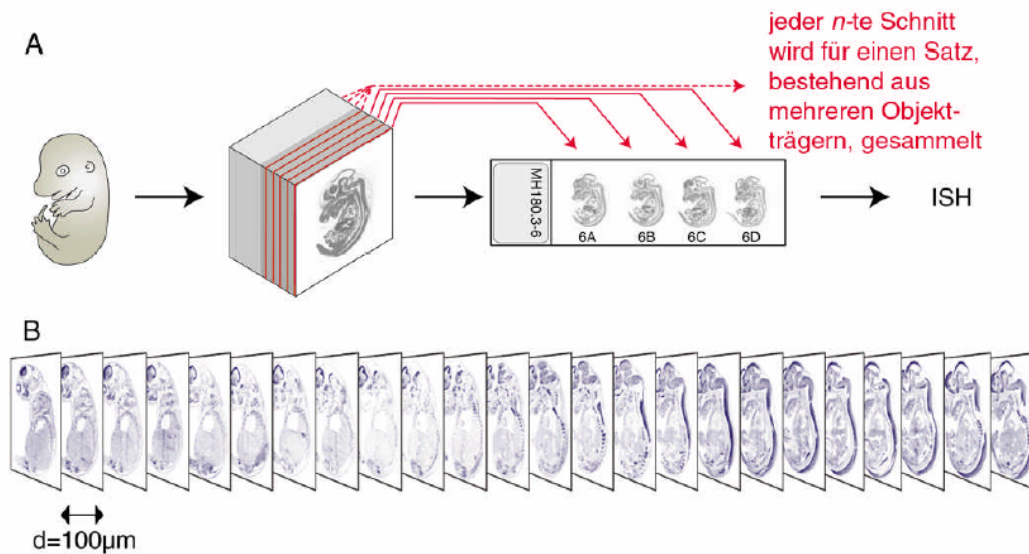


Abb. 6: Durchführung vom Mausembryo bis zum fertigen Genexpressionsmuster im Schnittbild. Sagittalschnitte des Embryos, die auf Serien von Objektträgern verteilt und mit unterschiedlichen Genen hybridisiert werden (A). Einzelne Schnitte, bei einer Schnittdicke von $100\ \mu\text{m}$. Ein typischer Datensatz für einen E14.5 Embryo umfasst sechs Objektträger mit je vier Schnitten, insgesamt also 24 (B) (entnommen aus: Visel et al 2003 (22)).

2.1.1 Annotation von Expressionsmustern

Definition : Hierbei handelt es sich um die funktionelle Charakterisierung eines bestimmten Gens sowie seiner Genprodukte mit unterschiedlichen Verteilungsmustern und Expressionsstärken im Gewebe (22).

2.1.2 Beispiele für die Expressions- und Verteilungsmuster

Die Genexpressionsmuster in Genpaint.org weisen unterschiedliche Expressionsstärken auf. Dabei wird zwischen schwacher, mittlerer und starker Expression unterschieden. Je nach Verteilungsmuster wird das lokale Expressionsmuster in ubiquitär, regional und gestreut eingeteilt (22). Ubiquitär bedeutet, dass alle Teilbereiche einer Struktur und die überwiegende Mehrzahl aller Zellen dieses zu untersuchende Gen exprimieren. Bei einem regionalen Verteilungsmuster ist die Expression

auf die zu annotierende anatomische Struktur beschränkt, während andere Teilbereiche das Gen nicht exprimieren. Bei gestreuter Expression exprimieren nur wenige, jeweils einzeln liegende Zellen das Gen, während die Mehrzahl aller Zellen in der entsprechenden anatomischen Struktur das Gen nicht exprimiert. Für Strukturen, in denen keine Expression vorliegt, kann dies als “not expressed” vermerkt werden (22, 23).

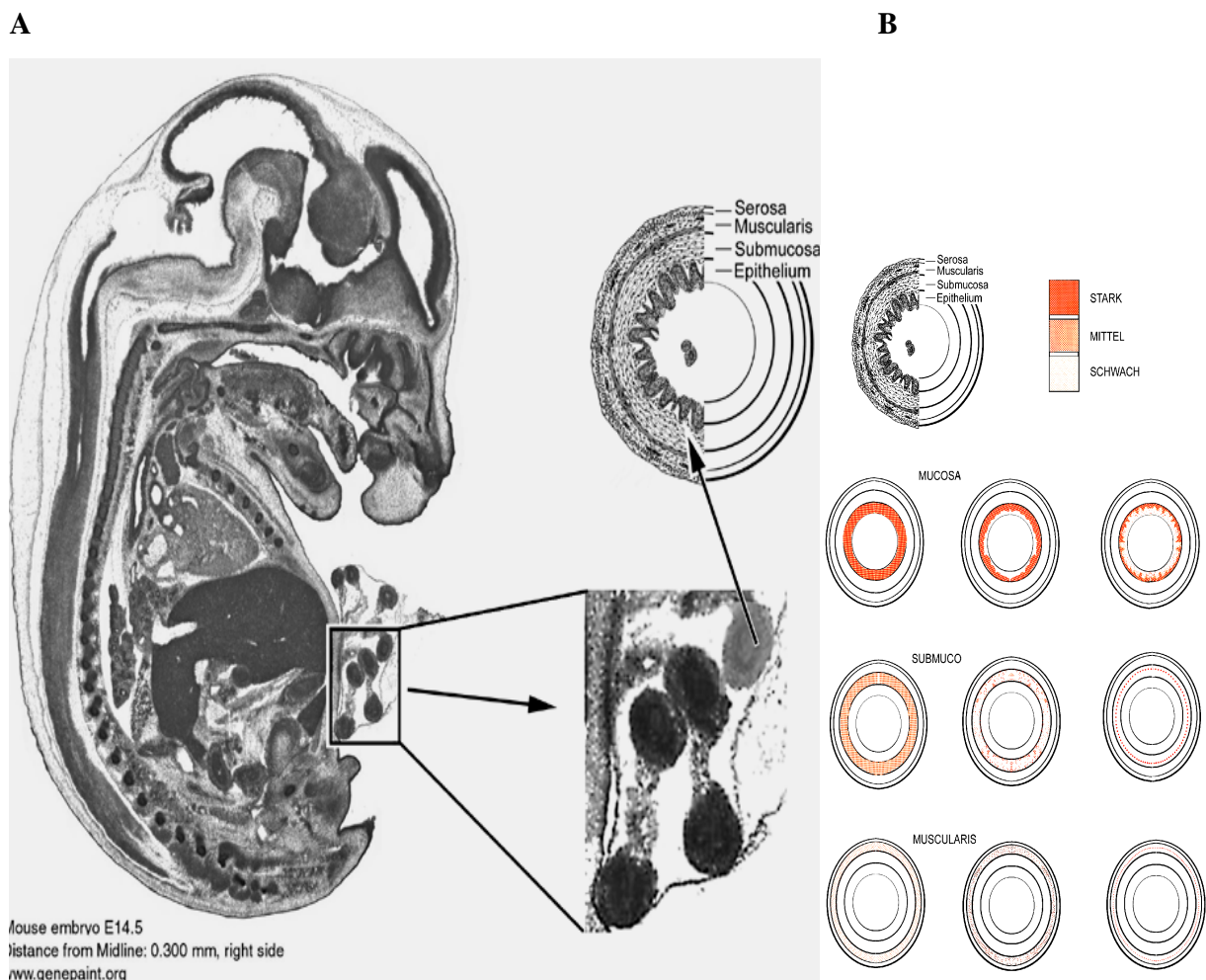


Abb. 7: Sagittalschnitt eines 14.5 Tage alten Embryos. Die markierten Regionen stellen den Darmtrakt des Mausembryos und die einzelnen Abschnitte der Darmwand dar (**A**). Die Abbildung 7 B zeigt ebenfalls eine schematische Darstellung der einzelnen Schichten des Darmtraktes, die in Mucosa, Submucosa, Muscularis und Serosa unterteilt werden. Die einzelnen Schichten sind in starker, mittlerer und schwacher Expressionsstärke mit regionalem Verteilungsmuster dargestellt, d.h. dass die einzelnen Gene oder Genprodukte auf einen Teilbereich („regional“) des Darmtraktes beschränkt sind (entnommen aus: Genepaint.org).

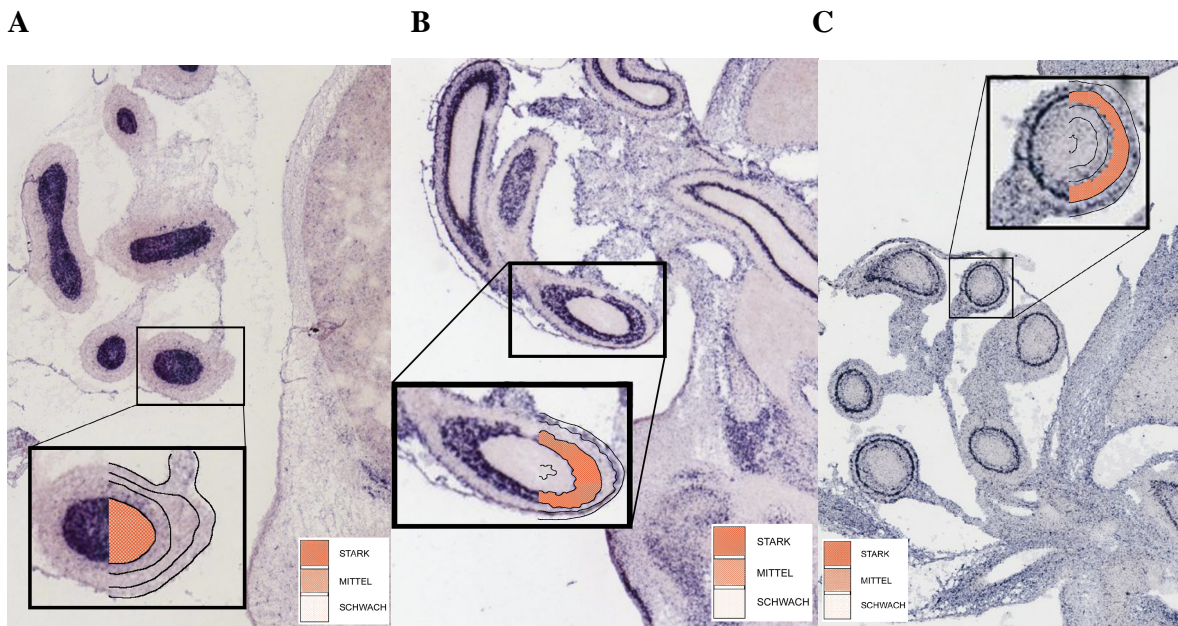


Abb. 8A/B/C: Abb. 8A zeigt die Expression von Anxa11 (Annexin A11), der mit einer starken Expressionsstärke im Mukosa regional exprimiert wird. Die Abbildung 8B weist eine starke regionale Expression von BMP4 in der Submukosa auf und die Abbildung 8C zeigt eine starke Expression von Smtn (Smoothelin) in der Lamina muscularis (entnommen aus: Genepaint.org).

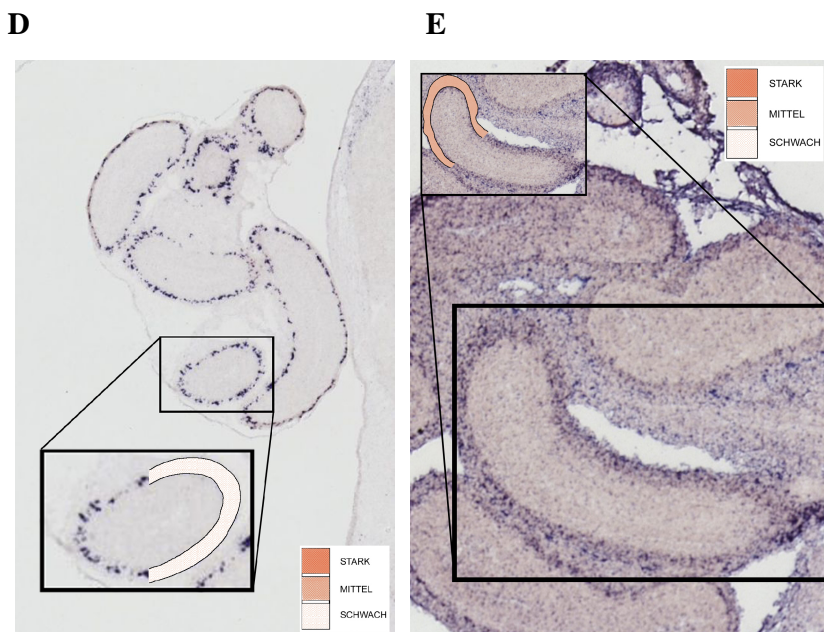


Abb. 8D/E: Abb. 8D stellt die Expression von Synaptotagmin 11 dar, das mit einer schwachen Expression im Bereich des enterischen Nervensystems regional exprimiert wird. Die Abbildung 8E zeigt die Expression von Hand1 (heart and neural crest derivatives expressed transcript 1) im Bereich der Serosa, das mit einer mittleren Expressionsstärke in Serosa regional exprimiert wird (entnommen aus: Genepaint.org).

2.1.3 Durchführung einer Analyse bei Geneaint.org

In der Datenbank waren zum Zeitpunkt der Arbeit (bis Ende Jan. 2007) ca. 2000 Entwicklungsgene („Faktoren“) kartiert. Von diesen 2000 Genen zeigen allerdings nur 497 eine Expression im Darmtrakt. Aus diesen 497 Faktoren wurden 115 Faktoren für die weitere Analyse im Ingenuity Pathway Analysis System („IPA“) verwendet. Zudem wurden zusätzlich drei weitere Faktoren für die IPA-Analyse benutzt, für die zum Zeitpunkt der Arbeit zwar noch keine Expressionsbilder im Genepaint.org vorlagen, deren regulative Wirkung auf die intestinale Stammzellnische aber aus der Literatur bekannt war.

Zu den Genen bzw. Genprodukten, die unter dem Sammelbegriff „Faktor“ zusammengefasst werden, zählen verschiedene Moleküle wie Hormone, Zytokine, Rezeptorproteine, Enzyme, Wachstumsfaktoren und andere. Die Faktoren, die für die IPA-Analyse benutzt werden, sind nach folgenden Kriterien ausgesucht worden:

- a) die regulative Wirkung dieser Faktoren auf die intestinale Stammzellnische ist aus der Literatur bekannt, obwohl in der Gnepaint.org kein Expressionsbild für sie vorliegt („bekannte Faktoren“),
- b) die Faktoren sind aus der Literatur bekannt und zeigen zudem eine mittelstarke bis starke, regionale Expression („bekannte Faktoren“) oder
- c) die Faktoren zeigen in Genepaint.org eine mittelstarke bis starke Expression, sind in der Literatur aber nicht beschrieben („nicht bekannte bzw. unbekannte Faktoren“)

Da die epitheliale Stammzellnische im basalen Abschnitt der Mukosa lokalisiert ist, ist es anzunehmen, dass die molekularen Interaktionen zwischen den beiden benachbarten Kompartimenten (Mukosa und Submukosa) einen wesentlichen Einfluss auf die Stammzellnische ausüben (6, 9, 10). Folglich besitzen die 115 Faktoren aus dem Expressionsatlas der Datenbank eine mittelstarke bis starke und regionale Expression, die entweder auf die Mukosa oder auf die Submukosa beschränkt ist. Diese Faktoren werden im Ingenuity-System für die Pathway-Analysen miteinander analysiert, um molekulare Interaktionen beider Kompartimente darzustellen.

Für die Pathway-Analysen im IPA-System wurden also vor allem die Faktoren aus der Datenbank ausgesucht, die eine mittelstarke bis starke Expression und eine regionale Verteilung aufweisen. Diese Faktoren sind in der unten dargestellten Excel-Tabelle wie folgt unterteilt:

Die Gesamtzahl der zu analysierenden Faktoren beträgt 118. Diese werden in folgende Hauptgruppen unterteilt:

1. Epitheliale Faktoren: (Gesamtzahl=55)
 - 1.2 Epithelial bekannt (31 Faktoren, türkis gefärbt)
 - 1.3 Epithelial unbekannt (24 Faktoren, weiß gefärbt)
2. Subepitheliale Faktoren (Gesamtzahl=63)
 - 2.1. Subepithelial bekannt (32 Faktoren, hellgrün gefärbt))
 - 2.2 Subepithelial unbekannt (31 Faktoren, gelbbraun gefärbt)

2.1.4 Beschreibung der Excel-Tabelle

Die erste Spalte gibt die spezifischen Accession-Nummern der jeweiligen Faktoren (GenBank) von Mäusen an, mit deren Hilfe die weitere Analyse in Ingenuity-System durchgeführt werden kann. Die Recherche der einzelnen Faktoren und ihrer Accession-Nummer erfolgte entweder über PubMed oder bei Genepaint.org. Die dritte Spalte zeigt die einzelnen Faktoren, die für die weitere Analyse im IPA-System benutzt werden. Zu den Faktoren zählen unter anderem die Wachstumsfaktoren, Hormone, Rezeptorproteine, Enzyme, Chemokine etc. Die zweite und vierte Spalte sind mit einem p-Value (p-Value 1-0) gekennzeichnet. Ein p-Value=1 bedeutet, dass der entsprechende Faktor in der jeweiligen Region (Mukosa oder Submukosa) vorhanden ist, also mittelstark bis stark exprimiert wird, während ein p-Value= 0 für not expressed bzw. für eine schwache Expression steht. Die fünfte Spalte gibt die Expressionsstärke mit einer Zahl zwischen 1 und 3 an, wobei 1 für schwache, 2 für eine mittlere und 3 für eine starke Expression steht. Die sechste Spalte zeigt die Signaltransduktionskaskaden, bei denen die bekannten Faktoren beteiligt sind.

Gene/Protein ID GenBank	Epithel (p-value)	Name	Subepithel (p-value)	Expressionsstärke	Mitglied
AB210001	1	APC	0	2	Wnt-Kaskade
XM128515	1	AXIN2	0	2	Wnt-Kaskade
AF009011	1	AXIN1	0	3	Wnt-Kaskade
AI663515	1	BMPR1A	0	2	BMP-TGFβ-Kaskade
NM009864	1	CDH1	0	3	Wnt-Kaskade

NM007614	1	CTNNB1	0	2	Wnt-Kaskade
NM007888	1	DSH	0	2	Wnt-Kaskade
NM010051	1	DKK1	0	2	Wnt-Kaskade
NM008011	1	FGFR-4	0	3	FGF-Kaskade
NM054071	1	FGFRL-1	0	3	FGF-Kaskade
NM145583	1	Frag1	0	2	FGF-Kaskade
NM020510	1	FZD2	0	2	Wnt—Kaskade
XM192878	1	Fzd5	0	2	Wnt-Kaskade
NM008057	1	FZD7	0	2	Wnt-Kaskade
NM019827	1	GSK3B	0	2	Wnt-Kaskade
NM010515	1	IGF2R	0	2	Insulin Growth Factor
AF064984	1	LRP5	0	2	Wnt-Kaskade
NM007500	1	Math-1	0	3	Notch-Kaskade
NM008711	1	Noggin	0	KEIN GENEPAINT	BMP-TGFβ-kaskade
NM011244	1	Rarg	0	3	Retinsäure-Kaskade
NM009024	1	Rara	0	3	Wnt/Retinsäurekaskade
NM181444	1	Rai3	0	3	Retinsäurekaskade
NM018780	1	sFRP5	0	3	Wnt-Kaskade
NM008539	1	SMAD1	0	2	BMP-TGFβ-Kaskade
NM009170	1	Shh	0	3	Hedgehog-Kaskade
NM009521	1	WNT3	0	3	Wnt-Kaskade
NM009523	1	WNT4	0	2	Wnt-Kaskade
NM009526	1	WNT6	0	2	Wnt-Kaskade
NM009290	1	Wnt8a	0	2	Wnt-Kaskade
NM011719	1	WNT9B	0	2	Wnt-Kaskade
NM009519	1	WNT11	0	3	Wnt-Kaskade
NM09621	1	ADAMTS1	0	3	
U43678	1	Atm	0	3	
NM020581	1	ANGPTL3	0	2	
BC002055	1	BZDR (TSPO)	0	2	
NM015733	1	Caspase9	0	2	
NM007610	1	Caspase2	0	3	
NM009809	1	Caspase14	0	2	
NM015730	1	Chrna4	0	2	
NM007744	1	Comt	0	2	
NM017477	1	Copg	0	3	
NM013492	1	CLU	0	3	
AK054053	1	Dlst	0	2	
NM007956	1	ESR1	0	3	
AK002379	1	FH1	0	3	
BC006894	1	Gja1	0	3	
NM013556	1	HPRT1	0	3	
NM008465	1	Kpna1	0	3	
AI842722	1	KCNJ8	0	3	
NM021291	1	Lanc1	0	3	
NM013604	1	Metaxin1	0	2	
NM008808	1	PDGFAG	0	3	
NM016783	1	PGR	0	3	
BC038083	1	PTGDS	0	2	
NM011503	1	Stxb2	0	3	
NM007553	0	BMP2	1	KEIN GENEPAINT	BMP-TGFβ-Kaskade

BC013459	0	BMP4	1	3	BMP-TGFβ-Kaskade
NM007664	0	CDH2	1	2	Wnt-Kaskade
NM009868	0	CDH5	1	2	Wnt-Kaskade
NM009866	0	CDH11	1	3	Wnt-Kaskade
NM007673	0	CDX	1	2	Wnt-Kaskade
NM007678	0	CEBPB	1	2	Retinsäure-Kaskade
X15789	0	Crabp	1	2	Retinsäure-Kaskade
NM007865	0	DLL1	1	3	Notch-Kaskade
AK117104	0	DLD	1	3	Notch-Kaskade
NM015814	0	Dkk 3	1	3	Wnt-Kaskade
NM007912	0	EGFR	1	3	Epidermal Growth Fact. Rec.
XM131908	0	HGF	1	2	Hepatocyt-Growth-Factor
NM008006	0	FGF2	1	1	FGF-Kaskade
NM010202	0	FGF4	1	1	FGF-Kaskade
M30643	0	FGF5	1	2	FGF-Kaskade
M92416	0	FGF6	1	2	FGF-Kaskade
NM008008	0	FGF7	1	1	FGF-Kaskade
NM010200	0	FGF13	1	3	FGF-Kaskade
AF075291	0	FGF18	1	1	FGF-Kaskade
NM212435	0	Foxp2	1	2	Wnt-Kaskade
NM007912	0	Foxb1	1	1	Wnt-Kaskade
NM008714	0	NOTCH1	1	2	Notch-Kaskade
NM008761	0	NOTCH3	1	2	Notch-Kaskade
NM013834	0	SFRP-1	1	3	Wnt-Kaskade
NM011577	0	TGFβ1	1	1	BMP-TGFβ-Kaskade
NM009367	0	TGFβ2	1	KEIN GENEPAINT	BMP-TGFβ-Kaskade
NM009368	0	TGFβ3	1	2	BMP-TGFβ-kaskade
X85993	0	SEMA3A	1	3	Notch-Kaskade
NM029438	0	Smurf1	1	2	BMP-TGFβ-Kaskade
NM009524	0	Wnt5A	1	3	Wnt-Kaskade
AK032970	0	ZFHX1B	1	3	BMP-TGFβ-Kaskade
NM175643	0	ADAMTS2	1	2	
NM153534	0	ADCY2	1	2	
X99273	0	ALDH1A2	1	3	
NM013467	0	ALDH1A1	1	3	
NM133655	0	CD81	1	2	
XM134042	0	COL4A1	1	3	
NM009932	0	COL4A2	1	3	
NM009933	0	COL6A1	1	3	
L12029	0	CXCL12	1	2	
NM007833	0	DCN	1	2	
NM0232232	0	DIABLO	1	2	
BC040218	0	Efna5	1	3	
NM010110	0	EFNB1	1	3	
NM008138	0	Gnai2	1	2	
NM013554	0	HOXD10	1	3	
NM008342	0	IGFBP2	1	2	
NM010591	0	JUN	1	2	
NM175641	0	LTBP4	1	3	
NM025282	0	MEF2C	1	2	
NM008595	0	MFNG	1	2	
NM010896	0	NEUROG1	1	2	

NM145431	0	Nle11	1	3	
NM009697	0	NR2F2	1	3	
NM008746	0	NTRK3	1	3	
NM011058	0	PDGFR-A	1	3	
NM022415	0	PGE(2)	1	2	
NM008969	0	PTGS1	1	2	
AB025412	0	ODZ3	1	2	
NM020606	0	Parva	1	3	
NM033595	0	Podhga12	1	3	
NM009299	0	Stxbp1	1	3	

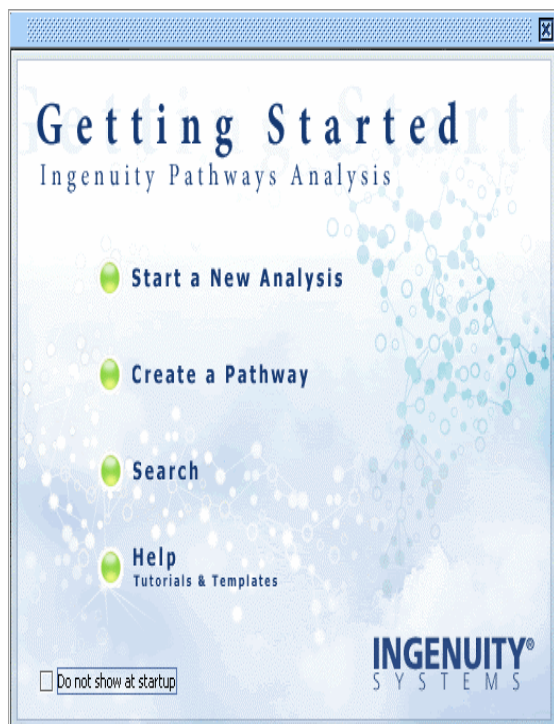
2.2 Ingenuity Pathway Analyse System

Das Ingenuity Pathway Analyse System (IPA) ist ein Bahnanalysesystem, das 1998 in den Vereinigten Staaten (Rotholz/Kalifornien) gegründet wurde und aktuell mehrere Niederlassungen in verschiedenen europäischen Staaten (u.a. Deutschland, England und Frankreich) und in Japan besitzt. Zu den zahlreichen Nutzern gehören unter anderem Institute wie Stanford Genome Technology Center, Yale University und viele andere bekannte Forschungsinstitute. Das IPA ist ein biologisches Netzwerksystem, das als analytisches Werkzeug dient und ermöglicht hierdurch, die komplizierten biologischen Systeme zu modellieren, zu analysieren und zu verstehen. In dem Datenwerk sind Millionen von molekularen Interaktionen zwischen verschiedensten Faktoren integriert. So sind zum Beispiel in dem Netzwerk über 23900 Säugetier-Gene (davon 10300 Maus, 5200 Mensch und 8400 Ratte) erfasst. Die semantische Übereinstimmung basiert auf einer kompletten Ontologie mit über 500000 Konzepten, die in das System integriert sind und somit Millionen von molekularen Interaktionen ermöglichen. Mit Hilfe dieses Datensystems kann man eigene biologische Einheiten und damit auch eigene Bahnungssysteme erstellen. Durch die Bahnungssysteme schafft man einen Überblick über verschiedenste intermolekulare Interaktionen und gewinnt dadurch neue Erkenntnisse über mögliche gegenseitige induktive und inhibitorische molekulare Mechanismen. Zudem kann man mit Hilfe dieser Pathway-Analysen Informationen über mögliche neue Faktorkandidaten erhalten, die einen Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der intestinalen Stammzellnische besitzen. Die Untersuchung dieser neuen Faktorkandidaten könnte dann als Ansatz für weitere experimentelle Arbeiten im Labor dienen.

2.2.1 Durchführung einer IPA-Analyse

Für die IPA-Analyse werden die bereits in der Excel-Tabelle beschriebene 118 Faktoren verwendet. Die Durchführung der Analyse wird anhand der Abbildungen chronologisch in einzelnen Schritten kurz beschrieben.

A



B

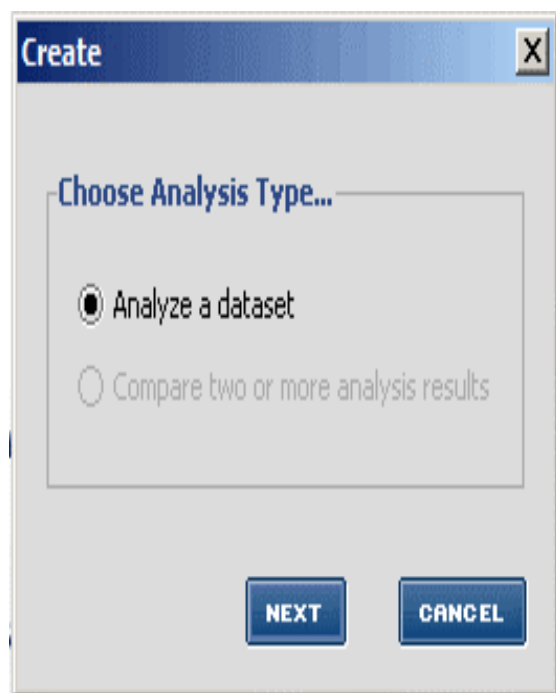


Abb. 9A: 1. Schritt, durch Anklicken auf “Start a New Analysis“ erscheint der im 2. Schritt (**B**) dargestellte Feld. Durch Anklicken auf das Feld “Analysis a dataset“ können die für die IPA benötigten Faktoren im Excel-Format in dem Ingenuitysystem heruntergeladen („upload“) werden (entnommen aus: ingenuity.com).

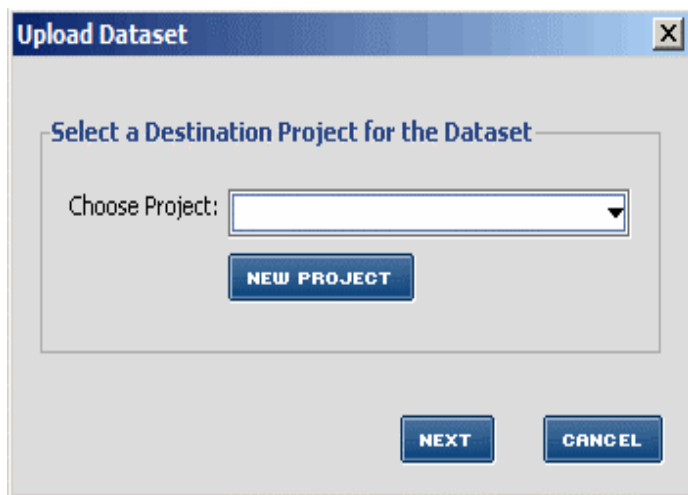


Abb. 9C: 3. Schritt: Durch das Feld „New Project“ kann man das entsprechende Analyseprojekt beliebig benennen (hier z.B. „circadian Rhythm“) (entnommen aus: ingenuity.com).

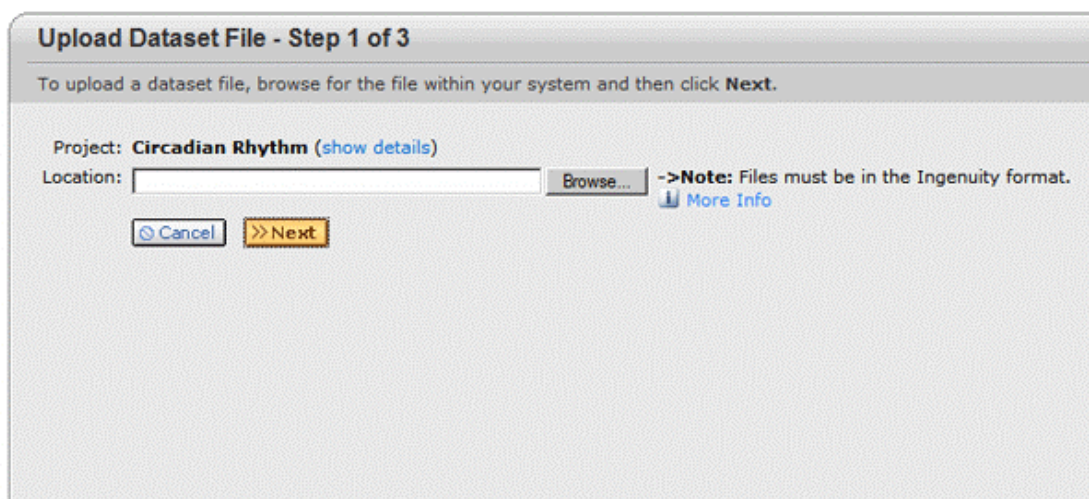



Abb. 9D: 4. Schritt: Dieses Feld zeigt, dass die entsprechenden Daten in dem IPA-System heruntergeladen wurden (entnommen aus: ingenuity.com)

p-value 	GenBank	Gene	Description	Location	Family	Drugs
0.000	AF075291	FGF18	fibroblast growth factor 18	Extracellular Space	growth factor	
0.000	BC013459	BMP4	bone morphogenetic protein 4	Extracellular Space	growth factor	
0.000	M30643	FGF5	fibroblast growth factor 5	Extracellular Space	growth factor	
0.000	BC037107	ADCY2	adenylate cyclase 2 (brain)	Plasma Membrane	enzyme	
0.000	AJ639842	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	Extracellular Space	growth factor	AP-12009
1.000	X76290	SHH	sonic hedgehog homolog (Drosophila)	Extracellular Space	peptidase	
1.000	AF009011	AXIN1	axin 1	Cytoplasm	other	
1.000	AB210001	APC	adenomatosis polyposis coli	Nucleus	enzyme	
1.000	AB066114	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	Nucleus	kinase	enzastaurin

2000-2006 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved

Abb. 9E: 5. Schritt: Die heruntergeladenen Daten sind in Ingenuity-Format dargestellt (die erste Spalte steht für das p-Value im epithelialen Kompartiment, d.h. das $p=1$ weist auf epitheliale und $p=0$ auf subepitheliale Faktoren hin. Die zweite Spalte zeigt die für die jeweiligen Faktoren spezifischen Accessions-Nummern in der GenBank. Die vierte Spalte charakterisiert kurz die einzelnen Faktoren. Die fünfte Spalte zeigt die Lokalisation dieser Faktoren. Die sechste Spalte zeigt die Familienzugehörigkeit der Faktoren und die siebente Spalte weist, sofern vorhanden, auf die Medikamente hin, durch die man die entsprechenden Faktoren von extern beeinflussen kann (entnommen aus: ingenuity.com)).

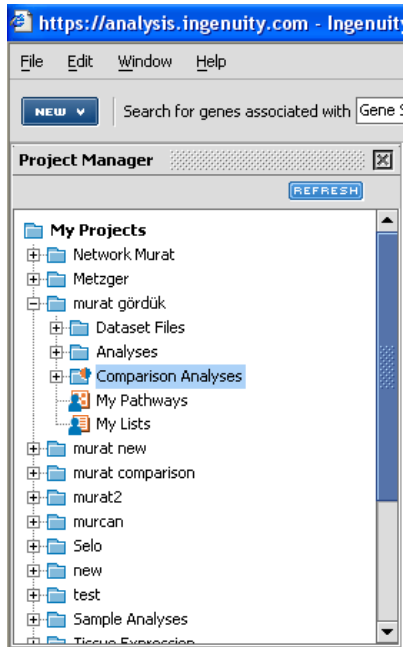
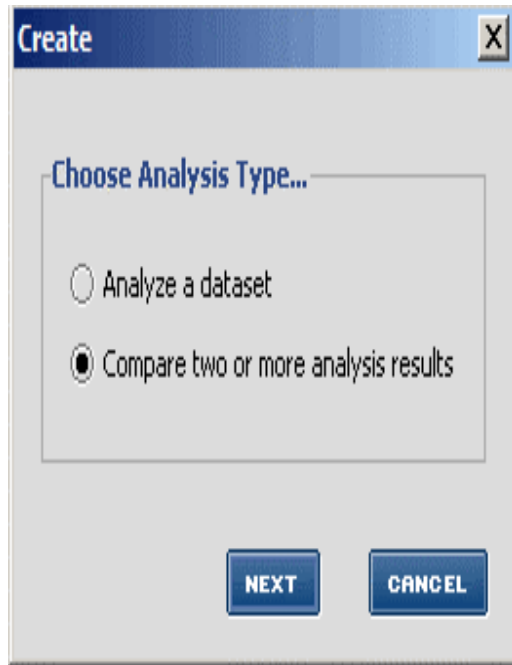
F**G**

Abb. 9 F: 6. Schritt. Die zu analysierenden Daten, sowie weitere analysierte Daten werden im „Projekt Manager“ gespeichert (**F**). Diese Daten können im System gespeichert bleiben oder auch durch Anklicken auf das Feld „Compare two or more analysis results“ (**G**) mit anderen Analysen und anderen Bahnungssysteme verglichen werden (z.B. epitheliale Faktoren mit subepithelialen Faktoren (entnommen aus: ingenuity.com)).

3. Ergebnisse

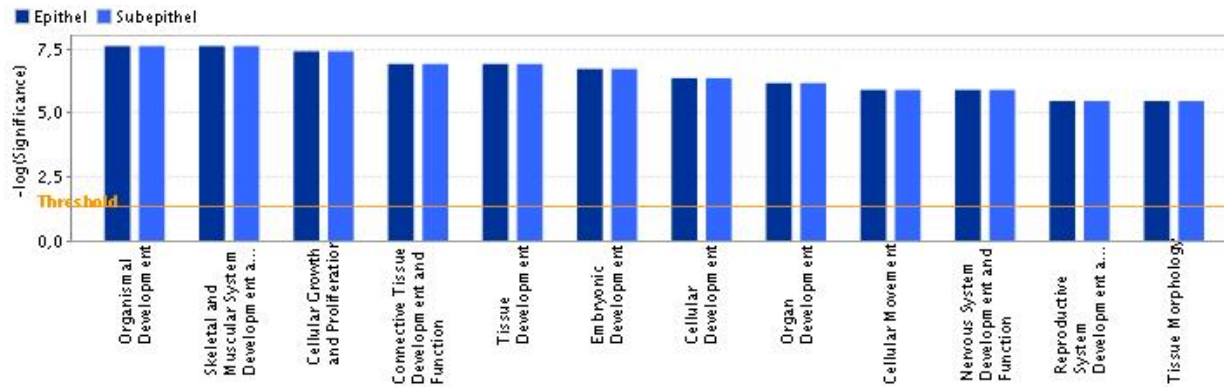
Von den insgesamt 118 Faktoren, die für die Analyse benutzt wurden, sind vom Ingenuity-System 35 (18 epitheliale und 17 subepitheliale) Faktoren als relevant identifiziert worden. Aus diesen analysierten 35 Faktoren sind vom System zwei voneinander unabhängige Networks aufgebaut worden. Jedes dieser Networks besteht je aus einem epithelialen und einem subepithelialen Pathway (insgesamt vier Pathway-Analysen). Aus den Bahnungssystemen beider Networks sind 62 neue Faktorkandidaten identifiziert worden, welche eine molekulare Interaktion mit den o.g. 35 Faktoren eingehen. Anhand direkter und/oder indirekter molekularer Interaktionen der Faktoren bzw. Faktorkandidaten untereinander und ihrer Lokalisation im Pathway ist es möglich, ihre Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von intestinalen epithelialen Stammzellen einzuschätzen.

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Networks, der Pathway-Analysen, der Score- und Focus-Gene sowie die Funktion dieser Faktoren im Organismus. Dabei stehen die Focus-Gene für die insgesamt 35 Faktoren, die für die IPA-Analyse benutzt wurden, während die Score-Gene diejenigen Gene sind, die im Rahmen dieser Interaktion als neue Faktoren bzw. Faktorkandidaten identifiziert wurden.

Network	Pathway-Analyse	Score-Gene	Focus-Gene	Top-functions
1	Epithel	17	17	Embryonic Development, Cell Signaling
1	Subepithel	15	18	Cellular, Embryonic and Tissue Development
2	Epithel	22	13	Cell Death, Cellular Movement, Cancer
2	Subepithel	20	15	Cell Morphology, Cell Death, Gene Expression

3.1 Rolle der analysierten Faktoren im Organismus

Die vom IPA-System analysierten Faktoren spielen nicht nur bei Proliferation, Differenzierung und Regeneration von intestinalen Stammzellen eine wichtige Rolle, sondern sind auch an zahlreichen anderen Entwicklungsprozessen im Organismus beteiligt. Hierzu zählt unter anderem die Entwicklung der muskuloskeletalen, embryonalen und zellulären Systeme.



©2000-2006 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 10: Graphische Darstellung der verschiedenen Entwicklungsprozesse, bei denen die analysierten Faktoren im Organismus eine Rolle spielen.

3.1.1 Ergebnis-Tabelle

Die vom Ingenuity-System analysierten Faktoren werden wie folgt in der Ergebnis-Tabelle unterteilt:

Die Gesamtzahl der Faktoren in der Ergebnis-Tabelle beträgt 97.

1. Epitheliale Faktoren, die für die Analyse benutzt wurden: 18 Faktoren (davon 10 aus der Literatur bekannte und 8 nicht bekannte Faktoren, die türkis gefärbt sind)
2. Subepitheliale Faktoren, die für die Analyse benutzt wurden: 17 Faktoren (davon 12 aus der Literatur bekannte und 5 nicht bekannte Faktoren, die rosa gefärbt sind)
3. Neue epitheliale Faktorkandidaten aus der Analyse: 27 Faktoren (gelb gefärbt)
4. Neue subepitheliale Faktorkandidaten aus der Analyse: 23 Faktoren (weiß gefärbt)
5. Sowohl im Epithel als auch im Subepithel vorkommende Faktorkandidaten aus der Analyse: 12 Faktoren (grün gefärbt)

Außer einer Änderung entspricht die Tabelle der in Abschnitt 2.1.4 beschriebenen Excel-Tabelle. Die siebente Spalte zeigt Medikamente, sofern vorhanden, die einen regulativen Einfluss auf den entsprechenden Faktor ausüben.

Gene Bank	Epithel (p-value)	Name	Subepithel (p-value)	Expression	Signalkaskade	Medikamente
AB210001	1	APC	0	2	WNT-Kaskade	
AF009011	1	AXIN1	0	3	WNT-Kaskade	
XM128515	1	AXIN2	0	2	WNT-Kaskade	
AI663515	1	BMPR1A	0	2	BMP-TGFβ-Kaskade	
NM007888	1	DSH	0	2	WNT-Kaskade	
AB066114	1	GSK3B	0	2	WNT-Kaskade	Enzastaurin
AF064984	1	LRP5	0	2	WNT-Kaskade	
NM008711	1	NOG	0	Kein Genepaint	BMP-TGFβ-Kaskade	
X76290	1	SHH	0	3	Hedgehog-Kaskade	
NM008539	1	SMAD1	0	2	BMP-TGFβ-Kaskade	
U43678	1	ATM	0	3		
NM013492	1	CLU	0	3		
AK054053	1	DLST	0	2		
AK002379	1	FH	0	3		
BC006894	1	GJA1	0	3		
AI842722	1	KCNJ8	0	3		Minoxidil
BC038083	1	PTGDS	0	1		
BC002055	1	TSPO (BZDR)	0	2		Fluoxetine
BC013459	0	BMP4	1	3	BMP-TGFβ-Kaskade	
NM007678	0	CEBPB	1	2	Retinsäure-Kaskade	
X15789	0	CRABP1	1	2	Retinsäure-Kaskade	
AK117104	0	DLD	1	3	Notch-Kaskade	
NM008006	0	FGF2	1	1	FGF-Kaskade	
NM010202	0	FGF4	1	1	FGF-Kaskade	
M30643	0	FGF5	1	2	FGF-Kaskade	
M92416	0	FGF6	1	2	FGF-Kaskade	
AF075291	0	FGF18	1	1	FGF-Kaskade	
X85993	0	SEMA3A	1	3	Notch-Kaskade	
Kein Genepaint	0	TGFβ2	1	Kein Genepaint	BMP-TGFβ-Kaskade	
AK032970	0	ZFHX1B	1	3	BMP-TGFβ-Kaskade	
BC037107	0	ADCY2	1	2		
X99273	0	ALDH1A2	1	3		
L12029	0	CXCL12	1	3		
BC040218	0	EPHA5	1	3		
AB025412	0	ODZ3	1	2		
NM007388	1	ACP5	0	1		
NM033620	1	ASIP	0	2		
kein Genepaint	1	BAPX1	0	Kein Genepaint		
NM033601	1	BCL3	0	2		
NM007815	1	CYP2C9	0	2		
NM145614	1	DLAT	0	2		
NM010139	1	EPHA2	0	1		dasatinib
NM007936	1	EPHA4	0	3		
NM007948	1	ERCC1	0	1		
NM011824	1	GREM1	0	1		
NM019564	1	HTRA1	0	1		

kein Genepaint	1	ITGAL	0	Kein Genepaint		efalizumab
kein Genepaint	1	ITGAX	0	Kein Genepaint		
NM010717	1	LIMK1	0	2		
NM013871	1	MAPK12	0	3		
NM008609	1	MMP15	0	3		
kein Genepaint	1	MRLC2	0	Kein Genepaint		
NM016701	1	NES	0	2		
NM008810	1	PDHA1	0	3		
NM175094	1	PDHX	0	2		
NM009026	1	RASD1	0	1		
kein Genepaint	1	ROCK1	0	Kein Genepaint		
NM011299	1	RPS6KA	0	1		
kein Genepaint	1	SITPEC	0	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	SMAD9	0	Kein Genepaint		
NM172553	1	TDG	0	3		
NM01047	1	XRCC6	0	3		
Kein Genepaint	0	ALAD	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	APCDD1	1	Kein Genepaint		
NM008488	0	ARHGEF1	1	3		
NM011338	0	CCL9	1	1		
NM139059	0	CSNK1D	1	2		
NM007830	0	DBI	1	2		
Kein Genepaint	0	DIAPH1	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	DUSP10	1	Kein Genepaint		
NM010122	0	EIF2B4	1	1		
Kein Genepaint	0	FRAT1	1	Kein Genepaint		
X65128	0	GAS1	1	3		
NM008109	0	GDF5	1	3		
NM011821	0	GPC6	1	3		
NM013820	0	HK2	1	3		
Kein Genepaint	0	KIFAP3	1	Kein Genepaint		
NM008492	0	LDHB	1	2		
AB038697	0	OLIG2	1	1		
NM026737	0	PHF5A	1	2		
NM013807	0	PLK3	1	3		
NM011122	0	PLOD1	1	2		
NM008926	0	PRKG2	1	1		
Kein Genepaint	0	PPP2R5A	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	SEN2	1	Kein Genepaint		
NM133828	1	CREB	1	3		
NM010207	1	FGFR-2	1	3		
NM010234	1	FOS	1	1		
kein Genepaint	1	HRAS	1	Kein Genepaint	IL-1 Trap	
kein Genepaint	1	IL1B	1	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	INS1	1	Kein Genepaint		
NM011949	1	MAPK1	1	3		
NM010849	1	MYC	1	3		
NM010956	1	OGDH	1	3		
NM024221	1	PDHB	1	3		

kein Genepaint	1	RHOA	1	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	SRF	1	Kein Genepaint		

3.1.2 Faktoren ohne Expressionsbild bei Genepaint.org

Von den oben genannten 97 Faktoren waren zum Zeitpunkt der Arbeit insgesamt 22 Faktoren ohne Expressionsbild bei Genepaint.org. Informationen über die mögliche Bedeutung dieser Faktoren bzw. Faktorkandidaten im Darmtrakt kann man daher, sofern vorhanden, nur anhand der Literaturhinweise und ihrer Interaktionsmuster in den Pathways im IPA gewinnen. Diese Faktoren werden wie folgt unterteilt:

1. 1 bekannter epithelialer Faktor (türkis gefärbt)
2. 1 bekannter subepithelialer Faktor (rosa gefärbt)
3. 7 neue epitheliale Faktoren (gelb gefärbt)
4. 8 neue subepitheliale Faktoren (weiß gefärbt)
5. 5 neue Faktoren, die sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Kompartiment vorkommen (grün gefärbt)

Gene Bank	Epithel (p-value)	Name	Subepithel (p-value)	Expression	Signalkaskade	Medikamente
NM008711	1	NOG	0	Kein Genepaint	BMP-TGFβ-Kaskade	
Kein Genepaint	0	TGFβ2	1	Kein Genepaint	BMP-TGFβ-Kaskade	
kein Genepaint	1	BAPX1	0	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	ITGAL	0	Kein Genepaint		efalizumab
kein Genepaint	1	ITGAX	0	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	MRLC2	0	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	ROCK1	0	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	SITPEC	0	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	SMAD9	0	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	ALAD	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	APCDD1	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	DIAPH1	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	DUSP10	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	FRAT1	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	KIFAP3	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	PPP2R5A	1	Kein Genepaint		
Kein Genepaint	0	SEN2	1	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	HRAS	1	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	IL1B	1	Kein Genepaint		IL-1 Trap
kein Genepaint	1	INS1	1	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	RHOA	1	Kein Genepaint		
kein Genepaint	1	SRF	1	Kein Genepaint		

3.2 Beschreibung von Pathway-Analysen:

Da in den vier Bahnungsanalysen insgesamt 97 Faktoren bzw. Faktorkandidaten teilnehmen, werden nur die Faktoren als „relevant“ angesehen und näher charakterisiert, die mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllen:

- Sie sind in der ECM (extrazellulären Matrix) bzw. in der äußeren Zellmembran lokalisiert und weisen zwei oder mehr intermolekulare Interaktionen mit anderen wichtigen Faktoren in einem Pathway auf.
- Sie weisen als neu identifizierte Faktorkandidaten unabhängig von ihrer Lokalisation zwei oder mehr molekulare Interaktionen in beiden Pathways eines Networks auf.

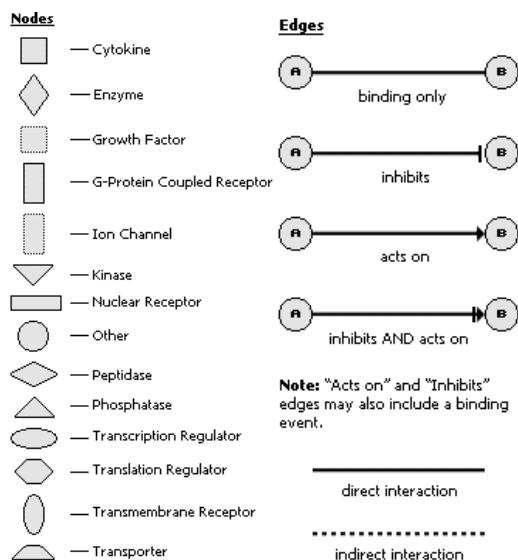


Abb. 11: Legende der Faktorkandidaten, die im IPA-System als Zytokin, Enzym, Hormon, Ionenkanal etc. mit anderen Interaktionspartner in unterschiedlicher Art und Weise interagieren können (entnommen aus: ingenuity.com).

3.2.1 Network 1 Analyse

Das Network 1 ist aus einem epithelialen und einem subepithelialen Pathway aufgebaut.

3.2.1 A) Pathway im epithelialen Kompartiment

Die Gesamtzahl der an der Bahnungsanalyse teilnehmenden Faktoren beträgt 34, die wie folgt unterteilt werden:

1. Epitheliale Faktoren, die für die Analyse im IPA-System benutzt wurden: 6 (8) Faktoren (hellrosa gefärbt). Die epithelialen Faktoren besitzen im epithelialen Kompartiment eine mittlere bis starke Expression und dienen als Hauptinteraktionspartner für die subepithelialen Faktoren, die in diesem Kompartiment eine schwache Expression aufweisen. Zu den epithelialen Faktoren gehören die sechs Faktoren SHH, KCNJ8, BMBR1A, PTGDS, DLST und ATM sowie die beiden Faktoren NOG und SMAD1, die vom IPA unter einer anderen ID-Nummer (Identification Number) aufgeführt werden und daher nicht hellrosa, sondern blau gefärbt sind.

2. Subepitheliale Faktoren, die für die IPA-Analyse benutzt wurden: 9 Faktoren (rot gefärbt). Diese subepithelialen Faktoren bilden die Interaktionspartner für die o.g. Faktoren. Hierzu zählen FGF2, FGF5, FGF6, FGF18, TGF β 2, BMP4, ADCY2, DLD und ZFHX1B.

3. Vom IPA als neu identifizierte Faktoren, die in Network 1 sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway vertreten sind: Hierzu zählen 6 Faktoren IL1B, INS1, FGFR2, MAPK1, PDHB und OGDH (grün gefärbt).

4. Vom IPA-System als neu identifizierte Faktoren: 11 Faktoren (weiß gefärbt). Diese neuen Faktorkandidaten sind nur in dem epithelialen Pathway vertreten. Hierzu gehören GREM1, ASIP1, HTRA1, NES, RASD1, PDHX, PDHA1, DLAT, BABX1, SITPEC und SMAD9.

Die unter Punkt 1 und 2 angegebenen Faktoren bilden die Focus-Gene und die Faktoren unter Punkt 3 und 4 die Score-Gene. Anhand der Analyse von 15 (17) Focus-Gene sind 17 mögliche neue Faktorkandidaten als Score-Gene identifiziert worden, von denen 11 Faktoren nur auf das epitheliale Bahnungssystem begrenzt sind.

Aus ursprünglich 118 Faktoren, die für die IPA-Analyse benutzt wurden, sind vom IPA-System lediglich 35 (18 epitheliale und 17 subepitheliale) als Focus-Faktoren erkannt und analysiert worden. Von diesen 35 Faktoren sind in dem Pathway 15 (17) Focus-Faktoren vertreten (6 (8) epitheliale und 9 subepitheliale Faktoren). Dabei zeigen folgende Faktoren im epithelialen Pathway ein relevantes Interaktionsmuster:

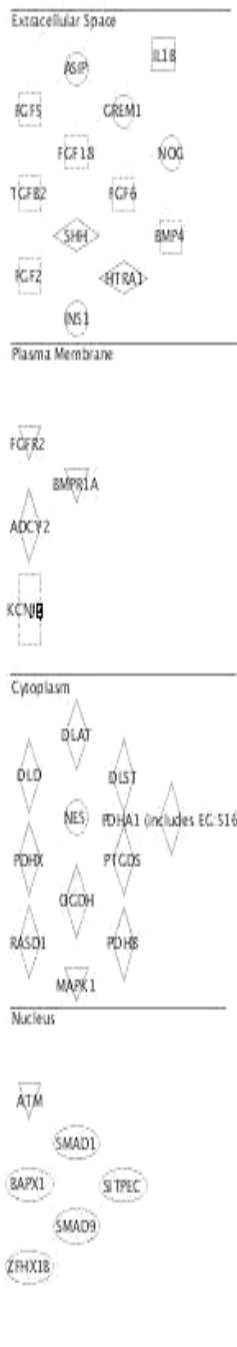
A) Faktoren der ECM (extrazellulären Matrix): Von den Focus-Faktoren zeigen zwei epitheliale Faktoren (SHH und NOG) und fünf subepitheliale Faktoren (FGF2, FGF5, FGF6, TGF β 2 und BMP4) eine starke Interaktion im Pathway. Von den Score-Faktoren, die nur im epithelialen Pathway vorkommen, weisen drei Faktoren (HTRA1, GREM1 und ASIP) eine relevante Interaktion auf. Von den Score-Faktoren, die in beiden Pathways des Networks 1 vertreten sind, fallen die beiden Proteine der ECM (INS1 und IL1B) durch ein starkes Interaktionsmuster auf.

B) Faktoren in der Zellmembran (Oberflächenproteine): Von den Focus-Faktoren zeigt ein epithelialer (BMPR1A) und ein subepithelialer Faktor (ADCY2) eine relevante Interaktion. Von den Score-Faktoren weist nur der Faktor FGFR2 eine starke Interaktion auf. Dieser Faktor ist in beiden Pathways von Network 1 vertreten.

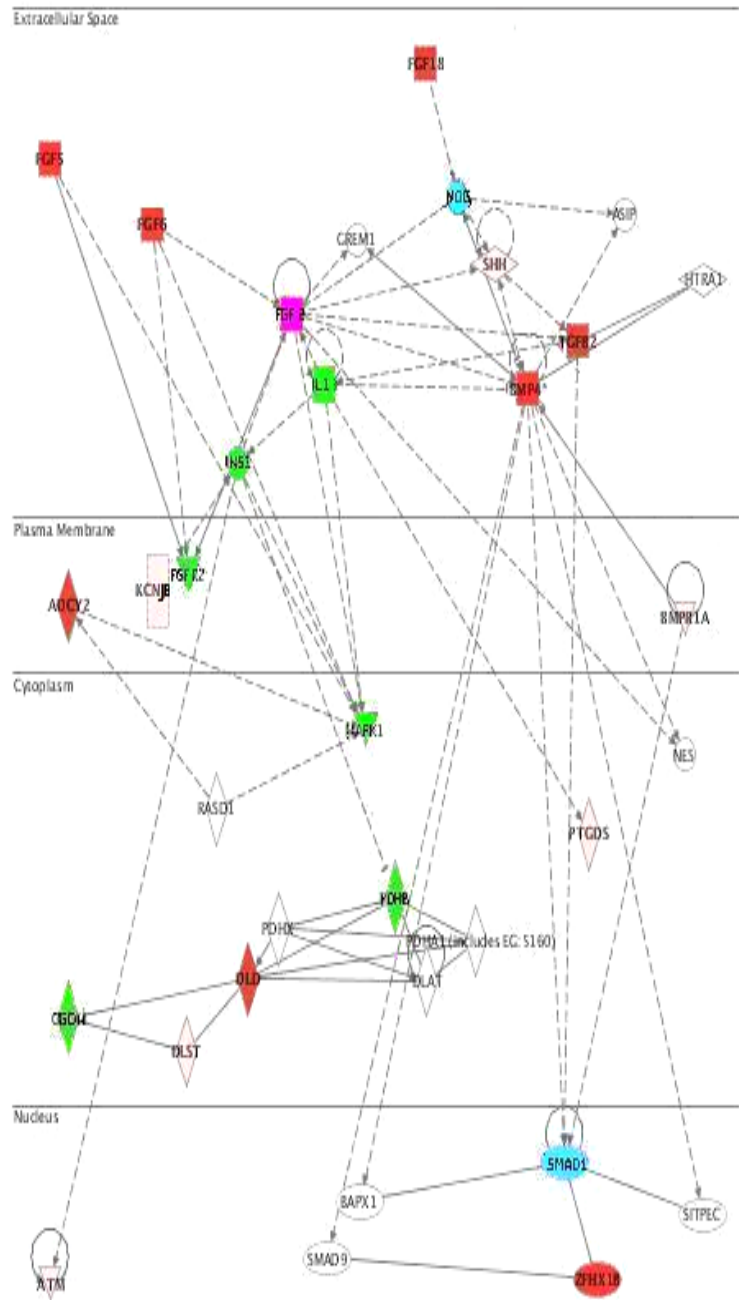
C) Score-Faktoren, die in beiden Pathways in Network 1 eine relevante Interaktion besitzen: Neben den bereits erwähnten Faktoren der ECM (INS1 und ILB1) und dem Oberflächenprotein FGFR2 zeigen zudem die drei zytoplasmatischen Faktoren MAPK1, OGDH und PDHB eine relevante Interaktion.

Die unten dargestellte Tabelle fasst die im Pathway hervortretenden Faktoren zusammen. Von den insgesamt 15 (17) Focus-Faktoren besitzen lediglich 8 (9) Faktoren und von den 17 Score-Faktoren nur 9 Faktoren ein relevantes Interaktionsmuster im Pathway.

Faktoren mit einem starken Interaktionsmuster in Network 1/Pathway A			
Focus-Gene (insgesamt 15 (17) Faktoren)		Score-Gene (insgesamt 17 Faktoren)	
Epithel	Subepithel	Epithel	Epithel+Subepithel
2 (3) von 6 (8) Faktoren	6 von 9 Faktoren	3 von 11 Faktoren	6 von 6 Faktoren
SHH, (NOG), BMPR1A	BMP4, FGF2/5/6, TGFβ2, ADCY2	HTRA1, GERM1, ASIP1	INS1, IL1B, FGFR2, MAPK1, PDHB, OGDH



Comparison between epithelial vs. subepithelial



Unknown

©2000-2006 Inaenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 12A: Molekulare Interaktionen des epithelialen Pathways A/Network 1. In diesem Bahnungssystem stehen alle am Pathway teilnehmenden Faktoren, die je nach Lokalisation in extrazelluläres Kompartiment, Plasmamembran, Zytoplasma und Zellkern eingeteilt sind.

3.2.1 B) Pathway im subepithelialen Kompartiment

In diesem Pathway nehmen insgesamt 33 Faktoren an der Bahnungsanalyse teil, die wie folgt unterteilt werden:

1. In dem Bahnungssystem werden die Hauptinteraktionspartner von 8 (10) subepithelialen Faktoren gebildet (hellrosa gefärbt). Hierzu gehören FGF1, FGF5, FGF6, TGF β 2, BMP4, ADCY2, DLD und ZFHX1B, wobei der neunte und der zehnte Faktor FGF2 und FGF4 vom IPA-System unter anderen ID-Nummern aufgeführt werden und deswegen dunkel rosa gefärbt sind.

2. Die epithelialen Faktoren, die vom IPA analysiert wurden: 6 (8) Faktoren (rot gefärbt). Diese bilden gemeinsam mit den o.g. 8 (10) Faktoren die Focus-Gene. Hierzu zählen SHH, KCNJ8, BMBR1A, PTGDS, DLST und ATM, wobei zwei weitere Faktoren NOG und SMAD1 vom IPA unter anderen ID-Nummern aufgeführt werden und daher blau dargestellt sind.

3. Vom IPA als neu identifizierte Faktoren, die in Network 1 sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway vertreten sind: 6 Faktoren (grün gefärbt). Hierzu zählen IL1, INS1, FGFR2, MAPK1, PDHB und OGDH.

4. Vom IPA-System als neu identifizierte subepitheliale Faktoren: 9 Faktoren (weiß gefärbt). Diese Faktorkandidaten sind nur in dem subepithelialen Pathway vertreten. Hierzu gehören GDF5, CCL9, GPC1, ALAD, LDHB, HK2, OLIG2, PLK3 und DUSP10.

Anhand der Analyse lassen sich in diesem Pathway folglich 15 Score-Gene identifizieren, wobei 9 Faktoren auf die Submukosa begrenzt sind und 6 Faktoren sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway vorkommen.

Folgende Faktoren im subepithelialen Pathway weisen eine relevante Interaktion auf:

A) Faktoren der ECM (extrazellulären Matrix): Von den Focus-Faktoren zeigen zwei epitheliale Faktoren (SHH und NOG) und sechs subepitheliale Faktoren (FGF2, FGF4, FGF5, FGF6, TGF β 2 und BMP4) ein relevantes Interaktionsmuster. Von den Score-Faktoren, die nur im subepithelialen Pathway vertreten sind, besitzen nur zwei Faktoren (CCL9 und GDF5) eine relevante Interaktion. Von den Score-Faktoren, die in beiden Pathways in Network 1 vertreten sind, fallen die beiden Faktoren INS1 und IL1B durch ein starkes Interaktionsmuster auf.

B) Faktoren in der Zellmembran (Oberflächenproteine): Von den Focus-Faktoren fallen die beiden epithelialen Oberflächenproteine BMBR1A und KCNJ8 durch eine relevante Interaktion auf. Von den neu identifizierten Faktorkandidaten besitzt nur das Oberflächenprotein GPC1 eine relevante Interaktion, wobei dieses auf das subepitheliale Kompartiment begrenzt ist. Von den

Faktorkandidaten, die in beiden Pathways vertreten sind, besitzt nur das Oberflächenprotein FGFR2 eine starke Interaktion.

C) Score-Faktoren, die in beiden Pathways in Network 1 eine relevante Interaktion besitzen: Neben den erwähnten Faktoren der ECM (INS1 und ILB1) und dem Oberflächenprotein FGFR2 fallen zudem die drei zytoplasmatischen Faktoren MAPK1, OGDH und PDHB auf.

Von den 35 Faktoren, die vom IPA für die Bahnungsanalysen benutzt wurden, sind in dem Pathway 14 (18) Focus-Faktoren beteiligt. Zudem sind anhand der molekularen Interaktionen 15 weitere mögliche neue Faktorkandidaten identifiziert worden, wobei lediglich 9 Faktoren eine relevante Interaktion aufweisen. Dabei sind 6 von diesen 9 Faktorkandidaten sowohl im epithelialen als im subepithelialen Pathway in Network 1 vertreten, während 3 Faktoren nur auf das subepitheliale Pathway begrenzt sind. Diese Faktoren sind in der unten dargestellten Tabelle aufgelistet.

Faktoren mit einem starken Interaktionsmuster in Network 1/Pathway B			
Focus-Gene (insgesamt 14 (18) Faktoren)		Score-Gene (insgesamt 15 Faktoren)	
Epithel	Subepithel	Subepithel	Epithel+Subepithel
3 (4) von 6 (8) Faktoren	4 (6) von 8 (10) Faktoren	3 von 9 Faktoren	6 von 6 Faktoren
SHH, (NOG), BMBR1A, KCNJ8	FGF(2),(4)/5/6, BMP4, TGFβ2	CCL9, GDF5, GPC1	INS1, IL1, FGFR2, MAPK1, OGDH, PDHB

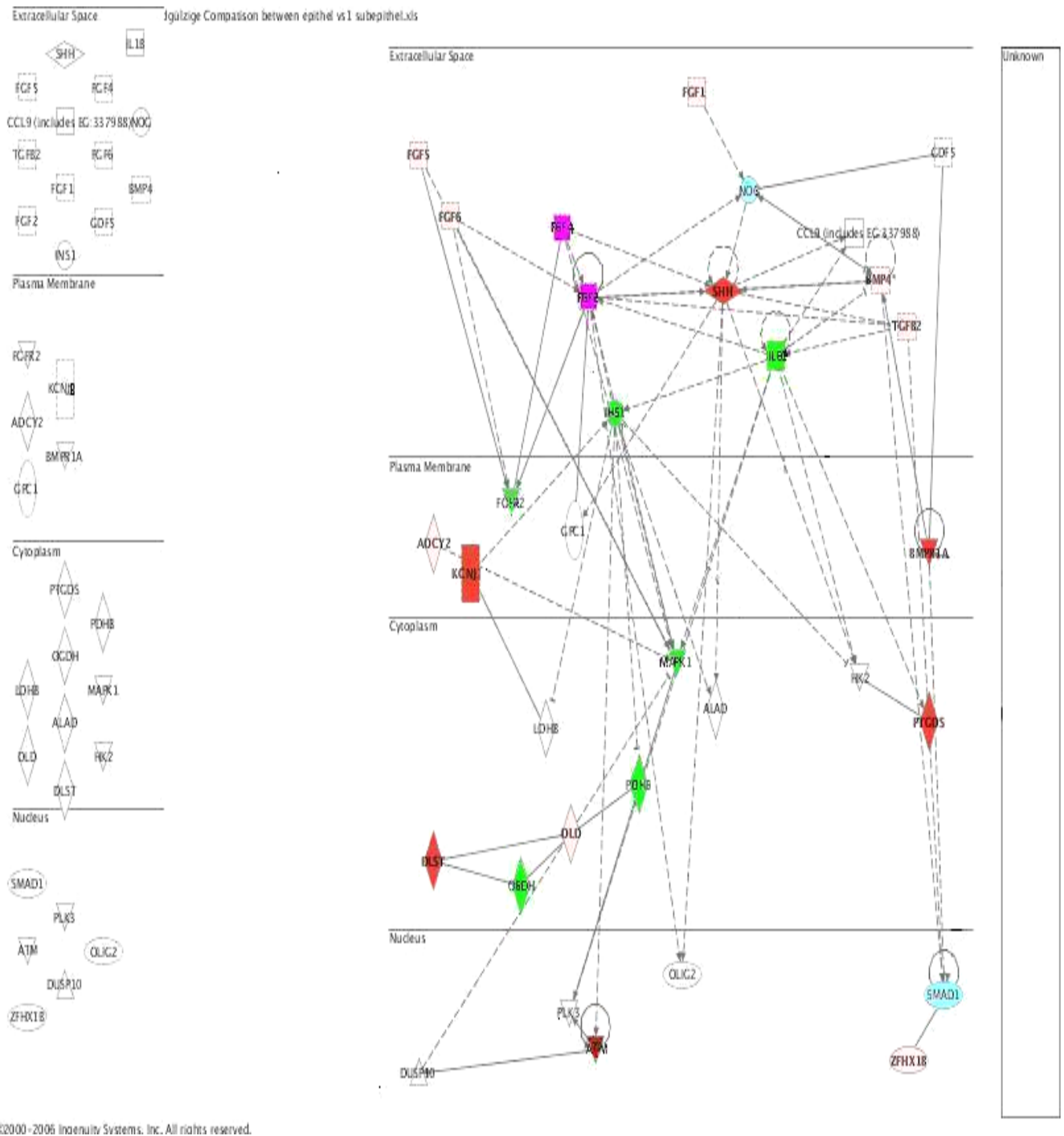


Abb. 12B: Molekulare Interaktionen des subepithelialen Pathways B/Network 1. In diesem Bahnungssystem stehen alle am Pathway teilnehmenden Faktoren, die je nach Lokalisation in extrazelluläres Kompartiment, Plasmamembran, Zytoplasma und Zellkern eingeteilt sind.

3.2.2 Network 2 Analyse

Das Network 2 besteht ebenfalls aus einem epithelialen und einem subepithelialen Pathway.

3.2.2 A) Pathway im epithelialen Kompartiment

An diesem Pathway nehmen insgesamt 35 Faktoren an der Bahnungsanalyse teil, die wie folgt unterteilt werden:

1. Epitheliale Faktoren, die als Hauptinteraktionspartner dienen (hellrosa gefärbt). Hierzu gehören die 7 Faktoren CLU, LRP5, GJA1, AXIN1, TSPO, GSK3B und APC.

2. Subepitheliale Faktoren bilden hier die Interaktionspartner für die epithelialen Faktoren (rot gefärbt). Hierzu gehören die 6 Faktoren SEMA3A, CXCL12, EPHA5, ODZ3, ALDH1A2 und CRABP1.

3. Die grün dargestellten sechs Faktoren HRAS, RHOA, SRF, CEBPB, MYC und FOS sind die neuen Faktorkandidaten, die sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway vorkommen.

4. Die weiß dargestellten Faktoren bilden die Faktorkandidaten, die nur im epithelialen Pathway vertreten sind. Hierzu gehören 16 Faktoren MMP11, EPHA4, EPHA2, ITGAL, ITGAX, ACP5, MRLC2, MAPK12, LIMK1, RPSGKA3, ROCK1, CYP2C9, ERCC1, TDG, BCL3 und XRCC3.

Die Faktoren unter Punkt 3 und 4 bilden gemeinsam die Score-Gene. Folglich sind anhand der Analyse von 13 Focus-Genen 22 mögliche neue Faktorkandidaten als Score-Gene identifiziert worden, von denen 16 Faktoren auf den epithelialen Pathway begrenzt sind.

Folgende Faktoren im epithelialen Pathway besitzen eine relevante Interaktion:

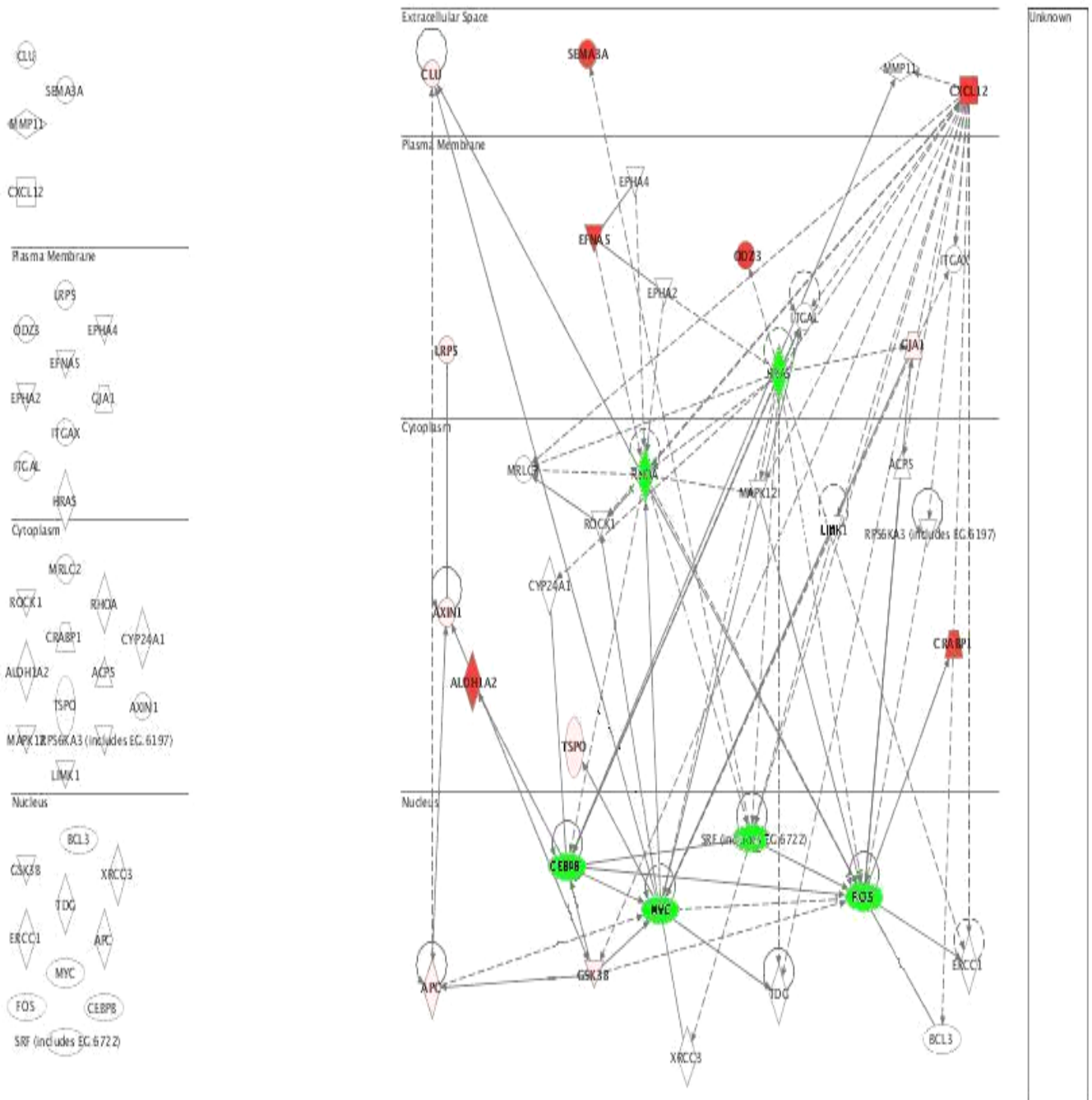
A) Faktoren der ECM (extrazellulären Matrix): Von den Focus-Faktoren zeigt der epitheliale Faktor CLU eine mittelstarke und der subepitheliale Faktor CXCL12 eine starke Interaktion. Von den Score-Faktoren weist nur ein Faktor (MMP11) eine relevante Interaktion auf.

B) Faktoren in der Zellmembran (Oberflächenproteine): Von den Focus-Faktoren fallen nur der epitheliale Faktor GJA1 und der subepitheliale Faktor EPHA5 in der Zellmembran auf. Von den neu identifizierten epithelialen Faktoren, die nur in diesem Pathway vertreten sind, zeigen drei Oberflächenproteine (ITGAL, ITGAX und EPHA4) ein starkes Interaktionsmuster. Von den Faktoren, die in beiden Pathways (Network 2) vertreten sind, zeigt das Oberflächenprotein HRAS eine starke Interaktion im Pathway.

C) Score-Faktoren, die in beiden Pathways in Network 2 eine relevante Interaktion besitzen: Neben HRAS gehören das zytoplasmatische Protein RHOA und die vier Transkriptionsfaktoren MYC, SRF, FOS und CEBPB zu den relevanten Faktoren.

Von 13 Focus-Faktoren (7 epitheliale und 6 subepitheliale) zeigen nur 4 Faktoren (2 epitheliale und 2 subepitheliale) eine auffällige Interaktion. Von den neu identifizierten 16 epithelialen Faktorkandidaten weisen 4 Faktoren ein dichtes Interaktionsmuster auf. Alle Faktorkandidaten, die sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway vertreten sind, besitzen ein starkes Interaktionsmuster. Diese Faktoren werden in der unten dargestellten Tabelle wie folgt unterteilt

Faktoren mit einem mittelstarken bis starken Interaktionsmuster in Network 2/Pathway A			
Focus-Gene (insgesamt 13 Faktoren)		Score-Gene (insgesamt 22 Faktoren)	
Epithel	Subepithel	Epithel	Epithel+Subepithel
2 von 7 Faktoren.	2 von 6 Faktoren	4 von 16 Faktoren	6 von 6 Faktoren
CLU, GJA1	CXCL12, EPHA5	MMP11, ITGAL, ITGAX, EPHA4	RHOA, HRAS, MYC SRF, FOS, CEBPB



©2000-2006 Inaenvity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 13A: Molekulare Interaktionen des epithelialen Pathways A/Network 2. In diesem Bahnungssystem stehen alle am Pathway teilnehmenden Faktoren, die je nach Lokalisation in extrazelluläres Kompartiment, Plasmamembran, Zytoplasma und Zellkern eingeteilt sind.

3.2.2 B) Pathway im subepithelialen Kompartiment

In diesem Pathway nehmen insgesamt 35 Faktoren in der Bahnungsanalyse teil und werden wie folgt unterteilt:

1. Die Hauptinteraktionspartner bilden in diesem Kompartiment die subepithelialen Faktoren, die hellrosa dargestellt sind. Hierzu gehören die 6 Faktoren CXCL12, SEMA3A, EPHA5, ODZ3, CRABP1 und ALDH1A2.

2. Die Interaktionspartner der subepithelialen Faktoren bilden die epithelialen Faktoren. Hierzu gehören 7 (9) Faktoren CLU, LRP5, GJA1, TSPO, AXIN1, GSK3B und APC, wobei die beiden Faktoren DVL1L1 (DSH) und AXIN2 vom IPA-System unter einer anderen ID-Nummer identifiziert wurden und daher nicht rot, sondern blau dargestellt werden.

3. Die sechs grün dargestellten Faktoren HRAS, RHOA, SRF, CEBPB, MYC und FOS gehören zu den neuen Faktorkandidaten, die sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway in Network 2 vorkommen.

4. Die weiß dargestellten Faktoren bilden die Faktorkandidaten, die im subepithelialen Pathway vertreten sind. Hierzu gehören die 14 Faktoren GAS1, PLOD1, DIAPH1, ARHGEF4, KIFAP3, DBNI (DBI), CSNK1D, PRKG2, EIF2B, FRAT1, PPP2A5A, PHF5A, SENP2 und APCDD1. Anhand der Analyse lassen sich in diesem Pathway folglich 20 Score-Gene identifizieren.

Folgende Faktoren im subepithelialen Pathway weisen eine relevante Interaktion auf:

A) Faktoren der ECM (extrazellulären Matrix): Von den Focus-Genen zeigt nur der subepitheliale Faktor CXCL12 und der epitheliale Faktor CLU eine relevante Interaktion.

B) Faktoren in der Zellmembran (Oberflächenproteine): Von den Focus-Faktoren weist nur das epitheliale Oberflächenprotein GJA1 eine starke Interaktion auf. Von den Score-Faktoren zeigt der subepitheliale Faktor GAS1 eine relevante Interaktion. Dieser Faktor ist nur in diesem Pathway vertreten. Von den Score-Faktoren, die in beiden Pathways des Networks 2 vertreten sind, besitzt der Faktor HRAS eine starke Interaktion in der Zellmembran.

C) Score-Faktoren, die in beiden Pathways in Network 2 eine relevante Interaktion besitzen: Neben HRAS gehören das zytoplasmatische Protein RHOA und die vier Transkriptionsfaktoren MYC, SRF, FOS und CEBPB zu den relevanten Faktoren.

Von 13 (15) Focus-Faktoren (6 epitheliale und 7 (9) subepitheliale) zeigen nur 3 Faktoren (2 epitheliale und 1 subepitheliale) eine auffällige Interaktion. Von den neu identifizierten 14 subepithelialen Faktorkandidaten weist nur der Faktor GAS1 ein mittelstarkes Interaktionsmuster auf. Alle Faktorkandidaten, die sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Pathway

vertreten sind, besitzen eine starke Interaktion, wobei nur 2 Faktoren in der Zellmembran bzw. in seiner Nähe lokalisiert sind. Diese Faktoren werden in der unten dargestellten Tabelle unterteilt:

Faktoren mit einem mittelstarken bis starken Interaktionsmuster in Network 2/Pathway B			
Focus-Gene (insgesamt 13 Faktoren)		Score-Gene (insgesamt 22 Faktoren)	
Epithel	Subepithel	Subepithel	Epithel+Subepithel
2 von 6 Faktoren	1 von 7 (9) Faktoren	1 von 14 Faktoren	6 von 6 Faktoren
CLU, GJA1	CXCL12	GAS1	RHOA, HRAS, MYC SRF, FOS, CEBPB

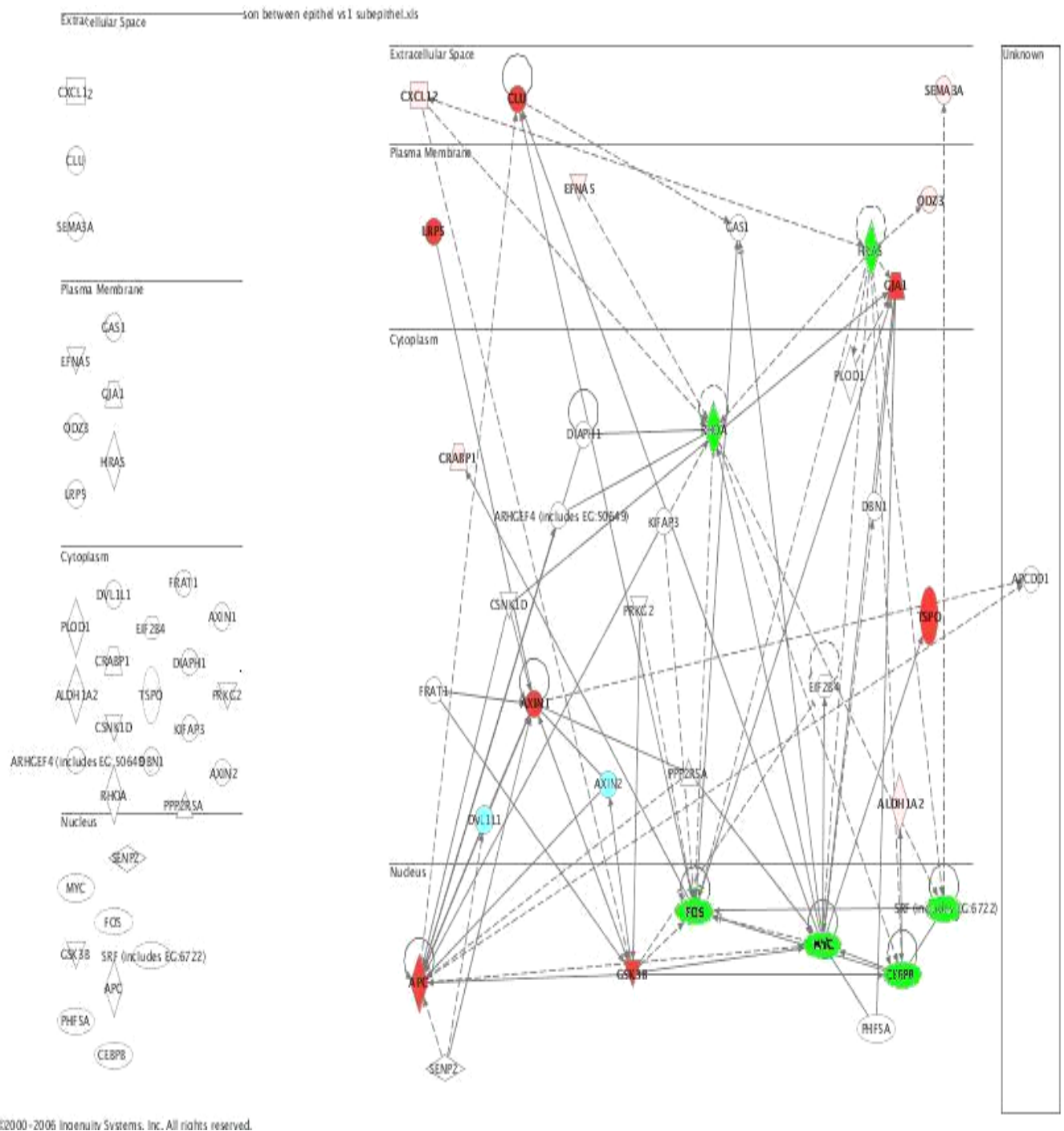


Abb. 13B: Molekulare Interaktionen des subepithelialen Pathways B/Network 2. In diesem Bahnungssystem stehen alle am Pathway teilnehmenden Faktoren, die je nach Lokalisation in extrazelluläres Kompartiment, Plasmamembran, Zytoplasma und Zellkern eingeteilt sind

4. Diskussion

Diese Arbeit hatte die Identifizierung von Faktoren zum Ziel, die in der Entwicklung und Regeneration des intestinalen Epithels eine wesentliche Rolle spielen. Anhand der Pathway-Analysen wurden verschiedene Faktoren als mögliche Kandidaten identifiziert. Einige dieser Faktoren, die im Rahmen dieser Bahnungsanalysen aufgrund ihrer molekularen Interaktionsmuster hervortraten, sollen im weiteren näher beschrieben und deren Relevanz eingeschätzt werden.

4.1.1 Epitheliale Faktoren mit „relevanten“ Interaktionsmustern in Network 1 und 2

A) Focus-Faktoren

Für die Analyse im IPA-System wurden ursprünglich 118 Faktoren benutzt, wobei vom System 35 Faktoren (18 epitheliale und 17 subepitheliale) als relevant identifiziert wurden. Aus diesen 35 Focus-Faktoren sind dann vom IPA zwei voneinander unabhängige Networks mit je einem epithelialen und einem subepithelialen Pathway aufgebaut worden. In beiden Networks weisen von insgesamt 18 epithelialen Focus-Faktoren lediglich 6 Faktoren eine relevante Interaktion. Zu diesen gehören GJA1, CLU, KCJN8, NOG, SHH und BMPR1A.

GJA1 (Gap junction protein, alpha 1) ist ein Bestandteil von Gap-Junctions und gehört zu der Gruppe der Connexine. Welchen Einfluss es auf die intestinalen Stammzellen ausübt, ist weitgehend unbekannt. Jedoch ist zu betonen, dass GJA1 als ein Baustein des Zytoskeletts und als Ionenkanal molekulare Signale benachbarter Zellen vermittelt und damit der interzellulären Kommunikation dient (7). Da der epitheliale Faktor einerseits eine mittelstarke bis starke Expression in der Mukosa aufweist und andererseits als Ionenkanal extrazelluläre Signale in die Zelle vermittelt und damit zahlreiche Signalkaskaden induziert, ist anzunehmen, dass dieser auch auf die Kaskaden einen Einfluss ausübt, die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von intestinalen Stammzellen von Bedeutung sind.

Lokalisation im Pathway: In Network 2 ist der Faktor in beiden Pathways in der Zellmembran lokalisiert.

Interaktionsmuster: In beiden Pathways weist der Faktor direkte und indirekte Interaktionen mit dem zytoplasmatischen Faktor RHOA sowie mit den Transkriptionsfaktoren MYC und FOS auf.

ISH (In situ-Hybridisierung): GJA1 zeigt eine mittelstarke bis starke Expression (Expressionsstärke 3). Die Expression ist regional auf den Teilbereich der Mukosa begrenzt.

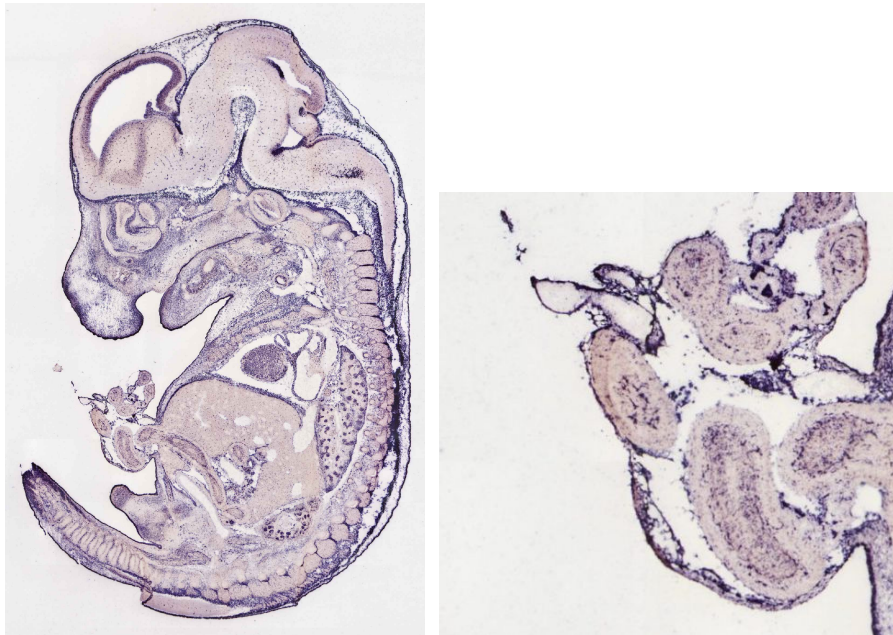


Abb. 14: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Gja1-Gen hybridisiert wurde und eine mittelstarke bis starke, regionale Expression von Gja-1 in der Darmmukosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set IDHD12 GeneGja1 gap junction membrane channel protein alpha 1 StageE14.5).

CLU (Clusterin syn.: TRPM-2 = testosteron-repressed prostate message 2) ist ein zytoprotektives Akutphase-Protein und wird in verschiedenen Gewebetypen des Organismus (z. B. Uterus) als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli synthetisiert (unter anderem durch Östrogeneinflüsse und Stress). Die genauen vielfältigen Aufgaben, die Clusterin im Organismus erfüllt, sind bis heute noch nicht abschließend geklärt. Bekannt sind Einflüsse von Clusterin u.a. auf den Fetttransport, die Einleitung der Apoptose, die Spermienreifung, die Hormonsekretion, den Membranschutz und die Förderung von Zellinteraktionen (53).

Lokalisation im Pathway: Clusterin ist in beiden Pathways des Networks 2 in der extrazellulären Region lokalisiert und ist ein Faktor der extrazellulären Komponente.

Interaktionsmuster im Pathway: In beiden Pathways zeigt der Faktor eine direkte Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren MYC und FOS sowie eine indirekte Interaktion mit dem APC-Komplex.

ISH: Clusterin weist eine mittelstarke bis starke und regionale Expression in der Darmmukosa auf. Welchen Einfluss der epitheliale Faktor auf die intestinalen Stammzellen in der Mukosa ausübt, ist noch nicht bekannt. Da der epitheliale Faktor einerseits eine mittelstarke bis starke Expression aufweist und andererseits mit wichtigen Transkriptionsfaktoren direkte und indirekte Interaktionen eingeht, bietet es sich als Ansatz für weitere experimentelle Arbeiten an, die Wirkung von Clusterin auf die intestinalen Stammzellen *in vitro* zu untersuchen.

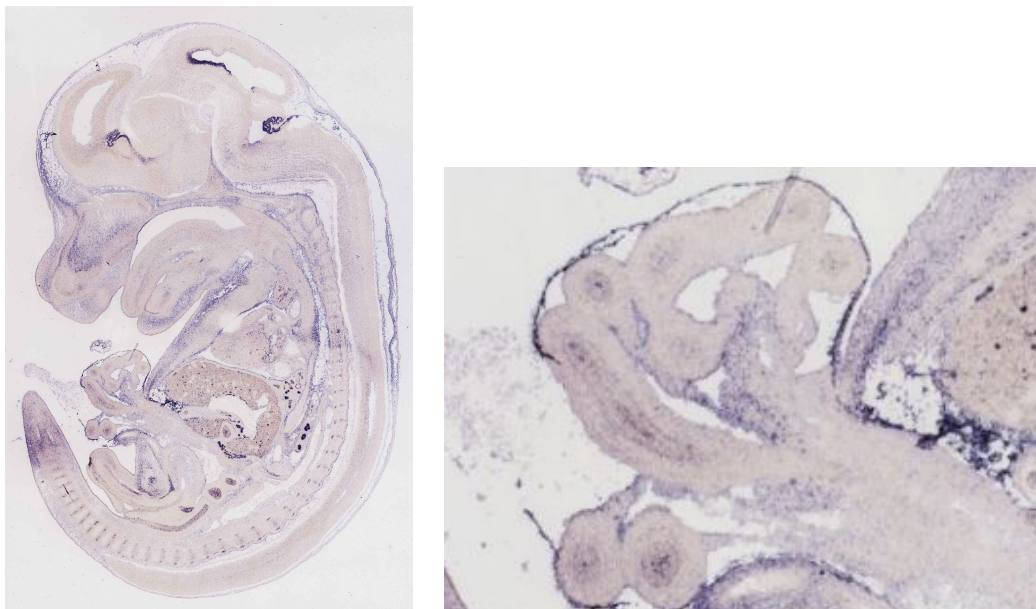


Abb. 15: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Clusterin cDNA hybridisiert wurde und eine mittelstarke bis starke, regionale Expression von Clusterin in der Darmmukosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set ID:MH787 Gene:Clu: clusterin Stage:E14.5).

KCNJ8 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8) ist das humane Gen für Kir6.1. Hierbei handelt es sich um einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir(inward rectifying)), die in den meisten Zellen des Organismus vorkommen. Dieser G-Protein-gekoppelte Kanaltyp spielt eine wichtige Rolle in der Erregbarkeit von Zellen und in der Stabilisierung des Ruhepotentials (58).

Lokalisation im Pathway: In beiden Pathways des Networks 1 ist dieser Faktor in der Zellmembran lokalisiert.

Interaktionsmuster im Pathway: Im epithelialen Pathway besitzt der Faktor keine Interaktion und in dem subepithelialen Pathway zeigt es eine indirekte Interaktion mit Insulin1 und eine direkte Verbindung mit dem Enzym der Zitratzyklus (LDHB).

ISH: Der epitheliale Focus-Faktor zeigt eine starke, regionale Expression in der Mukosa und Serosa.

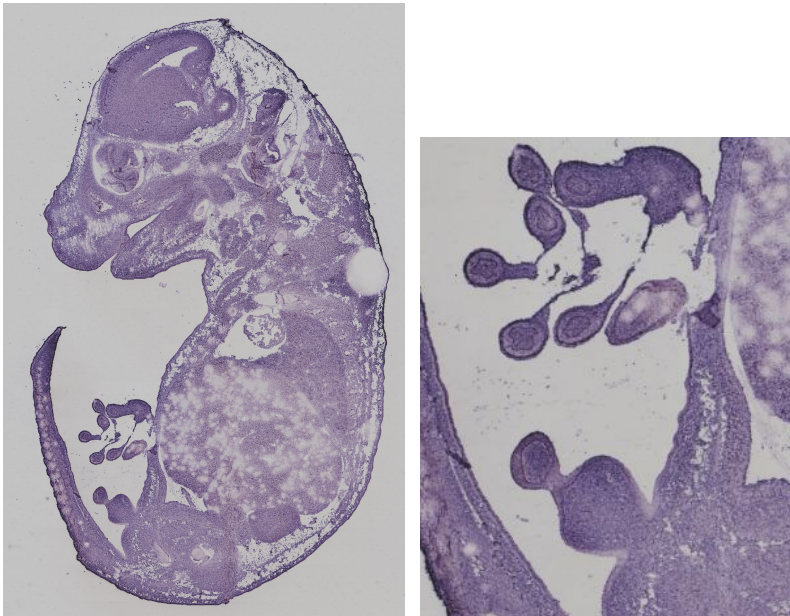


Abb. 16: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Kcnj8 cDNA hybridisiert wurde und eine starke, regionale Expression von Kcnj8 in der Darmmukosa und Serosa aufweist (entnommen aus: GenePaint Set ID:ES600 Gene:Kcnj8: potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8 (Kcnj8) Stage:E14.5).

NOG (Noggin) ist ein Gegenspieler (Antagonist) von BMP4 und besitzt eine zentrale Funktion in der Regulierung von der TGF/BMP-Signalkaskade. Die TGF/BMP-Kaskade ist an zahlreichen Entwicklungsprozessen beteiligt (24, 25, 26).

Lokalisation im Pathway: In beiden Pathways des Networks 1 ist dieser Faktor im extrazellulären Kompartiment lokalisiert und zeigt hier ein starkes Interaktionsmuster mit anderen Faktoren der extrazellulären Matrix.

ISH: Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Ende Jan. 2007) ist kein Expressionsbild von Noggin in Genepaint.org vorhanden. Da die Wirkung von Noggin in der BMP-TGF β -Kaskade bekannt ist, bietet es sich an, eine ISH von Noggin durchzuführen.

SHH (sonic hedgehog homolog) ist das zentrale Molekül der hedgehog-Signalkaskade, das bei der Stammzellproliferation eine außerordentlich wichtige Rolle spielt (38, 39). Auf die Charakterisierung von SHH wird bei der Beschreibung der Signalkaskaden eingegangen.

Lokalisation im Pathway: Der Faktor ist in beiden Pathways von Network 1 in der ECM lokalisiert und zeigt hier zahlreiche Interaktionen mit Faktoren der TGF/BMP- und der FGF-Familie.

ISH: Das Gen zeigt eine starke Expression in der Darmmukosa

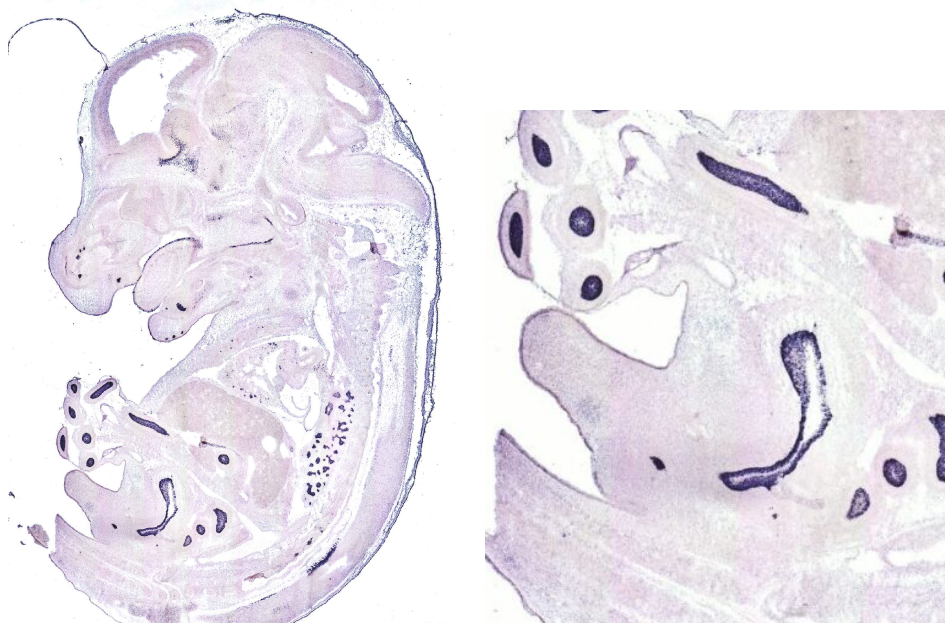


Abb. 17: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Shh-Gen hybridisiert wurde und eine starke, regionale Expression in der Darmmukosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set IDMH459 GeneShh sonic hedgehog StageE14.5).

BMPR1A (Bone morphogenetic protein receptor, type 1A). Die Liganden dieser Rezeptoren gehören zur TGF-Familie und spielen bei der Stammzellproliferation eine wichtige Rolle (24).

Lokalisation im Pathway: In beiden Pathways von Network 1 ist dieser Faktor in der Zellmembran lokalisiert und geht molekulare Interaktionen mit Faktoren der TGF/BMP-Kaskade (BMP4 und SMAD19) und mit dem GDF5 ein.

ISH: BMPR1A zeigt eine schwache bis mittelstarke Expression in der Darmmukosa und eine starke Expression in der Serosa.

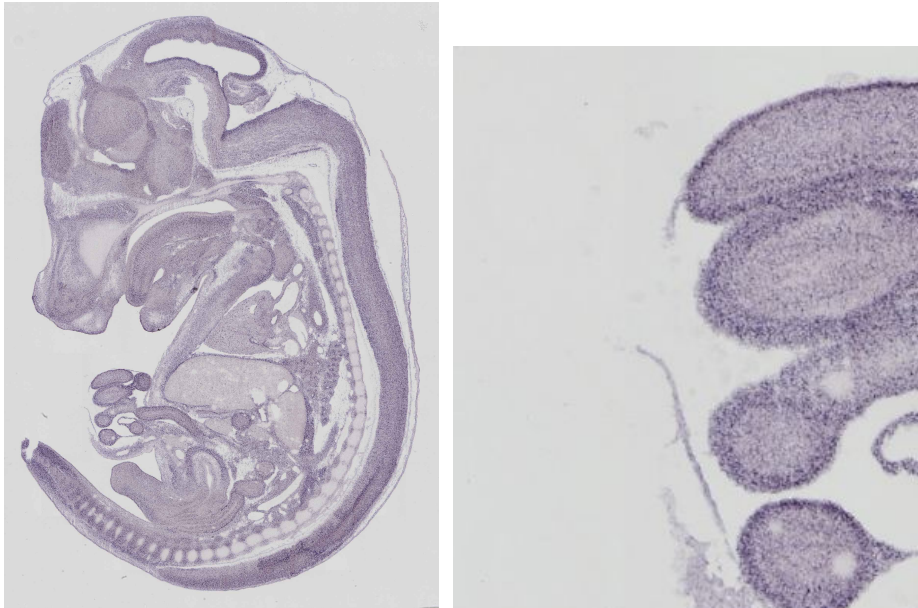


Abb. 18: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem *Bmpr1a*-Gen hybridisiert wurde und eine schwache bis mittelstarke Expression in der Mukosa sowie eine starke Expression in der Serosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set ID:MH1765 Gene:*Bmpr1a*: bone morphogenetic protein receptor, type 1A Stage: E14.5).

B) Score-Faktoren

Aus der Bahnungsanalyse der beiden Networks wurden insgesamt 27 epitheliale Score-Faktoren als neue Faktorkandidaten identifiziert. Jedoch zeigen nur 7 Faktoren eine dichte Interaktion.

Hierzu gehören *EPHA4*, *GREM1*, *HTRA1*, *ITGAL*, *ITGAX*, *ASIP1* und *MMP11*.

EPHA4 (Ephrine) gehören zu den Liganden der EPHA-Rezeptoren. Dabei gibt es zwei Gruppen von Rezeptoren, nämlich die EPHA- und die EPHB-Rezeptoren. Bisher wurden insgesamt 14 Mitglieder (8 EPHA- und 6 EPHB-Rezeptoren) identifiziert. Durch die Bindung der Ephrine an die zytoplasmatischen Proteine kommt es zur Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionswege, die für die Regulation von Zelladhäsion und Organisation des Aktinzytoskeletts verantwortlich sind. EPH-Rezeptoren können auch Regulatoren des MAPK-Signaltransduktionsweges einschalten. Ferner sind die Ephrine beider Gruppen (Ephrin A und Ephrin B) bei zahlreichen Entwicklungsprozessen (z.B. Entwicklung der ZNS und Angiogenese) beteiligt (54). Die Wirkung der Ephrine auf die epithelialen intestinalen Stammzellen ist noch nicht vollständig geklärt.

Lokalisation im Pathway: Die Ephrine sind in der Zellmembran des epithelialen Pathways (Network 2) lokalisiert und zeigen Interaktionen untereinander sowie eine indirekte Interaktion mit RHOA.

ISH: EPHA4 zeigt eine mittelstarke und regionale Expression in der Darmmukosa. Da die Ephrine eine regulative Wirkung auf die Zelladhäsion und Organisation des Aktinzytoskeletts besitzen, ist es anzunehmen, dass diese einen wichtigen Einfluss auf die intestinale Stammzellnische ausüben. Zu bedenken ist unter anderem, dass die Adhäsionsmoleküle in der Stammzellnische weitgehend darüber bestimmen, welchen Teilungsprozess (symmetrischen oder asymmetrischen Teilung) die Stammzellen in der Nische einschlagen. Daher bietet es sich an, die Wirkung der Ephrine auf die Stammzellkultur im Rahmen weiterer Arbeiten zu untersuchen.

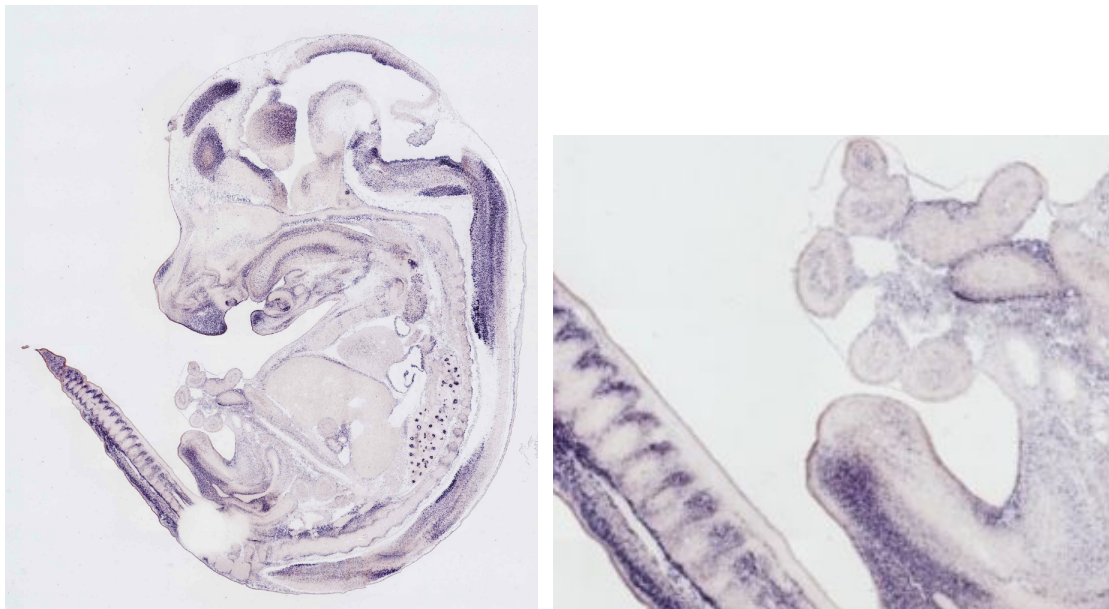


Abb. 19: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Epha4-Gen hybridisiert wurde und besitzt eine mittelstarke Expression von Epha4 in der Mukosa (entnommen aus: GenePaint Set IDMH423 GeneEpha4 Eph receptor A4 StageE14.5).

GREM1 (Gremlin) ist wie der Faktor Noggin ein BMP4-Antagonist und ein Mitglied der BMP-TGF β -Kaskade (24, 28).

Lokalisation im Pathway: Im epithelialen Pathway in Network 1 ist der Faktor in der ECM lokalisiert und interagiert mit BMP4 und FGF2.

ISH: Im Darmtrakt besitzt der Faktor eine starke Expression in der Serosa, jedoch keine Expression in der Mukosa. Daher ist es anzunehmen, dass der Faktor in der Differenzierung der intestinalen epithelialen Stammzellen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

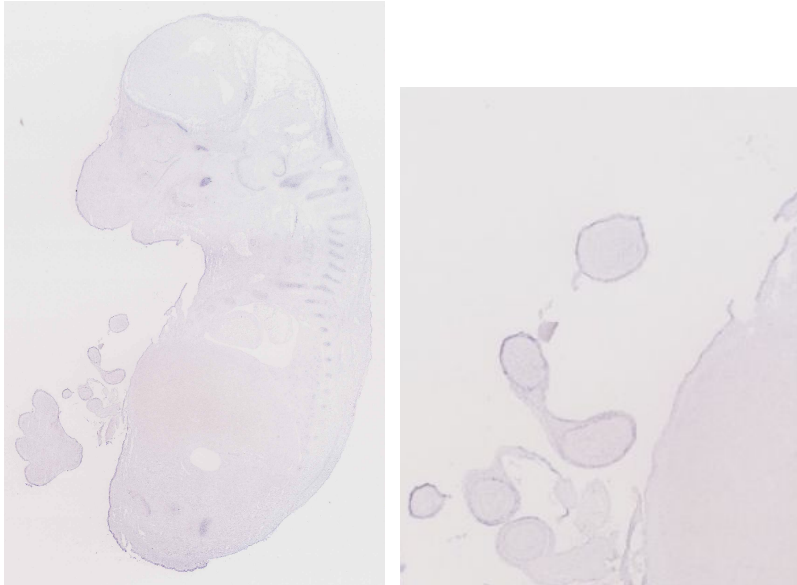


Abb. 20: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Grem1-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression von Grem1 in der Serosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set ID:EB63 Gene:Grem1: Mus musculus gremlin 1 (Grem1) Stage:E14.5).

HTRA1 Die Funktion von HTRA1 ist bislang größtenteils ungeklärt. Als sekretorisches Protein wird HTRA1 eine Rolle am Abbau extrazellulärer Matrixproteine zugeschrieben. Ferner zeigt es eine Assoziation mit den BMP/TGF β -Signaltransduktionskaskaden. Es sind drei Typen von HTRA bekannt, wobei HTRA1 und HTRA3 strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen. Beide HTRA-Formen werden unter anderem in hohem Maße in der Plazenta exprimiert und zeichnen sich durch den Besitz einer IGF-bindenden (Insulin-like growth factor) Domäne aus. Nachweislich sind die IGF-Faktoren in der Lage, sowohl das fetale als auch das plazentäre Wachstum zu beeinflussen (50, 51).

Lokalisation im Pathway (Network 1): HTRA1 ist in der ECM lokalisiert und zeigt hier eine molekulare Interaktion mit den beiden Faktoren TGF β 2 und BMP4.

ISH: HTRA1 zeigt eine starke Expression in der Darmserosa, aber keine Expression in der Mukosa. Daher ist die begünstigende Wirkung des Faktors auf die Stammzellnische als fraglich einzuschätzen.

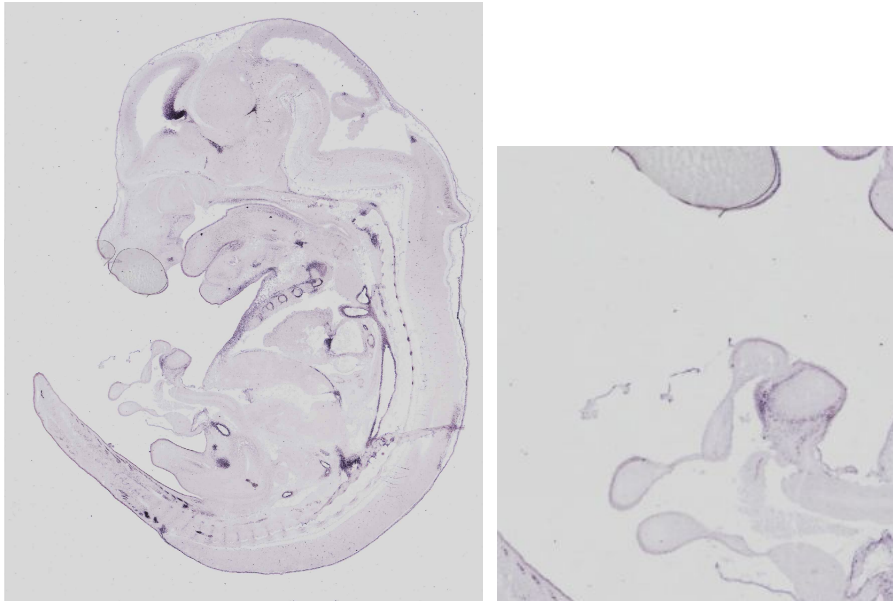


Abb. 21: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Htra1-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression von Htra1 in der Serosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set ID: ES909 Gene:Prss11: HtrA serine peptidase 1 Stage:E14.5).

ITGAL/ITGAX (integrin, alpha L (antigen CD11A)/ integrin, alpha X (antigen CD11C)) werden bevorzugt von Zellen des Immunsystems exprimiert und beeinflussen zahlreiche Prozesse im Organismus. Ferner besitzen diese Proteine einen regulativen Einfluss auf die Bildung von hämatopoetischen Stammzellen (56). Trotz der starken Interaktionsmuster im Pathway, ist die Wirkung der Integrine auf die intestinalen Stammzellen weitgehend noch unbekannt. Da diesbezüglich auch keine Expressionsinformationen vorhanden sind, bietet es sich als Ansatz für weitere experimentelle Arbeiten an, die Expression dieser Faktoren im Darmmukosa zu untersuchen.

Lokalisation im Pathway: In dem epithelialen Pathway in Network 2 sind beide Faktoren in der Zellmembran lokalisiert. Die beiden Oberflächenproteine könnten als Zellmarker für Zellauf-trennung dienen, sofern diese in der Darmmukosa eine starke und regionale Expression aufweisen.

4.1.2 Score-Faktoren, die in beiden Pathways eines Networks vertreten sind

Aus den Pathway-Analysen traten 12 neue Kandidaten hervor, die sowohl im epithelialen als auch im subepithelialen Kompartiment vorkommen. Dabei besitzen alle Faktoren dieser Gruppe eine relevante Interaktion. Hierzu gehören INS1, IL1B, FGFR2, OGDH, PDHB, MAPK1, RHOA, HRAS, MYC, SRF, CREB und FOS.

ILB1 (Interleukin-beta1) wird vor allem von Makrophagen und TH1-Zellen produziert, aber auch die Keratinozyten, Astrozyten und Endothelzellen sind in der Lage ILB1 zu bilden. Es ist einer der wichtigsten proinflammatorische Zytokine und induziert die Produktion von IFN und Prostaglandinen in Makrophagen. Die Anzahl der durch IL-1 direkt oder indirekt regulierten Gene ist sehr hoch und macht das IL-1 im Darmtrakt zu einem der wichtigsten neuen Faktorkandidaten (56).

INS1 (Insulin1) beeinflusst als Hormon und Wachstumsfaktor verschiedene Prozesse im Organismus und zählt wie IL1B zu den wichtigen vom IPA analysierten neuen Faktorkandidaten (50).

Lokalisation im Pathway: Beide Faktoren sind in beiden Pathways von Network 1 in der ECM lokalisiert und zeigen untereinander sowie mit Faktoren der BMP-TGF β - und der FGF-Kaskade zahlreiche molekulare Interaktionen.

Zum Zeitpunkt der Arbeit existieren von beiden Faktoren noch keine Expressionsbilder im Darmtrakt. Die Untersuchung der Expression dieser Faktoren kann als Ansatz für weitere Arbeiten dienen.

FGFR2 (Fibroblast growth factor receptor2) ist ein Mitglied der FGF-Kaskade und nimmt bei der Proliferation der intestinalen Stammzellen eine wichtige Rolle ein (49).

ISH: Das Bild zeigt eine starke Expression, die von der Serosa bis in die Submukosa reicht.

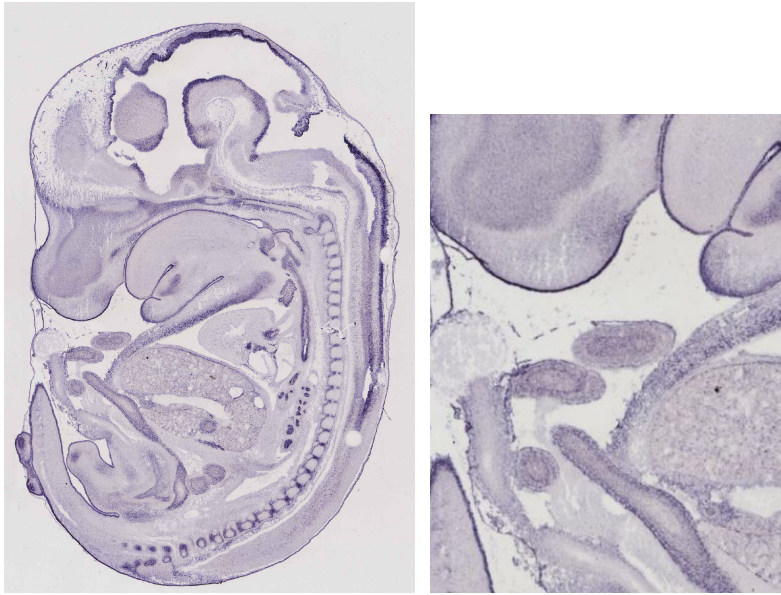


Abb. 22: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Fgfr2-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression von Fgfr2 im Darmtrakt zeigt (entnommen aus: GenePaint Set IDFG35 GeneFgfr2 fibroblast growth factor receptor 2 Stage:E14.5).

MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1) gehört wie MAPK12 zu den Kinasen, die in zahlreichen Kaskaden, Entwicklungsprozessen und Krankheiten involviert sind. Daher spielt der Faktor eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Stammzellen des Darmtraktes (30).

ISH: Der Faktor zeigt eine starke Expression in der Mukosa.

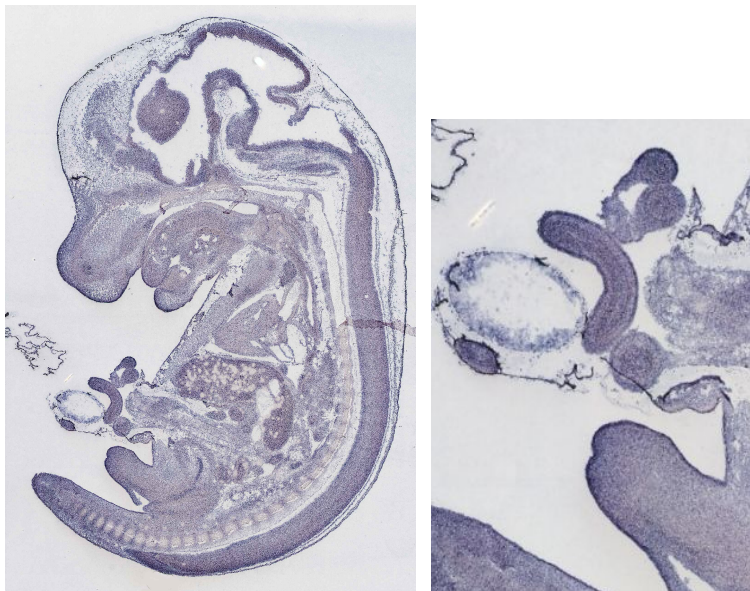


Abb. 23: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Mapk1-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression von Mapk1 in der Darmmukosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set IDMH1467 GeneMapk1 mitogen activated protein kinase 1 Stage:E14).

RHOA/HRAS, beide Faktoren gehören zu der Ras-Familie der GTP-bindenden Proteine, die nach ihrer Aktivierung zahlreiche intrazelluläre Proteinkinasen wie MAPK in Gang setzen und dadurch die Regulation vieler zellulären Prozesse beeinflussen, die das Zellwachstum steuern (52). Die Wirkung der Ras-Kinasen auf die neuronalen und hämatopoetischen Stammzellen ist seit einigen Jahren bekannt. Bei diesen Stammzellen spielen die Kinasen eine essentielle Rolle in Signaltransduktionsprozessen, die die Proliferation, Differenzierung und Regeneration kontrollieren (52, 59). Daher könnten zukünftige Untersuchungen sich auf die Frage fokussieren, wie diese Kinasen mit dem molekularen Signalnetzwerk in embryonalen und adulten intestinalen Stammzellen verknüpft sind und inwieweit sie als Aktivatoren der mitogenen Kaskade wie auch als Schaltelemente anderer Signalwege in die Regulation von Differenzierung und Regeneration eingreifen.

In Network 2 zeigen beide Faktoren ein starkes Interaktionsmuster. Daher kann angenommen werden, dass diese Faktoren der Ras-Familie für die intestinale Stammzellnische von großer Bedeutung sind.

ISH: Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren bei Genepaint.org keine Expressionsbilder von beiden Faktoren im Darmtrakt.

CREB/ATF, JUN, MYC, FOS und SRF: Die Faktoren dieser Gruppe sind in beiden Pathways von Network 2 im Zellkern lokalisiert und gehen zahlreiche molekulare Interaktionen untereinander sowie mit Faktoren der Ras-Familie und der Wnt-Kaskade ein. Diese Faktoren gehören zu den sogenannten „Immediate-early Genen“, die als Transkriptionsfaktoren eine Reihe für die Proliferation wichtiger Gene aktivieren. Dabei bilden die Mitglieder der Faktoren der Jun- (c-Jun, JunB and Jun D), der Fos- (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2) und der CREB/ATF-Familie den AP-1-Komplex (Activating Protein 1). Im Hinblick auf das Zellwachstum, Differenzierung und Tumorenstehung wird dem AP-1-Komplex eine zentrale Rolle zugeschrieben (19, 56, 57).

SRF (serum response factor) gehört zu der Faktorgruppe der Immediate-early Gene. SRF reguliert die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts und die mesodermale Differenzierung in embryonalen Stammzellen (57).

Da zum Zeitpunkt der Arbeit kein Expressionsbild von SRF im Darmtrakt existiert, bietet sich an, die Expression von SRF im Darmtrakt in einer weiteren experimentellen Arbeit zu untersuchen.

MYC, das als sogenanntes “Onkogen“ bekannte c-myc, übt einen wichtigen Einfluss auf die hämatopoetische Stammzellnische. Dieser Faktor hemmt die Bildung von Adhäsionsmolekülen, mit denen sich die Stammzellen an ihre Umgebung in der Nische heften. Ohne diese Adhäsionsmoleküle verlassen sie die Nische und gehen den Weg der Spezialisierung.

Es ist anzunehmen, dass Blutstammzellen ohne c-myc in der Nische verbleiben und sich selbst vermehren. Folglich gehört das Onkogen zu den Faktoren, die darüber entscheiden welchen Weg eine hämatopoetische Stammzelle in seiner Nische einschlägt (19). Aufgrund dieser Tatsachen ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Faktor auch in der epithelialen Stammzellnische einen ähnlichen Einfluss auf das Stammzellverhalten ausübt.

ISH: Der Faktor zeigt eine mittelstarke Expression in der Submukosa.

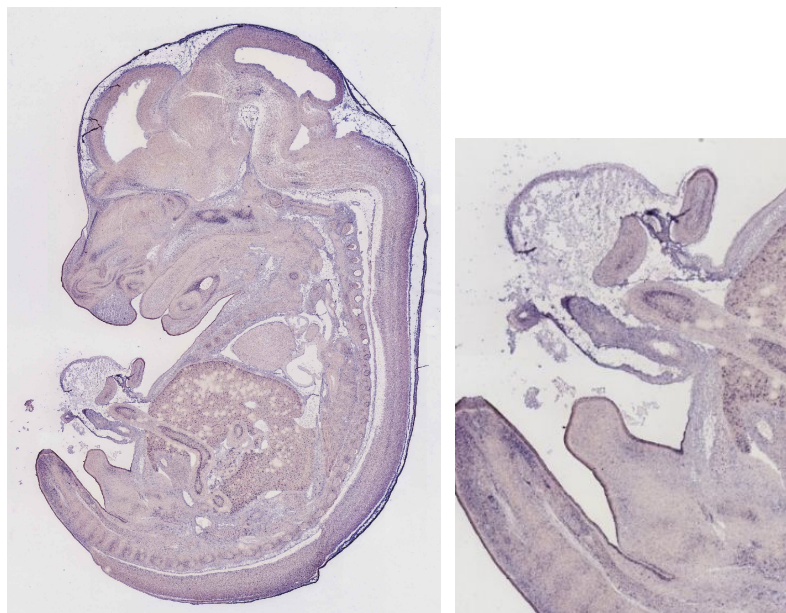


Abb. 24: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem c-Myc-Gen hybridisiert wurde und eine mittelstarke Expression im Darmtrakt zeigt (entnommen aus: GenePaint Set IDMH836 GeneMyc myelocytomatosis oncogene StageE14.5).

FOS (osteosarcoma oncogene) ist ein Transkriptionsfaktor, der einen Teil des AP-1 Komplexes (Activating Protein 1) bildet und eine wesentliche Bedeutung im Hinblick auf das Zellwachstum, die Differenzierung, die Tumorenstehung und die Entwicklung im Organismus besitzt (56).

ISH: FOS besitzt eine schwache Expression in der Mukosa und der Submukosa.

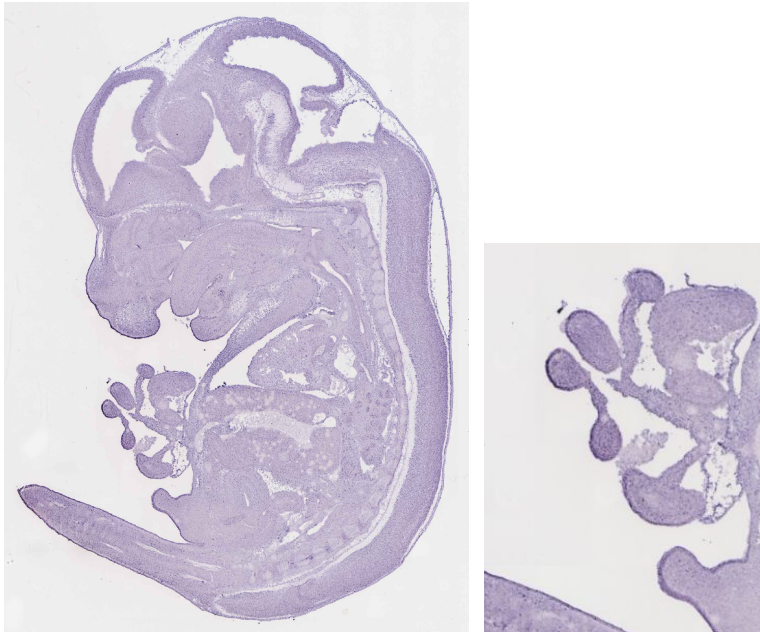


Abb. 25: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Fos-Gen hybridisiert wurde und eine schwache Expression in der Mukosa und der Submukosa aufweist (entnommen aus: GenePaint Set IDEH639 GeneFos Mus musculus FBJ osteosarcoma oncogene Stage E14.5).

CREB/ATF (cAMP responsive element binding protein) gehört zu den Transkriptionsfaktoren der Immediate-early Gene und übt wie die anderen Faktoren dieser Gruppe eine Wirkung auf die Bildung von Adhäsionsmolekülen aus. Daher ist es anzunehmen, dass auch dieser zu denjenigen Faktoren gehört, die für die Differenzierung und Proliferation von intestinalen Stammzellen in der epithelialen Stammzellnische verantwortlich sind.

ISH: CREB besitzt eine starke Expression in der Mukosa und Submukosa.

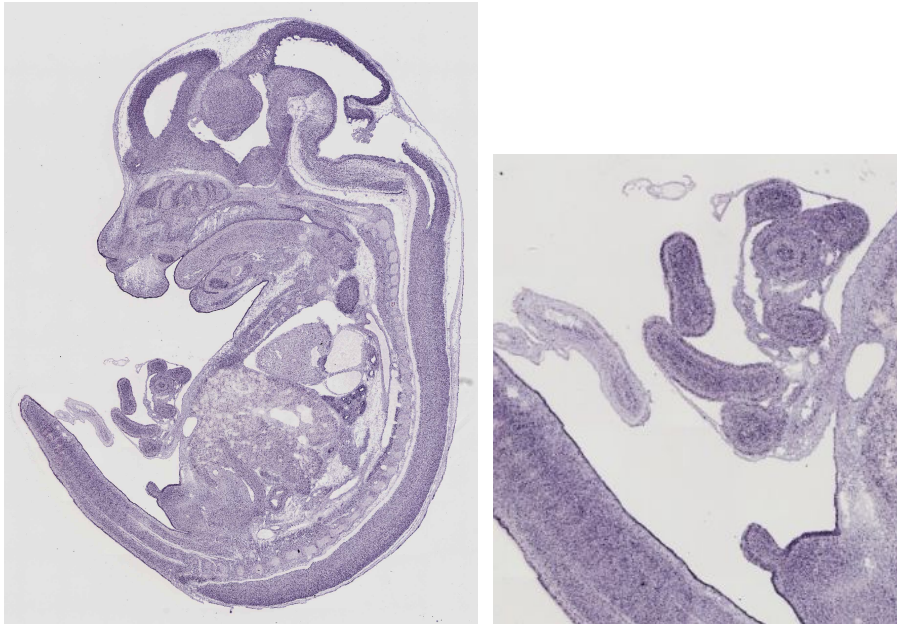


Abb. 26: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryo, der mit dem Creb-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression von Creb im Darmtrakt aufweist (entnommen aus: GenePaint Set ID:EH2730 Gene:Creb1: cAMP responsive element binding protein 1 Stage:E14.5).

4.1.3 Subepitheliale Faktoren mit „relevanten“ Interaktionsmustern

A) Focus-Faktoren

Aus den 17 subepithelialen Focus-Faktoren, die vom IPA-System als relevant erkannt und für die Bildung von Bahnungsanalysen verwendet wurden, weisen in den Pathways beider Networks nur 9 Faktoren eine mittelstarke bis starke Interaktion auf. Hierzu gehören ADCY2, BMP4, EPHA5, FGF2, FGF4, FGF5, FGF6, TGF β 2 und CXCL12.

TGF β 2 (Transforming growth factor-beta1) ist ein Wachstumsfaktor und ein Mitglied der BMP-TGF β -Kaskade. Der Faktor ist an diversen Entwicklungsprozessen beteiligt. Die BMP-TGF β -Signalkaskade spielt eine zentrale Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von intestinalen Stammzellen (27). Bei Genepaint.org sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Expressionsbilder von TGF β 1 und TGF3, jedoch nicht von TGF β 2 vorhanden. Die Untersuchung der Expression von TGF β 2 könnte damit als Ansatz weiterer Arbeiten dienen.

BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) ist ebenfalls ein Mitglied der BMP-TGF β -Kaskade. Beide Faktoren sind in beiden Pathways von Network 1 in der ECM lokalisiert und zeigen zahlreiche molekulare Interaktionen mit Faktoren der FGF-, Wnt- und Hedgehog- Kaskade.

ISH: BMP4 zeigt in der Submukosa eine starke Expression und im Pathway eine starke molekulare Interaktion, was ihren Einfluss auf die Stammzellen des Darmtraktes bestätigt.

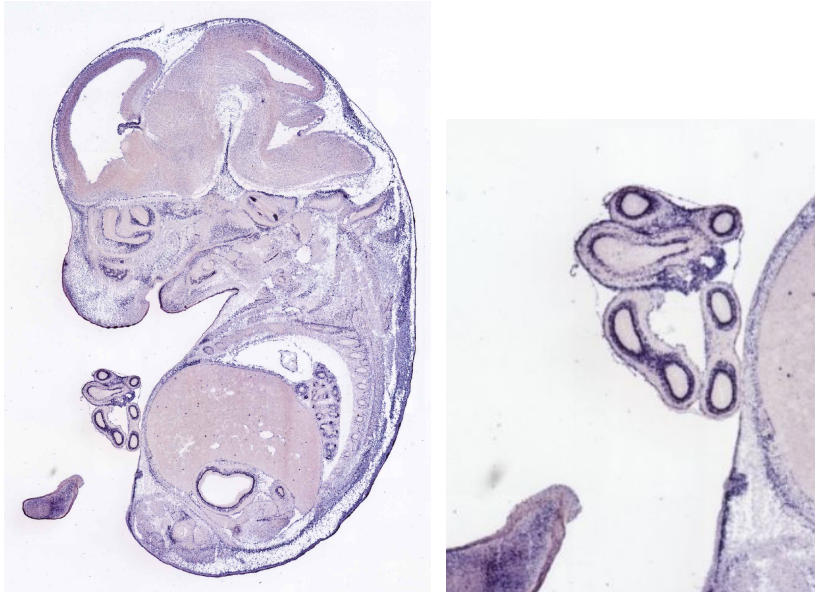


Abb. 27: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Bmp4-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression in der Submukosa zeigt (entnommen aus: GenePaint Set ID:MH365 Gene:Bmp4: bone morphogenetic protein 4 Stage:E14.5).

FGF's (fibroblast growth factor 2, 5 und 6) sind Mitglieder der FGF-Kaskade. Die Faktoren dieser Signaltransduktionskaskade sind für zahlreiche Entwicklungsprozesse verantwortlich und spielen höchstwahrscheinlich auch eine wichtige Rolle in der intestinalen Stammzellnische.

Lokalisation im Pathway: In den Pathways von Network 1 sind die Faktoren in der ECM lokalisiert und zeigen zahlreiche molekulare Interaktionen mit Faktoren wie INS1, ILB1 und mit Faktoren der Wnt- und BMP-TGF β -Kaskaden.

ISH: Alle drei Faktoren zeigen in der Submukosa eine schwache Expression.

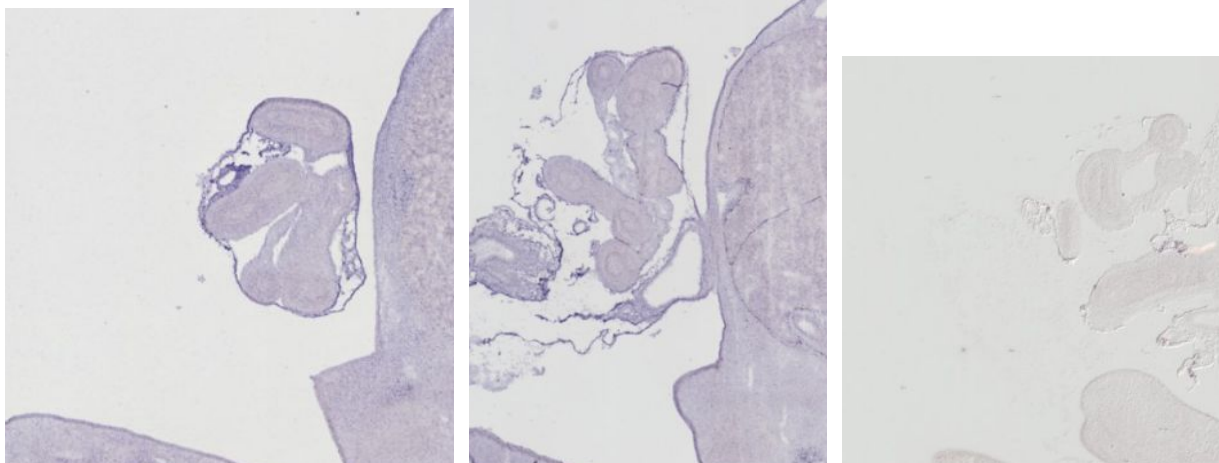


Abb. 28A: (links) Expression von Fgf2, **Abb. 28B** (Mitte) Expression von Fgf5 und **Abb. 28C** (rechts) Expression von Fgf6 in der Submukosa (entnommen aus: GenePaint Set ID:FG39 Gene:Fgf2: fibroblast growth factor 2 Stage:E14.5, GenePaint Set ID:FG26 Gene:Fgf5: fibroblast growth factor 5 Stage:E14.5 und GenePaint Set ID:FG46 Gene:Fgf6: fibroblast growth factor 6 Stage:E14.5).

CXCL12 (chemokine ligand 12) gehört zur Familie der CC-Chemokine. Dabei handelt es sich um ein Zytokin, das dazu dient, Monozyten, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten anzulocken. Zudem sind die Chemokine an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt (56). Welchen Einfluß diese Faktoren allerdings auf die epitheliale Stammzellnische im Darmtrakt ausüben, ist unbekannt.

Lokalisation im Pathway: Im epithelialen Pathway (Network 2) ist der Faktor in der ECM lokalisiert und zeigt eine starke molekulare Interaktion mit fast allen möglichen an der Pathway teilnehmenden Faktoren. Außerdem zeigt der Faktor eine starke Expression in der Submukosa des Darmtraktes. Anhand dieser Tatsachen ist es davon ausgehen, dass der Faktor für die Proliferation und Differenzierung von intestinalen Stammzellen eine wichtige Bedeutung hat. Daher ist es empfehlenswert die Wirkung des Zytokins auf die Stammzellnische zu untersuchen.

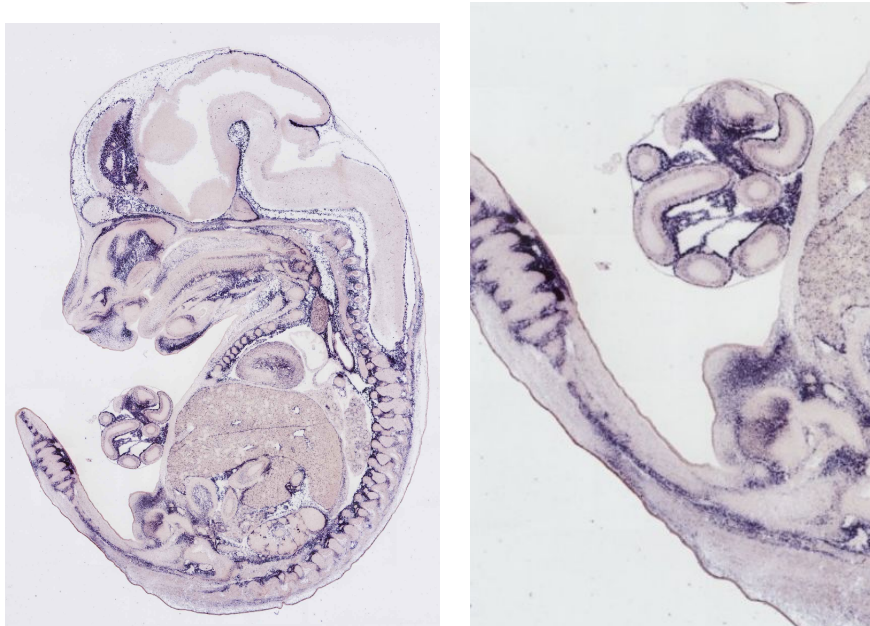


Abb. 29: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Cxcl12-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression von Cxcl12 in der Submukosa aufweist (entnommen aus: GenePaint Set ID:MH428 Gene:Cxcl12: chemokine (C-X-C motif) ligand 12 Stage:E14.5).

B) Score-Faktoren

Vom IPA-System sind insgesamt 23 subepitheliale Faktorkandidaten identifiziert worden. Von diesen besitzen nur 4 Faktoren in den Bahnungsanalysen eine relevante Interaktion. Hierzu gehören CCL9, GDF5, GPC1 und GAS1.

GPC1 (Glypican 1) gehört zur Familie der Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankerten Zelloberflächen-Proteoglykanen (PG). Der Faktor ist sowohl an der Wnt- als auch an der BMP-TGF β -Kaskade beteiligt (36).

Lokalisation: Der Faktor ist im subepithelialen Pathway (Network 1) in der Zellmembran lokalisiert und zeigt molekulare Interaktionen mit den Faktoren der FGF- und Hedgehog-Kaskaden.

ISH: Das Oberflächenprotein zeigt eine starke und regionale Expression in der Submukosa.

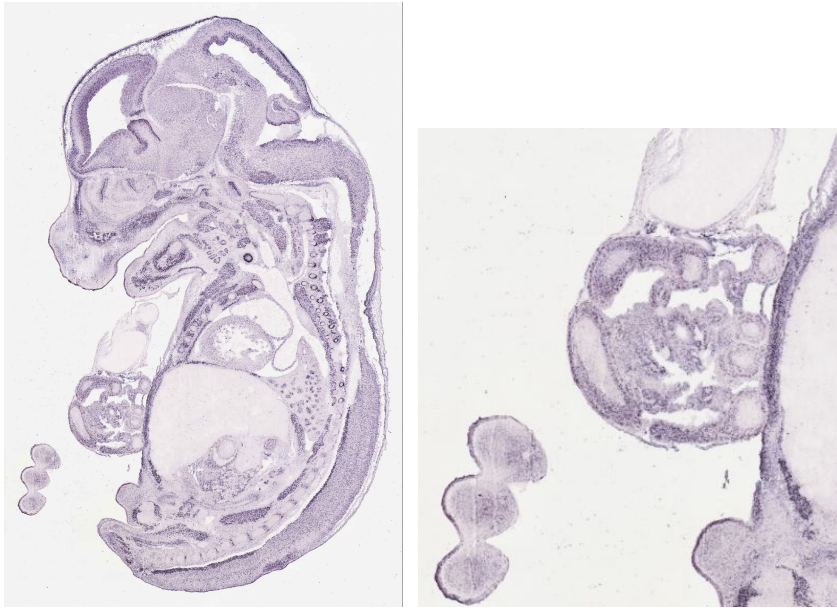


Abb. 30: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryo, der mit dem Gpc1-Gen hybridisiert wurde und eine starke Expression in der Submukosa zeigt (sentnommen aus: GenePaint Set ID:EB1607 Gene:Gpc1: Mus musculus glypican 1 (Gpc1), mRNA. Stage:E14.5).

GDF 5 (Growth and Differentiation Factor 5) ist ein Mitglied der BMP/TGF-Familie. Es bindet in der BMP/TGF-Kaskade an BMPRI1B/BMPRI1A und gehört zu den Faktoren, die fähig sind die BMP-Kaskade zu induzieren (28, 36).

Lokalisation im Pathway: Im subepithelialen Pathway (Network 1) ist dieser Wachstumsfaktor in der ECM lokalisiert und geht Interaktionen mit Faktoren der TGF/BMP-Kaskade ein.

Da für diesen Faktor zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch kein Expressionmuster in der Genepaint-Datenbank vorliegt, bietet sich an, die Expression des Faktors in dem Darmtrakt in weiteren Arbeiten zu untersuchen.

CCL9 (Chemokine ligand 9) gehört zur Familie der CC-Chemokine. Das Chemokin ist fähig Monozyten, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten chemisch anzulocken. Welchen Einfluss der Faktor auf die Stammzellnische ausübt, ist unbekannt (56).

Lokalisation im Pathway: CCL9 ist im subepithelialen Pathway (Network 1) in der ECM lokalisiert und zeigt Interaktionen mit der Hedgehog-Kaskade und mit ILB1.

ISH: Der Faktor besitzt eine schwache Expression in der Submukosa.

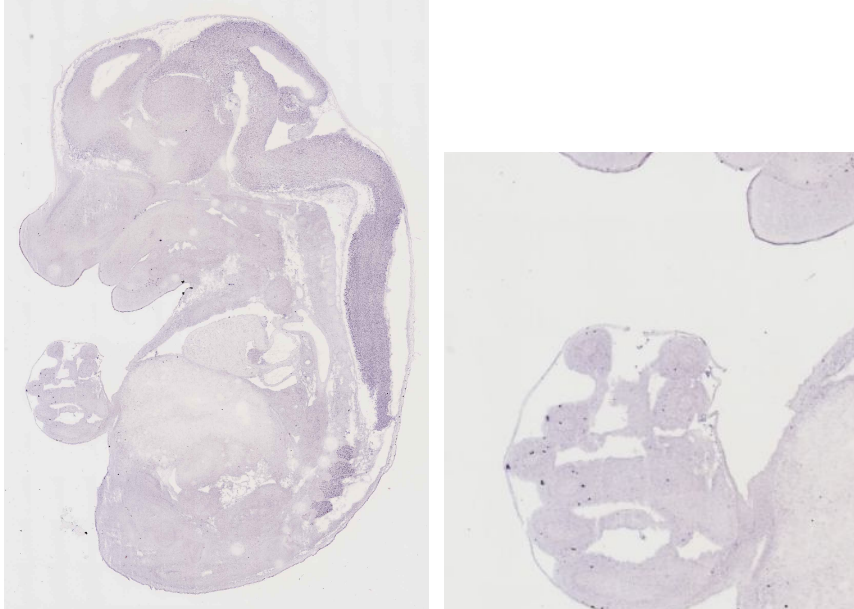
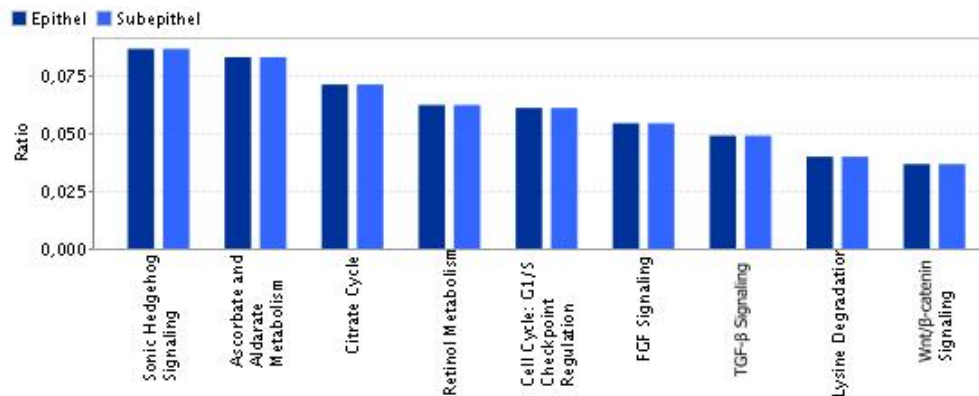


Abb. 31: Sagittalschnitt eines E14.5 Mausembryos, der mit dem Ccl9-Gen hybridisiert wurde und eine schwache Expression in der Submukosa aufweist (entnommen aus: GenePaint Set ID:EB319 Gene: Ccl9: chemokine (C-C motif) ligand 9 (Ccl9) Stage:E14.5).

4.2 Molekulare Charakterisierung der intestinalen Stammzellen

Die meisten der oben genannten Faktoren sind an der ständigen Zellerneuerung und an der Homöostase des intestinalen Epithels durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Signalkaskaden und Stoffwechselprozesse beteiligt (Abb.32). Eine zentrale Rolle im intestinalen Regenerationsprozess spielen unter anderem Signalkaskaden wie die Wnt/ β -Catenin-, TGF β -BMP-, Hedgehog-, Notch- und FGF-Kaskaden. Hinzu kommen zahlreiche Stoffwechselprozesse, wie der Zitratzyklus, die Retinsäuremetabolismus und viele andere metabolische Prozesse. Die wichtigsten Signaltransduktionskaskaden und Stoffwechselprozesse sollen kurz erläutert werden.



©2000-2006 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 32: Graphische Darstellung von Signalkaskaden und Stoffwechselprozessen, bei denen die im IPA analysierten Faktoren eine wichtige Rolle spielen.

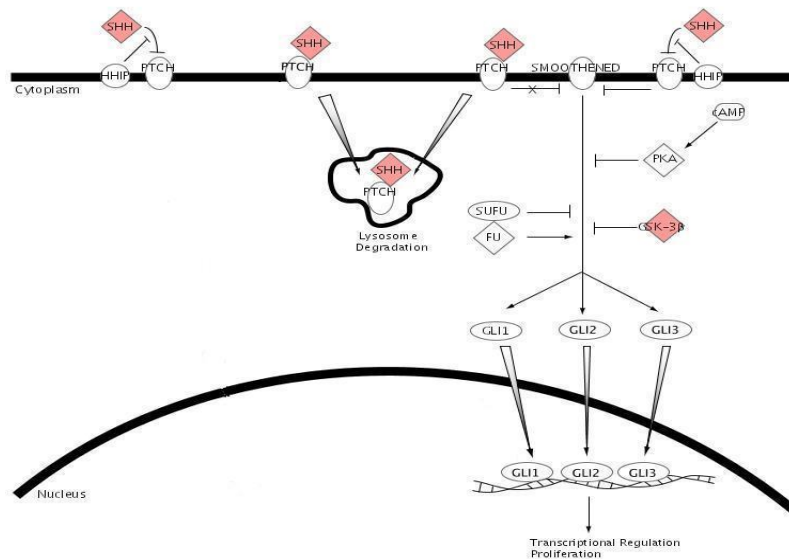
4.2.1 Hedgehog/Patched-Signalkaskade

Die Hedgehog-Signaltransduktionskaskade reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Signale dieser Kaskade sind in der frühen Embryonalentwicklung beteiligt und besitzen zudem eine Schlüsselrolle bei der Gliedmaßenentwicklung (39, 40).

Zu den Liganden der Signalkaskade gehören die drei Faktoren Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) und Desert Hedgehog (DHH). Die Signalaufnahme wird über einem Rezeptorkomplex vermittelt, der sich aus den Proteinen Patched (PTC) und Smoothened (SMO) zusammensetzt. Das exakte Zusammenwirken dieser Rezeptorkomponenten ist noch nicht bekannt. Nach Bindung eines hedgehog Liganden an den PTCH-Rezeptor verliert der Patched-Rezeptor seine inhibierende Wirkung auf Smoothened und es kommt zur Aufhebung der SMO-Blockade. Durch die Aufhebung der Blockade kommt es zur Translokation von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren der GLI-Gen-Familie. Die Produkte der GLI-Gen-Familie sind GLI1, GLI2 und GLI3, die die Signale des Sonic Hedgehog-Proteins in spezifische Genexpressionsmuster übersetzen. In Abwesenheit eines Hedgehog-Signals (Hh) wird SMO durch den Transmembranerezeptor Patched (Ptch) in seiner Wirkung gehemmt, indem es destabilisiert wird. Dieser Regulierungsprozess wird durch einen Protein-Komplex koordiniert, bestehend aus der Serin/Threonin Kinase Fu und Suppressor of Fused (Su(fu)). Der Suppressor of Fused stellt einen Antagonisten zur Kinase fu dar (37, 38).

Die Hedgehog/Patched-Signaltransduktionskaskade bestimmt sowohl während der intestinalen Entwicklung als auch im adulten Stadium das Proliferations- und Differenzierungsschicksal der intestinalen Stammzellen (38, 39). Dabei interagiert die Hedgehog-Kaskade sowohl mit der Wnt- als auch mit der BMP-Kaskade. Durch das GSK3B-Protein, ein Baustein im APC-Komplex der Wnt-Kaskade, übt die Hedgehog-Kaskade einen hemmenden Effekt auf SMO und blockt dadurch die intrazelluläre Signalweiterleitung (37). Störungen dieses Signalweges in somatischen Zellen sind nach der Geburt mit zahlreichen Tumorerkrankungen assoziiert. Hierzu gehören unter anderem Ösophagus-, Magen-, kolorektale- und Pankreaskarzinome (39, 40).

Sonic Hedgehog Signaling



Copyright Ingenuity Systems 2000 - 2005 All rights reserved.

Abb. 33: Molekulare Mechanismen der Hedgehog-Kaskade (entnommen aus: ingenuity.com).

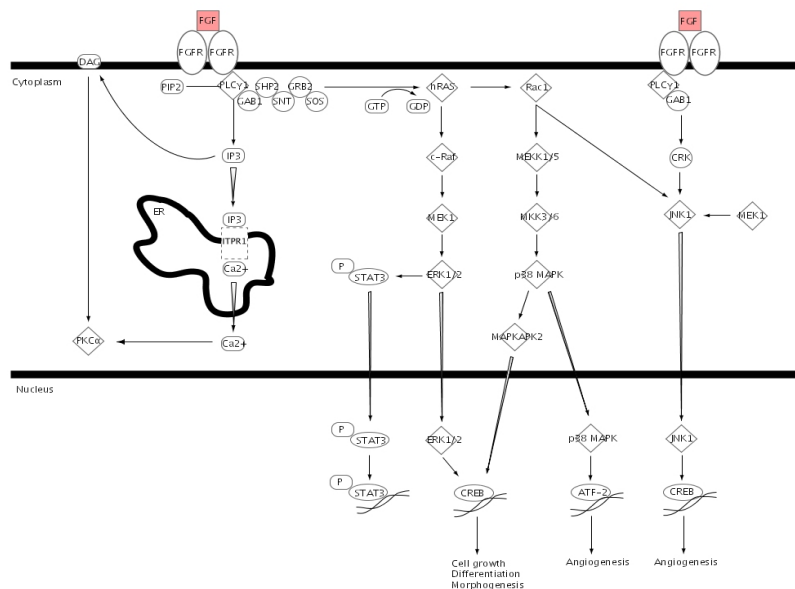
4.2.2 FGF-Signalkaskade

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren gehören zur Familie der Heparin-bindenden Polypeptide, von denen 21 Mitglieder bekannt sind. Diese werden von Zellen mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs (z.B. Endothelzellen, Makrophagen und Myozyten) synthetisiert und zeigen ein breites Verteilungsmuster sowie vielfältige Funktionen im Organismus. Hierzu gehören unter anderem die Kontrolle des Zellzyklus, die Differenzierung von mesenchymalen, epithelialen und neuroektodermalen Zellen, die Wundheilung, die Angiogenese und die intestinale Stammzellproliferation (48). Eine übermäßige Expression von FGFs ist mit der

Entwicklung von verschiedenen Krankheiten, z.B. Tumorerkrankungen, Sklerodermie und Keloidbildung verbunden (49).

Die Mitglieder der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren binden an FGF-Rezeptoren. Es existieren 4 verschiedene FGF-Rezeptoren (FGFR-1-4). Zu den Antagonisten dieser Faktoren gehört Surami, der die Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren hemmt. Nach der Ligandenbindung an die FGF-Rezeptoren kommt es über verschiedene Kinasen zu einer intrazellulären Signalaktivierung, die im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren induziert. Im Zellkern werden zwei verschiedene Arten von Genen in ihrer Expression beeinflusst, die frühen (sog. Immediate early genes) und die verzögerten Antwortgene. Die Bildung der frühen Antwortgene (z.B. myc, fos, creb, atf-2 und jun) wird innerhalb von 15 Minuten nach Wachstumsfaktorbehandlung ausgelöst. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung der verzögerten Antwortgene erst nach ca. 1 Stunde. Einige dieser Faktoren der frühen Antwortgene spielen an der Bildung von Adhäsionsmolekülen eine wichtige Rolle. Durch die Adhäsionsmoleküle können sich die Stammzellen an ihre Umgebung in der Stammzellnische haften und sich vermehren. Ohne diese Adhäsionsmoleküle verlassen sie die Stammzellnische und gehen den Weg der Spezialisierung (17, 19, 48, 49). Anhand dieser Tatsachen ist es ersichtlich, dass diese Wachstumsfaktoren für die Proliferation und Differenzierung von intestinalen Stammzellen eine wichtige Bedeutung besitzen.

FGF Signaling



Copyright Ingenuity Systems 2000 - 2005 All rights reserved.

Abb. 34: Molekulare Mechanismen der FGF-Kaskade (entnommen aus: Ingenuity.com).

4.2.3 TGF- β /BMP-Signalkaskade

Eine andere Gruppe der molekularen Signalkaskaden bildet die BMP-Signalkaskade. Die Mitglieder dieser Kaskade gehören zu der TGF- β -Familie und besitzen eine Schlüsselfunktion bei verschiedenen biologischen Prozessen. Hierzu zählen unter anderem die Ausbildung von Körperachsen und von Gliedmaßen, die Organogenese während der embryonalen Phase, die Wundheilung, die neuronale Entwicklung sowie hämatopoetische und intestinale Entwicklungsprozesse (20, 24, 25). Zudem induzieren die BMP's als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (growth and differentiation factors, GDF's) die Neubildung und Reparatur von Knochen im erwachsenen Organismus (25).

Unter den Vertretern der Signalkaskade sind vor allem BMP 2, 4 und 7 von wesentlicher Bedeutung, weil diese gemeinsam mit TGF- β die Hauptliganden bilden und über die gleichen Rezeptoren unabhängig voneinander ähnliche Signalkaskaden aktivieren. Die intrazellulär Weiterleitung der Signalkaskade erfolgt durch mothers against decapentaplegic homolog Mediatorproteine (SMAD). Dabei werden drei verschiedene Typen von SMAD's unterschieden:

1. Rezeptor-regulierte (SMAD1, 2, 3, 5 und 8),
2. allgemeine (SMAD4) und
3. inhibitorische (SMAD6 und 7)

Rezeptor-regulierte SMAD's werden durch die aktivierten Typ 1-Rezeptoren phosphoryliert (=R-Smad). Zwei phosphorylierte R-Smads assoziieren mit einem SMAD4 zu einem Komplex (=co-Smad), der dann in den Kern transloziert und zur Transkription von Zielgenen führt. Die Zielgenprodukte sind essentiell für die Proliferation, Differentiation und Determination des intestinalen Gewebes (25, 26, 28).

TGF-Signaltransduktionsweg

Nach der Ligandenbindung dimerisieren diese mit den Rezeptoren, wobei der Typ 1-Rezeptor vom Typ2-Rezeptor phosphoryliert und aktiviert wird. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt dann hauptsächlich durch SMAD2 und 3 (29, 30). Neben TGF β binden auch weitere Faktoren an die Oberflächenrezeptoren. Hierzu gehören unter anderem die Wachstumsfaktoren Inhibin und Aktivin, die in ihrer Wirkung entgegengesetzt sind und einen Einfluss über die Östrogensekretion ausüben. Dadurch können diese Faktoren auch die geschlechtsspezifische Determination beeinflussen (27, 28, 29).

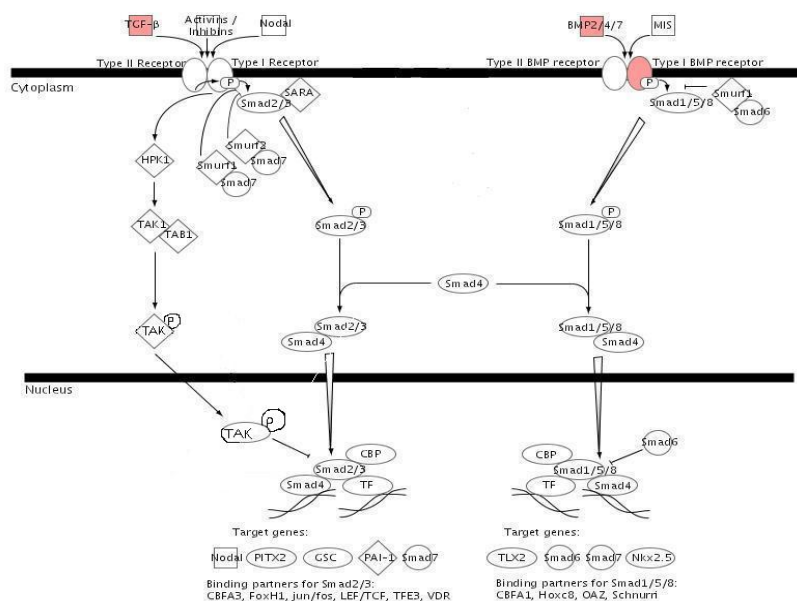
BMP-Signaltransduktionsweg

Die Abkürzung BMP steht für „knochenbildendes Protein“ (Bone Morphogenetic protein).

Durch die Bindung von BMP2/4/7-Liganden an die BMP-Rezeptoren werden die intrazellulären Signale über SMAD1, 5 und 8 weitergeleitet. Während bei der TGF β -Kaskade der Typ1-Rezeptor vom Typ2 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung des Typ1-Rezeptors in der BMP-Kaskade durch die Ligandenbindung. Ein anderer Ligand, der an die BMP-Rezeptoren (BMPR) bindet, ist der MIS (Syn. anti-Mullerian hormone (AMH)), der ebenfalls zu der TGF- β -Familie gehört und die geschlechtsspezifische Differenzierung bestimmt. Das Hormon wird von Sertoli-Zellen des fetalen Hodens gebildet und führt zur Rückbildung der Müller-Gänge und determiniert dadurch die Bildung eines männlichen Geschlechts im Organismus. Die Bindung von MIF an BMPR führt zu einer Affinitätssteigerung der Liganden zu ihren Rezeptoren (24, 25).

Zu den Antagonisten der BMP-Kaskade gehört unter anderem das Noggin (Nog), ein extrazelluläres Protein, das in den epithelialen Zellen gebildet wird. Es bindet an BMP und hemmt dessen Aktivität. (24).

TGF- β Signaling



Copyright IngenuitySystems 2000 - 2005 All rights reserved.

Abb. 35: Molekulare Mechanismen der TGF β -BMP-Kaskade (entnommen aus: Ingenuity.com).

4.2.4 Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade

Die Abkürzung Wnt steht für „wingless“, was „ohne Flügel“ bedeutet und eine bestimmte Veränderung bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bezeichnet. Die Wnt-Signalkaskade wird vor allem über APC und das zytoplasmatische Protein β -Catenin reguliert (34).

Das Zytoskelettbaustein β -Catenin verbindet über alpha-Catenin das Aktin-Zytoskelett mit dem Cadherin-Komplex und spielt zudem eine Schlüsselrolle bei der wingless Signalkaskade. Dabei liegt es entweder als stabiler Komplex an die intrazelluläre Domäne von Cadherin gebunden oder frei im Zytoplasma vor. Das freie β -Catenin ist der Effektor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Der APC-Komplex ist ein Multienzymkomplex und wird auch als sogenannter β -Catenin-Abbaukomplex bezeichnet. Der Multienzymkomplex besteht unter anderem aus Proteinen wie das Enzym Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β), Axin 2 und adenomatous polyposis coli protein (APC). An den APC-Komplex ist auch noch der Dsh-GBP-Komplex in inaktiver Form gebunden. Dishevelled (Dsh) ist ein zytoplasmatisches Protein, das zusammen mit dem GBP-Protein (Syn. FRAT1= frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas) einen Protein-Komplex bildet und in aktivierter Form die Kinaseaktivität vom APC-Komplex inhibiert (31, 32, 33, 34, 35).

Bei den wingless Rezeptoren handelt es sich um einen Rezeptordimer, wobei den einen Teil des Dimers die Familie der Frizzled (Fzz) Transmembranproteine (von denen aktuell 10 verschiedene Typen bekannt sind) während den anderen Teil die beiden Corezeptoren der LDL-Rezeptor Familie LRP5/6 (lipoprotein receptor-related protein 5/6) und KREMEN1 (kringle containing transmembrane protein 1) bilden. Bindet nun der Wnt-Ligand nicht an seine Rezeptoren, so wird β -Catenin durch die Kinasen der APC phosphoryliert, für die Ubiquitinierung markiert und anschließend durch die Proteasomen degradiert. Binden aber lösliche Wnt-Liganden (bisher sind 20 humane wingless-Gene bekannt) an Frizzled (Fz)-Rezeptoren und an Corezeptoren der LRP-Familie, so wird der Dsh-GBP-Komplex zusammen mit dem axin-Protein aus dem APC-Komplex gelöst und an die Plasmamembran rekrutiert. Das axin-Protein geht über einen bislang unbekanntem Mechanismus eine direkte molekulare Interaktion mit den LRP-Corezeptoren ein und inhibiert die APC-Kinaseaktivität (31). Das freie und nicht mehr abbaubare β -Catenin kann nun in den Kern translozieren und dort an die DNA-Bindungsproteine der TCF/LEF-Familie (T cell factor/lymphoid enhancing factor) binden und induziert die Transkription von wingless-Zielgenen. Zu den wingless-Zielgenen gehören unter anderem die Homeobox-Faktoren, c-myc, GATA1-6, EphB3, EphB2, Sox 9, Sox 17, CD44, Axin2, Cyclin D1, MMP7 und viele andere Genprodukte, die für die Proliferation und Regeneration von intestinalen Stammzellen essentiell

sind (36, 44, 45). Wie bei jeder Signalkaskade gibt es auch hier Substanzen, die eine aktivierende oder eine inhibitorische Eigenschaft besitzen. Hierzu zählen u.a. das Dickkopf-1-Protein (Dkk-1) (34, 35). Dieser übt seinen inhibitorischen Effekt dadurch aus, indem es mit dem Corezeptor KREMEN1 interagiert und die Signalübertragung der Wnt-Signalkaskade in die Zelle blockiert. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass bei Überexpression von Dkk1 eine verminderte Proliferation begleitet von einer verminderten Ki67-Konzentration in diesen Zellen zu beobachten war. Dabei diente der Proliferationsmarker Ki67 als Korrelat für die Aktivität der β -catenin-Signalkaskade (6). Ferner zeigten diese Studien, dass eine Überexpression dieses Proteins zu verminderter Kryptenbildung, verkürzter Villi, ulzerösen Veränderungen des Schleimhautes und damit zu einer Desorganisation des intestinalen Gewebes führt (31, 32, 33). Ein weiterer Inhibitor der Wnt-Kaskade ist SFRP (secreted frizzled-related-protein), das ebenfalls die Signalübertragung der Wnt-Kaskade in die Zelle blockiert, indem es mit den frizzled Transmembranrezeptoren interagiert. Zu den aktivierenden Faktoren gehören unter anderem die Forkhead- oder winged helix family Fox-Proteine (forkhead box/Fox-Proteine), die ausschließlich in gastrointestinalen mesenchymalen Zellen gebildet werden und die Bindungsaffinität von Frizzled-Rezeptoren zu Wnt-Liganden verstärken und dadurch die Wnt-Signalkaskade regulatorisch induzieren. Weitere induktive Faktoren sind die RARA (retinoic acid receptor, alpha) und SOX-Proteine. RARA ist ein multifunktionelles Rezeptorprotein, das die Transkription von β -Catenin-Zielgenen induziert und so die Zellproliferation und Determination wesentlich beeinflusst (32, 55). SOX-Protein (Syn. SRY (sex determining region Y) ist ein regulatorischer Transkriptionsfaktor, der sowohl als Zielgen der Wnt-Kaskade als auch als induktiver Faktor der Kaskade die Transkription weiterer Targetfaktoren induziert und neben der Geschlechtsdifferenzierung auch die intestinale Zellproliferation und Determination beeinflusst (31, 32, 36, 41).

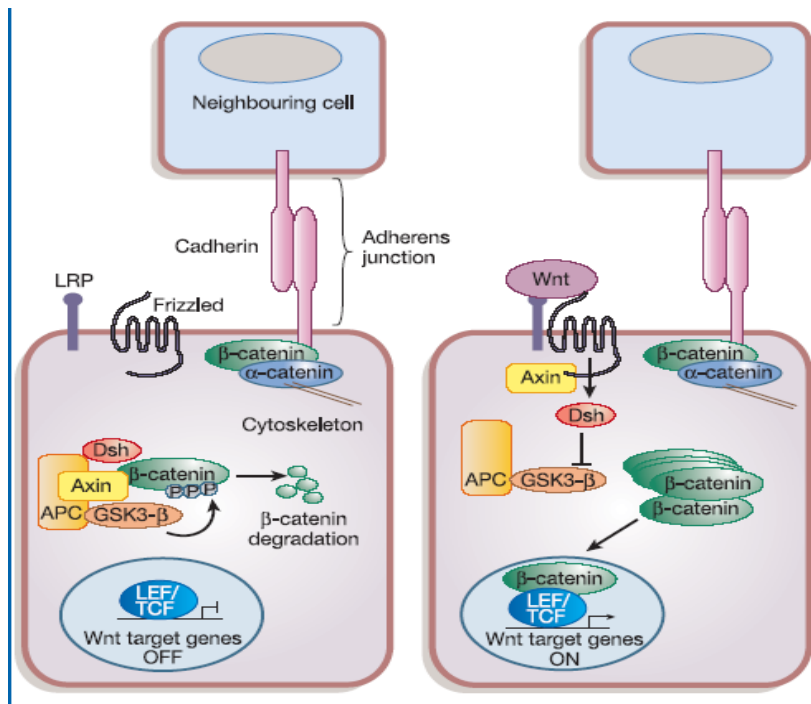


Abb. 36: Molekulare Mechanismen der Wnt/β-Catenin-Kaskade (entnommen aus: Tannshita R., Clevers H. Wnt signaling in stem cells and cancer. Nature 2004;Vol 434).

4.2.5 Notch- Signalkaskade

Die Notch-Signaltransduktionskaskade ist an vielfältigen Entwicklungsprozessen beteiligt. In den letzten Jahren wurde eine hohe Anzahl von Genen identifiziert, die direkt an der Signaltransduktion beteiligt sind. Es ist jedoch immer noch unklar, wie die begrenzte Anzahl an bisher identifizierten Genen eine solche Vielfalt an Entwicklungsprozessen steuern kann. Zu den Notch-Genen gehören unter anderem NOTCH 1, 2, 3 und 4. Die Liganden der Kaskade wird von DELTA-like1, 2 und 3 (Dll1, 2, 3) sowie von JAGGED1 und 2 gebildet. Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Translokation der intrazellulären Domäne (NICD). Im Zellkern bindet NICD an den Transkriptionsrepressor recombining binding protein suppressor of hairless (RBPSUH) und aktiviert diesen. Dadurch wird dann die Transkription von Notch-Zielgenen ausgelöst (46, 47). Zu den Zielgenen der Notch-Kaskade gehört die Familie der hairy/enhancer of split (HES). Dabei bestimmt die Notch-Kaskade, welche Zelltypen aus den intestinalen Stammzellen sich ausdifferenzieren. So zeigen zum Beispiel Tiere mit verminderter HES1 eine erhöhte Zellzahl an Becherzellen und enteroendokrinen Zellen und eine verminderte Zellzahl von Enterozyten (42, 43). Ein Zielgen des Notch-Targetgens HES1 ist der basic helix-loop-helix-Transkriptionsrepressor MATH1 (41). Dieser Faktor ist für die Proliferation von

Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth-Zellen essentiell. So differenzieren sich die intestinalen Stammzellen ohne MATH1 nur in Enterozyten aus (41).

4.2.6 Retinsäure-Metabolismus

Die Epithelzellen des Intestinaltraktes benötigen für ihr Wachstum und Differenzierung in hohem Maße Retinsäure. Dünndarmzellen sind ständig schwankenden Retinol-Konzentrationen aus der Nahrung ausgesetzt. Es ist dabei bekannt, dass mit der Nahrung aufgenommene Retinol bereits in den Zellen des Darmtraktes zum Teil für den Eigenverbrauch metabolisiert werden. Ob auch eine Oxidation von Retinol zu all-trans-RA in den humanen Dünndarmenterozyten stattfindet und welche Enzyme daran beteiligt sind, ist momentan Gegenstand weiterer Studien (55). Neben Retinsäure sind auch andere Vitamine wie Ascorbinsäure sowie der Zitratzyklus für die Proliferation von intestinalen Stammzellen wichtig.

4.3 Schlussfolgerung

Von den insgesamt 97 analysierten Faktoren besitzen in den einzelnen Pathways 38 Faktoren eine Relevanz. Der Einfluss dieser relevanten Faktoren auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten intestinaler Stammzellen kann in weiteren experimentellen Arbeiten im Labor untersucht werden.

Allerdings muss man bei der kritischen Auseinandersetzung mit der Arbeit auf folgende Punkte hinweisen. In der Genepaint-Datenbank sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Ende Jan. 2007) ca. 2000 Entwicklungsgene kartiert, von denen nur 467 Faktoren eine Expression im Darmtrakt aufweisen. Folglich steht nur ein kleiner Ausschnitt aus einem großen molekularen zellulären Interaktionssysteme hier als Ausgangsmaterial zur Verfügung. Obwohl große Übereinstimmungen zwischen den humanen und murinen Genomen existieren, können die von Mäuseembryonen gewonnene Erkenntnisse nur bedingt auf adulte humane Stammzellen übertragen werden. Daher sind diese Erkenntnisse nur ein Ausschnitt aus einer momentan nicht untersuchbaren Gesamtmenge der humanen Gene. Idealerweise müssten mit adultem humanen Darm die gleichen hier beschriebenen Analysen mit allen Genen durchgeführt werden, um alle Faktoren zu identifizieren, die für die Aufrechterhaltung des intestinalen epithelialen Stammzellkompartiments notwendig sind. Daher wäre der nächste Schritt weitere ISH's von allen identifizierten Genen durchzuführen und parallel hierzu die Durchführung eines experimentellen Teils mit Applikation der Faktoren in die Zellkultur, um das Wirkungsprofil dieser Faktoren auf die intestinalen Stammzellen zu charakterisieren.

5. Zusammenfassung

Die molekularen Mechanismen der Differenzierung und Proliferation von intestinalen epithelialen Stammzellen innerhalb der Stammzellnische sind weitgehend unbekannt. Dies ist auch ein wesentlicher Grund dafür, dass es nicht möglich ist, adulte epitheliale Stammzellen *in vitro* zu züchten. Beim Versuch, die Stammzellen in Kultur zu halten, gehen diese schnell verloren, weil sie sich spezialisieren und ihre eigene Proliferation vernachlässigen. Wüsste man, wie sich intestinale Stammzellen im Körper erneuern, welche Faktoren die Stammzellproliferation und Differenzierung beeinflussen, so könnte dies ihre gezielte Vermehrung im Labor verbessern, was der Entwicklung neuer Therapien dienen würde.

Diese Arbeit hatte die Identifizierung jener Faktoren zum Ziel, die für die Entwicklung und Regeneration des intestinalen Epithels wichtig sind. Über die verschiedenen Analyseebenen soll ein anschauliches Stammzellnischenmodell des Darmtrakts erstellt werden.

Unter dem Begriff „Faktoren“ werden hierbei molekulare Substanzen wie Enzyme, Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptorproteine etc. zusammengefasst, die an der molekularen Interaktion der Stammzellnische im Darmtrakt beteiligt sind. Mit Hilfe dieser Faktoren ist es möglich, über den extrazellulären Raum oder über die äußere Zellmembran (Rezeptoren/Oberflächenproteine) die Vermehrung von intestinalen Stammzellen in Zellkultur günstig zu beeinflussen. So wäre es denkbar, dass man durch die Applikation bestimmter Faktoren bzw. Faktorkandidaten *in vitro* verschiedene intrazellulären Kaskaden aktiviert, die für die Proliferations- und Differenzierungsmechanismen der intestinalen Stammzellnische essentiell sind. Für die Identifizierung der Faktorkandidaten wurden die beiden Netzwerksysteme Genepaint.org und IPA benutzt.

Genepaint.org ist eine öffentlich zugängliche Bilddatenbank, die die zeitliche und räumliche Verteilung von mRNA oder Proteinen wiedergibt und dadurch die Aktivität dieser Gene bzw. Genprodukte in den Zellen der verschiedensten Gewebe darstellt. Zum Zeitpunkt der Arbeit (bis Ende Jan. 2007) kommen in der Datenbank ca. 2000 Entwicklungsgene vor, von denen allerdings nur 497 Gene eine Expression in der embryonalen Darmanlage aufweisen.

Da die Stammzellnische im basalen Abschnitt der Mukosa lokalisiert ist, üben vor allem die molekularen Interaktionen zwischen den beiden benachbarten Kompartimenten (Mukosa und Submukosa) einen wesentlichen Einfluss auf das Stammzellverhalten aus (6, 9). Folglich wurden

für weitere Analysen im Ingenuity-System jene Faktoren ausgesucht, die entweder in der Mukosa oder in der Submukosa eine mittelstarke bis starke Expression zeigen. Hierfür wurden 118 Faktoren im Ingenuity-System analysiert, um molekulare Interaktionen beider Kompartimente darzustellen.

Das Ingenuity Pathway Analyse System (IPA) ist ein biologisches Netzwerksystem, das als ein analytisches Werkzeug dient und es ermöglicht komplizierte biologische Systeme zu modellieren, zu analysieren und zu verstehen. In dem Datenwerk sind Millionen von molekularen Interaktionen zwischen verschiedensten Faktoren integriert. Mit Hilfe dieses Datensystems kann man eigene biologische Einheiten und damit auch eigene Bahnungssysteme erstellen. Durch die Bahnungssysteme verschafft man sich einen Überblick über verschiedenste intermolekulare Interaktionen und gewinnt dadurch neue Erkenntnisse über mögliche gegenseitige induktive und inhibitorische molekulare Mechanismen..

Von ursprünglich 118 Faktoren sind 35 Faktoren (Focus-Gene) als relevant erkannt worden. Durch die Pathway-Analysen wurden vom IPA-System vier verschiedene Bahnungssysteme (2 epitheliale und 2 subepitheliale Pathways) erstellt. Aus diesen Bahnungssystemen sind 62 mögliche neue Faktorkandidaten (Score-Gene) identifiziert worden, welche eine molekulare Interaktion mit den bekannten 35 Faktoren eingehen.

Von diesen insgesamt 97 analysierten Faktoren weisen in den einzelnen Pathways 38 Faktoren eine relevante Interaktion auf. Diese sind wie folgt unterteilt:

Lokalisation	Focus-Gene	Score-Gene	Ges.
Epithel	CLU, GJA1, SHH, NOG, KCNJ8, BMPR1A	MMP11, ITGAL/X, EPHA4, HTRA1, GREM1, ASIP1	13
Epithel+Subepithel		RHOA, HRAS, MYC, FOS, CREB, SRF, INS1, ILB1, FGFR2, MAPK1, OGDH, PDHB	12
Subepithel	CXCL12, EPHA5, FGF2/4/5/6, BMP4, TGFB2, ADCY2	CCL9, GDF5, GPC1, GAS1	13
Gesamt	15 Focus-Gene	23 Score-Gene	38

Viele dieser Faktoren gehören zu verschiedenen Signaltransduktionskaskaden und sind zudem an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt, die für die Proliferation und Differenzierung der

intestinalen epithelialen Stammzellen wichtig sind. Jedoch sind vom IPA-System auch Faktoren identifiziert worden, bei denen die Funktion und die Wirkung auf die intestinale Stammzellnische nicht bekannt ist. Besitzen diese Faktoren nun eine starke Expression in Genepaint.org und/oder weisen diese eine auffällige Interaktion im Pathway auf, so erscheint es sinnvoll, die Wirkung dieser Faktoren innerhalb der Zellkultur zu überprüfen.

Bei den Faktoren, die zwar eine starke Interaktion in den Pathways zeigen, für die aber kein Expressionsbild im Genepaint-Datenbank hinterlegt ist, bietet sich zudem eine *in-situ-Hybridisierung* an.

Demnach empfiehlt es sich, die Untersuchung folgender Faktoren im Labor auszuführen, um zu überprüfen, ob diese die Stammzellproliferation günstig beeinflussen können.

Faktoren	<i>In vitro</i> -Untersuchung	ISH-Untersuchung
Focus-Gene	GJA1, CLU, KCNJ8, CXCL12	NOG
Score-Gene	EPHA4, ITGAL/X, MYC, INS1, ILB1, CREB, SRF, RHOA, HRAS, GPC1, CXC12, MAPK11	TGFβ2, ITGAL/X, SRF, RHOA, HRAS, INS1, ILB1, GDF5

6. Literatur

1. Gisela Badura-Lotter. Forschung an embryonalen Stammzellen. Campus Verlag 2005;90-94.
2. Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. Stem Cell Rev 2005;1:53-59.
3. Benninghof A, Drenckhahn D. Anatomie-Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban und Fischer 2003.
4. Santa BP, Van den Brink GR, Roberts DJ, et al. Development and differentiation of the intestinal epithelium. Cell Mol Life Sci 2003;60(7):1322-1332.
5. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Biol Sci 1998;353:821-830.
6. Bromley M, Rew D, Becciolini A, et al. A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA), determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa. Eur J Histochem 1995;40:89-100.
7. Mikkelsen HB, Huizinga JD, Thuneberg L, et al. Immunohisto-Chemical localization of a gap junction protein (connexin43) in the muscularis externa Of murine, canine and human intestine. Cell tissue Res 1993;274:249-256.
8. Coigrave AD, Young JA. Function of the intestine, Comprehensive human physiology from cellular mechanisms to integration. Aufl. Springer Heidelberg 1996;1259-1287.
9. Leedham SJ, Brittan M, McDonald SAC, et al. Stem Cell Review Series. J Cell Mol Med 2005;Vol 9,1:11-24.

10. Brittan M, Hunt T, Jeffrey R, et al. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *J Cell Mol Med* 2002;50:752-757.
11. Oduncu FS, Schroth U, Vossenkuhl W. Stammzellforschung und therapeutisches Klonen. Vendenhoeck und Ruprecht 2002;70-89.
12. Preston S, Wright NA, Dierekeze N, et al. Stem Cells in the Gastrointestinal Tract. *Handbook of Stem cells* 2004;Vol.2.
13. Julian RF, Walters J. Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:135-140.
14. De Santa BP, Van den Brink GR, Roberts DJ. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(7):1322-32.
15. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:695-723.
16. Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 2005;50 Suppl 1:34-38.
17. Kim JY, Siegmund KD, Tavaré S, et al. Age-related human small intestine methylation: evidence for stem cell niches. *BMC Med* 2005 Jun;23.
18. Zhang J, Li W, Sanders MA, et al. Regulation of the intestinal epithelial response to cyclic strain by extracellular matrix proteins. *FASEB J* 2003;17(8):926-8.
19. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 2004 Nov 15;18(22):2747-63.
20. Osawa M, Nakamura K, Nishi N, et al. In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol* May 1995;156(9):3207-14.

21. Yeh CL, Hsu CS, Yeh SL, et al. Dietary glutamine supplementation reduces cellular adhesion molecule expression and tissue myeloperoxidase activity in mice with gut-derived sepsis. *Epub* 2006 *Nutrition*;22 (4):408-13.
22. Visel A, Ahdidan J, Eichele G. A gene expression map of the mouse brain: Genepaint.org a database of gene expression patterns. In: *Neurosci Databases* 2003;9-36.
23. Herzig U, Cadenas C, Sieckmann F, et al. Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Found Symp* 2001; 239:129-46.
24. Jiwang Zhang, Linheng Li. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* 2005;284-289.
25. Hardwick JCH, van den Brink GR, Bleuming SA, et al. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterol* 2004;126:111-121.
26. Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. Signaltransduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004;16:291-299.
27. Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342(18):1350-8.
28. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113(6):685-700.
29. Joan M, Ye-Guang C. Controlling TGFβ-signaling. 2000 March;Vol.627-644.
30. Shibuya HK, Yamaguchi K, Shirakabe, et al. TAB1: An activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Sci* 1996;272:1179-1182.
31. Tannishta R, Clevers H. Wnt signaling in the stem cells and cancer. *Nature* 2005;Vol. 434.

32. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103(2):311-20.
33. Watt FM. Unexpected Hedgehog-Wnt interactions in epithelial differentiation. *Trends Mol Med* 2004;10(12):577-80.
34. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003;17:1709-1713.
35. Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 2005;306(2):357-63.
36. Labbe E, Lock L, Letamendia A, et al. Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67 (1):75-84.
37. Tong WG, Tawfik O, Ross J, et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 2004;36(3):277-82.
38. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nat* 2003;425:846-851.
39. Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Devel* 2000;127(12):2763-72.
40. Van Eyll JM, Pierreux CE, Lemaigre FP, et al. Shh-dependent differentiation of intestinal tissue from embryonic pancreas by activin. *AJ Cell Sci* 2004;117:2077-2086.
41. Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, et al. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Sci* 2001;294:2155-2158.
42. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, et al. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 2000;24:36-44.

43. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, et al. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1 are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 2003;535:131-135.
44. Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, et al. GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287-92.
45. Burch JB. Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16 (1):71-81.
46. Chiba S. Notch signaling in stem cell systems. *Stem cells* 2006;24 (11):2437-47.
47. Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:113–119.
48. Ahnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993;60:1-11.
49. Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992;59:15-65.
50. Park JH, McCusker RH, Vanderhoof JA, et al. 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* 1992 Sep;131(3):1359-68.
51. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nat* 2002 Jun;417(6892):945-8.

52. Du J, Jiang B, Coffey RJ, et al. Raf and RhoA cooperate to transform intestinal epithelial cells and induce growth resistance to transforming growth factor beta. *Mol Cancer Res* 2004 Apr;2(4):233-41.
53. Roseblit N, Feng Z. Analysis of the rat clusterin gene promoter and cyclic AMP-regulated mRNA stability in testicular cells. *J Mol Endocrinol* 1996;16 (3):287-296.
54. Drescher U, Kremoser C, Handwerker B, et al. In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995;82:359-70.
55. Cicely J, Peter WP, Imelda T, et al. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase. *J Biol Chem* 2004 Aug;Vol.279.
56. Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. *Imm* 2002;209-222.
57. Schrott G, Philippart U, Hockemeyer D, et al. SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *Epub* 2004 Apr;21:23-28.
58. Doupnik CA, Davidson N. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Op Neurolbiol* 1995;5:268-277.
59. Gotz R, Wiese S, Takayama S, et al. Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells. *Nat Neurosci* 2005 Sep;8(9):1169-78.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1	Differenzierung der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste in verschiedene Zelllinien	6
2	Schematische Darstellung der Topographie von Kolonkrypten	10
3	Schematische Darstellung der intestinalen Stammzellnische	12
4	Anatomisch-topographische Darstellung des Dünndarms und des Dickdarms	13
5	Histologische Darstellung der einzelnen Darmschichten	14
6	Durchführung vom Mausembryo bis zum fertigen Genexpressionsmuster im Schnittbild	18
7	Sagittalschnitt eines 14.5 Tage alten Embryos	19
8	In situ-Hybridisierung von Anxa11, BMP4, Synaptotagmin 11 und Hand1	20
9	Abbildungen zur Durchführung einer IPA-Analyse	26 bis 29
10	Graphische Darstellung der verschiedenen Entwicklungsprozesse, bei denen die analysierten Faktoren im Organismus eine Rolle spielen	31
11	Legende der Faktorenkandidaten	35
12 A	Molekulare Interaktionen des epithelialen Pathways A/Network 1	38
12 B	Molekulare Interaktionen des subepithelialen Pathways B/Network 1	41
13 A	Molekulare Interaktionen des epithelialen Pathways A/Network 2.	44
13 B	Molekulare Interaktionen des subepithelialen Pathways B/Network 2	47
14	In situ-Hybridisierung von Gja1	49
15	In situ-Hybridisierung von Clusterin	50
16	In situ-Hybridisierung von Kcnj8	51
17	In situ-Hybridisierung von Shh	52
18	In situ-Hybridisierung von Bmpr1a	53
19	In situ-Hybridisierung von Epha4	54
20	In situ-Hybridisierung von Grem1	55
21	In situ-Hybridisierung von Htra1	56
22	In situ-Hybridisierung von Fgfr2	58
23	In situ-Hybridisierung von Mapk1	58
24	In situ-Hybridisierung von c-Myc	60
25	In situ-Hybridisierung von Fos	61
26	In situ-Hybridisierung von Creb	62
27	In situ-Hybridisierung von Bmp4	63
28	In situ-Hybridisierung von Fgf 2, 5 und 6	64
29	In situ-Hybridisierung von Cxcl12	65
30	In situ-Hybridisierung von Gpc1	66
31	In situ-Hybridisierung von Ccl9	67
32	Graphische Darstellung von Signalkaskaden und Stoffwechselprozessen, bei denen die im IPA analysierten Faktoren eine wichtige Rolle spielen	68

33	Molekulare Mechanismen der Hedgehog-Kaskade	69
34	Molekulare Mechanismen der FGF-Kaskade	70
35	Molekulare Mechanismen der TGF-BMP-Kaskade	72
36	Molekulare Mechanismen der Wnt/ β -Catenin-Kaskade	75

7.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Murat Gördük, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Molekulare Charakterisierung der intestinalen epithelialen Stammzellnische“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift