

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Protease-aktivierter Rezeptor-2-vermittelte Immunpathogenese der gastro-ösophagealen Refluxerkrankung im epithelialen Zellmodell

**Untersuchung zur Initiierung der epithelialen IL-8-Sekretion
durch wiederholte Säureexposition und PAR-2-Aktivierung**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrads

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von	Lukas Winkelsett
Aus	Münster
Magdeburg	2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Winkelsett, Lukas

Protease-aktivierter Rezeptor-2-vermittelte Immunpathogenese der gastro-ösophagealen Refluxerkrankung im epithelialen Zellmodell - Untersuchung zur Initiierung der epithelialen IL-8-Sekretion durch wiederholte Säureexposition und PAR-2-Aktivierung

2017 – 87 Blätter – 17 Abbildungen – 3 Tabellen – 4 Anlagen

Kurzreferat:

Der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR-2) ist an der Pathogenese der gastro-ösophagealen Refluxerkrankung (GERD) beteiligt. Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss von Säureexposition und einer PAR-2-Aktivierung auf die Initiierung der epithelialen Immunreaktion bei GERD herauszuarbeiten. Hierzu wurde unter Verwendung der humanen ösophagealen Epithelzelllinie HEEpiC ein in-vitro-Modell eines epithelialen Monolayers etabliert. Nach wiederholter kurzzeitiger Inkubation mit schwach saurem Medium erfolgte die spezifische PAR-2-Aktivierung durch den Agonisten SLIGKV-NH₂. Die Analyse der Transkriptmengen für PAR-2 und das proinflammatorische Interleukin-8 (IL-8) wurden sowohl nach schwach saurer Inkubation als auch nach schwach saurer Inkubation gefolgt von der spezifischen PAR-2-Aktivierung mittels RT-PCR durchgeführt. Die IL-8-Proteinlevel im Zelllysat und Überstand wurden quantitativ mittels ELISA untersucht. Exemplarisch erfolgte die PAR-2-Proteinanalyse im Zellpellet mittels Western Blot.

Die Ergebnisse zeigten eine gesteigerte Genexpression für PAR-2 und IL-8 nach wiederholt schwach-saurer Inkubation. Die quantitative Proteinbestimmung für IL-8 im Zelllysat und im Überstand erbrachte keine Unterschiede. In einem unserer Schritte führte die zusätzliche PAR-2-Stimulation nach wiederholter schwach-saurer Inkubation zu einer gesteigerten IL-8-Freisetzung, während die Konzentration sich im Zellpellet nicht signifikant unterschied.

Durch die Ergebnisse der Studie kann eine Zwei-Schritt-Hypothese für die Immunpathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung formuliert werden. Zunächst führt die Exposition mit schwach-saurem Medium zu einer verstärkten Transkription von PAR-2 und IL-8 in den Epithelzellen. Die folgende Aktivierung der induzierten PAR-2-Rezeptoren führt zu einer verstärkten epithelialen IL-8-Freisetzung und initiiert somit die mukosale Immunantwort.

Schlüsselwörter: GERD, PAR-2, IL-8, epitheliale Immunantwort

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	2
Abkürzungen.....	6
1. Einleitung.....	10
1.1. Die gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD).....	10
1.1.1. Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung.....	10
1.1.2. klinische Symptomatik und Definition.....	11
1.1.3. Diagnostik und Klassifikation unterschiedlicher Entitäten der gastroösophagealen Refluxerkrankung.....	13
1.1.4. Pathophysiologie der gastroösophagealen Refluxerkrankung und Therapieansätze.....	16
1.2. Protease-aktivierter Rezeptor-2.....	22
1.3. Fragestellung.....	26
2. Material & Methoden.....	27
2.1. Studiendesign.....	27
2.2. HEEpiC – Zelllinie und Kulturmedium.....	28
2.3. Kultivierung und Konservierung.....	29
2.4. Zellversuchsaufbau.....	31
2.5. RNA-Präparation aus Zellpellet.....	33
2.6. Reverse Transkription der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese.....	36
2.7. RT-PCR-Analyse und relative Quantifizierung der Genexpression.....	37
2.8. Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.9. Proteinextraktion aus dem Überstand.....	39
2.10. Proteinextraktion aus dem Zellpellet.....	39
2.11. Quantitative Proteinbestimmung.....	40
2.12. IL-8-ELISA.....	41
2.13. PAR-2-Western Blot.....	42
2.14. Auswertung und Statistik.....	46
3. Ergebnisse.....	47
3.1. Etablierung des Zellmodells.....	47
3.2. Wiederholte Exposition der ösophagealen Epithelzellen mit schwach-saurem Medium.....	47
3.2.1. Analyse der PAR-2- und IL-8-Genexpression nach wiederholter pH-Exposition..	47
3.2.2. Expression und Freisetzung von Interleukin 8 nach pH-Stimulation.....	50
3.3. Effekte sequentieller pH- und PAR-2-Stimulation auf die ösophageale Epithelzelllinie HEEpiC.....	51

3.3.1. Biosynthese und Freisetzung von Interleukin 8 nach sequentieller pH- und PAR-2-Stimulation.....	51
3.3.2. Analyse der IL-8-Genexpression nach sequentieller pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung.....	53
3.4. Funktionelle Assoziationen.....	54
4. Diskussion.....	56
4.1. Etablierung des Zellmodells	56
4.2. Studiendesign	57
4.3. Interaktion des gastroösophagealen Refluats mit dem Epithel des Ösophagus in der Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung.....	57
4.4. Rolle des Protease-aktivierten Rezeptor 2 in der Pathophysiologie von GERD	60
4.5. Modell zweier entscheidender Schritte in der Pathogenese von GERD - einer primär immunvermittelten Erkrankung	62
4.6. Ausblick und klinische Ansätze.....	64
5. Zusammenfassung.....	66
6. Literaturverzeichnis	68
7. Anhang.....	82

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AP	synthetisches Aktivierungspeptid SLIGKV
APS	Ammoniumpersulfat
Akt	Proteinkinase B
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BZH	Basalzellhypertrophie
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DIS	dilatierte Interzellularspalten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EpiCM-2	Epithelial Cell Medium - 2

ERD	erosive Refluxerkrankung
ERK	extracellular signal-regulated Kinases
FH	funktionelles Sodbrennen
g	Gravitationskonstante
GERD	gastroösophageale Refluxerkrankung
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	hypersensitiver Ösophagus
HEEpiC	Human Esophageal Epithelial Cells
IL-8	Interleukin-8
MAPK	mitogen-activated Protein Kinase
MII-pH	kombinierte intraluminale Impedanzanalyse und pH-Monitoring
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NERD	nicht-erosive Refluxerkrankung
nm	Nanometer
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PAR-2	Protease-aktivierter Rezeptor 2
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Papillenenlongation
PI-3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPI	Protonenpumpenhemmer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse-Transkriptase- Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SAP	Symptom Association Probability
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Symptomindex
T/E	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäurelösung
TAE	Tris-hydroxymethylaminomethanacetat- Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TBST	Tris-buffered saline mit Polysorbate 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLESR	transiente Erschlaffung des unteren Ösophagussphinkters
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α

TNS	Trypsin-Neutralisations-Lösung
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1

1. Einleitung

Ziel der vorgelegten Promotionsarbeit war die Bedeutung wiederholter Stimulation mit schwach-saurem Medium mit folgender Aktivierung des Protease-Aktivierten Rezeptors 2 (PAR-2) für die Pathogenese der mukosalen Immunreaktion der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD) zu untersuchen. Die Pathogenese der GERD ist komplex und nur unvollständig verstanden. Dabei konnte die mukosale Immunreaktion nach Exposition mit schwach-saurem Medium als ein bedeutender Faktor ausgemacht werden. Trotz der enormen epidemiologischen Bedeutung der Erkrankung, ließ sich die Pathogenese von GERD bisher allerdings nicht komplett entschlüsseln.

Diese Arbeit soll zur weiteren Klärung der mukosalen Pathophysiologie der gastroösophagealen Refluxerkrankung beitragen. Im Fokus liegt dabei die ösophageale Epithelzelle für die Initiierung der mukosalen Immunreaktion. Im speziellen wurde in der Arbeit die PAR-2-vermittelte Synthese und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) nach vorausgegangener Inkubation mit schwach-saurem Medium untersucht.

Die Verwendung der primären humanen, ösophagealen Zelllinie HEEpiC (*ScienCell™ Research Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA*) ermöglichte die Etablierung eines epithelialen Zellmodells der Speiseröhre. Unter kontrollierten Bedingungen konnte so in vitro die Exposition ösophagealen Epithels naturnah nachempfunden und zeitgleich gezielte Untersuchungen durchgeführt werden.

1.1. Die gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD)

1.1.1. Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung

Die gastroösophageale Refluxerkrankung war im Jahre 2009 in den USA die häufigste Diagnose gastrointestinaler Erkrankungen, welche durch niedergelassene Gastroenterologen gestellt wurde (Peery et al. 2012). Nach der aktuellen Montreal-Klassifikation wird sie klinisch als ein Zustand definiert, der entsteht, wenn durch einen Reflux von Mageninhalt in die Speiseröhre übertritt und beschwerliche Symptome verursacht (Vakil et al. 2006).

Die Refluxkrankheit stellt ein weltweit häufiges Krankheitsbild mit unterschiedlicher Verteilung der Prävalenzen dar. Bei einer klinischen Definition und Diagnosestellung durch mindestens wöchentliches Auftreten von Sodbrennen oder saurem Aufstoßen findet sich für die USA eine gemittelte Prävalenz von 19,8% (18,1% - 27,8%). Für Europa ist die Häufigkeit gemittelt mit 15,2% (8,8% - 25,9%) etwas niedriger, wobei ein gewisses Nord-Süd-Gefälle zu bestehen scheint. Demgegenüber tritt die Erkrankung mit einer Prävalenz von gemittelten 5,2% (2,5% - 7,2%) in Asien deutlich seltener auf. Weltweit scheint es eine global steigende Prävalenz und Inzidenz der GERD zu geben (El-Serag et al. 2014).

Im Jahre 1998 stellte die gastroösophageale Refluxerkrankung mit 9,1 Millionen Arztbesuchen den häufigsten Grund für die Konsultation eines Arztes in den USA dar und verursachte mit 9,3 Milliarden \$ pro Jahr die höchsten Kosten aller gastrointestinalen Erkrankungen (Sandler et al. 2002). Die Tatsache, dass die Kosten für Protonenpumpenhemmer (Protonenpumpeninhibitoren, PPI), welche den Hauptteil der Medikation bei GERD ausmachen, im Jahre 2004 allein in den USA bei mehr als 10 Milliarden \$ lagen und unter den fünf meistverkauften Medikamenten zwei PPI zu finden waren, verdeutlicht den hohen ökonomischen Aufwand der Erkrankung (Shaheen et al. 2006). In einer großen europäischen Studie gaben 71% der Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung an, innerhalb des vergangenen Jahres einen Arzt wegen ihrer Refluxbeschwerden konsultiert zu haben (Kulig et al. 2004). Erklären lässt sich dieser subjektive Leidensdruck mit einer signifikanten Reduktion der Lebensqualität durch eine GERD (Wiklund 2004). So haben in Deutschland unbehandelte Patienten eine niedrigere Lebensqualität als die deutsche Normalbevölkerung, vergleichbar mit jener von Patienten nach akutem Koronarsyndrom (Kulig 2003). Die gastroösophageale Refluxerkrankung stellt somit eine schwerwiegende Beeinträchtigung der betroffenen Patienten und eine erhebliche Belastung für die nationalen Gesundheitssysteme dar (Koelz et al. 2003).

1.1.2. klinische Symptomatik und Definition

Als Kardinalsymptom von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung tritt Sodbrennen auf. Sodbrennen wird definiert als brennende aufsteigende Missempfindung hinter dem Brustbein. Das zweite sogenannte typische Symptom der GERD stellt das saure Aufstoßen, die Regurgitation, dar. Dabei kommt es zur

Wahrnehmung vom Rückfluss von Mageninhalt in die Speiseröhre (Vakil et al. 2006). Eine Untersuchung an Patienten mit GERD, die trotz Therapie mit einem PPI noch unter Symptomen litten, ergab, dass 85,5% der Patienten unter Sodbrennen litten. 66,2% gaben die Wahrnehmung von Regurgitationen und 53% von sowohl Sodbrennen als auch Regurgitationen an (Monaco et al. 2009). Vergleichbare Ergebnisse erbrachte eine Befragung unter Krankenschwestern, in welcher 55% der symptomatischen Frauen sowohl über Sodbrennen als auch saures Aufstoßen klagten (Jacobson et al. 2006). Sodbrennen und Regurgitation werden als klassische, beziehungsweise typische Symptome der gastroösophagealen Refluxerkrankung definiert und erlauben gemäß nationaler und internationaler Leitlinien die Diagnose GERD mit ausreichender Sicherheit zu stellen und eine säuresuppressive Therapie zu initiieren (Vakil et al. 2006).

Allerdings konnte in einer großen prospektiven Studie auch gezeigt werden, dass nur 49% der Patienten mit nachgewiesener und bekannter GERD tatsächlich unter den typischen Symptomen Sodbrennen oder Regurgitation litten (Dent 2010). Bei Patienten mit PPI-refraktären Symptomen litten lediglich 57% unter typischen Beschwerden, während 43% der Patienten atypische Symptome angaben (Mainie et al. 2006). Als PPI-refraktäre Refluxsymptomatik wird dabei nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) ein unzureichendes Ansprechen der Beschwerden trotz mindestens zwölfwöchiger Therapie mit hochdosierten Protonenpumpeninhibitoren definiert (Koop et al. 2014). Bei atypischen oder extraösophagealen Beschwerden unterscheidet man etablierte extraösophageale Syndrome von jenen, bei denen eine Assoziation noch diskutiert wird. Mit GERD assoziierte extraösophageale Manifestationen sind chronischer Husten, Laryngitis, Asthma und Zahnerosionen. Ein Zusammenhang zwischen der gastroösophagealen Refluxerkrankung und weiteren extraösophagealen Syndromen wie Pharyngitis, Sinusitis, der idiopathischen Lungenfibrose oder der chronisch-rezidivierenden Otitis media konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Koop et al. 2014; Malfertheiner et al. 2010; Vakil et al. 2006). Das Vorliegen atypischer Symptome erschwert die Diagnostik und Therapie und geht in der Folge mit erhöhten Krankheitskosten einher (Francis et al. 2013).

1.1.3. Diagnostik und Klassifikation unterschiedlicher Entitäten der gastroösophagealen Refluxerkrankung

Das Spektrum der gastroösophagealen Refluxerkrankung umfasst mehrere Manifestationsformen. Endoskopisch lässt sich eine nicht-erosive Verlaufsform (nicht-erosive Refluxerkrankung, NERD) von einer erosiven Form (erosive Refluxerkrankung, ERD) abgrenzen. Die nicht-erosive Manifestationsform ist nach der Montreal-Klassifikation der gastroösophagealen Refluxerkrankung definiert als das Auftreten beschwerlicher, refluxassoziierter Symptome bei gleichzeitig fehlendem endoskopischen Nachweis von Schleimhautdefekten am gastroösophagealen Übergang (Vakil et al. 2006). Die endoskopische Diagnostik sollte ohne säuresuppressive Therapie durchgeführt werden. Wird für die Diagnose von NERD eben jene Montreal-Klassifikation zugrunde gelegt, so stellt die nicht-erosive Verlaufsform mit 46% - 60% die häufigste Manifestation der gastroösophagealen Refluxerkrankung dar (Dent 2008; Kulig 2003; Labenz 2006).

Dabei muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei GERD nicht um eine Krankheit mit starren Entitäten handelt, sondern vielmehr ein Verlaufskontinuum mit dynamischen Übergängen besteht. So konnte in einer großen Langzeitstudie ermittelt werden, dass etwa jeder vierte Patient mit NERD nach zwei Jahren eine Progression in die erosive Verlaufsform der Los-Angeles-Kategorien A und B vollzog, während von jenen initial erosiven Stadien innerhalb des Untersuchungszeitraums von zwei Jahren über 60% eine Regression zur nicht-erosiven Manifestationsform erfuhren (Labenz 2006). Insgesamt zeigten die meisten Patienten einen stabilen oder verbesserten Schweregrad der Erkrankung, eine Progression war selten (Malfertheiner et al. 2012). Eine Regression der erosiven Untergruppen Los-Angeles C und D zu weniger schweren Formen von GERD konnte nicht dokumentiert werden (Lee et al. 2009).

Die Idee eines Krankheitskontinuums spiegelt sich auch in den klinischen Angaben der Betroffenen wieder. In unterschiedlichen Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen dem endoskopischen Bild und der Schwere der Symptome festgestellt werden (Kulig 2003; Mönkemüller et al. 2009; Yoshida et al. 2004). Somit lässt die klinisch-symptomatische Erscheinung keine Unterscheidung der einzelnen Verlaufsformen zu (Modlin et al. 2009).

Wie bereits beschrieben, erlauben die Leitlinien bei Vorliegen eines typischen klinischen Beschwerdebilds mit Sodbrennen und Regurgitation die Diagnose GERD ohne weitere Diagnostik zu stellen und eine empirische Therapie mit PPI zu beginnen (Vakil et al. 2006). Bei dieser Konstellation lässt sich die Genauigkeit der Diagnose mittels probatorischer Gabe eines PPI und anschließender Beurteilung der Beschwerden im sogenannten PPI-Test steigern. Die Sensitivität liegt für die erosive Verlaufsform bei 83% (Fass et al. 2000), ein negatives Ergebnis schließt GERD jedoch nicht aus (Katz et al. 2013).

Voraussetzung für die Weiterführung einer empirischen Therapie mit Protonenpumpenhemmern ist das Fehlen von sogenannten Alarmsymptomen. Liegen diese neben einem GERD-typischen Beschwerdebild vor, ist eine Ösophago-gastroduodenoskopie (ÖGD) mit eventueller Biopsieentnahme unumgänglich. Unter diese Warnsymptome fallen Dysphagie, Odynophagie, unfreiwilliger Gewichtsverlust, Anämie, Hinweise auf eine gastrointestinale Blutung oder Raumforderung und Anzeichen für eine Strikturen oder ein Ulkus (Koop et al. 2014). Hinter diesen Beschwerden können sich Komplikationen der GERD oder andere Erkrankungen verbergen. Zu den GERD-assoziierten Komplikationen zählen Hämorrhagien, Strikturen und der sogenannte Barrett-Ösophagus. Von letzterem spricht man beim Vorliegen von Zylinderepithelmetaplasien in einer Biopsie, endoskopisch sicher aus dem Ösophagus proximal des gastroösophagealen Übergangs entnommen. Diese werden histologisch auf das Vorhandensein einer intestinalen Metaplasie untersucht (Vakil et al. 2006). Endoskopisch wird ein Barrett-Ösophagus anhand der Prag-Kriterien nach seiner Länge, welche sich über die gesamte Ösophaguszirkumferenz erstreckt, und seiner maximalen Ausdehnung eingeteilt (Sharma 2006). Dabei stellt der langstreckige Barrett-Ösophagus mit intestinaler Metaplasie den wichtigsten Risikofaktor für die Ausbildung eines ösophagealen Adenokarzinoms dar (Vakil et al. 2006). Die Prävalenz des Barrett-Ösophagus liegt bei 11% der Patienten mit GERD in Mitteleuropa (Kulig et al. 2004). Jährlich entwickeln etwa 0,5% der Barrett-Patienten ein Adenokarzinom des Ösophagus (Yousef 2008).

Wie bereits erwähnt, gelingt endoskopisch die Unterscheidung zwischen der erosiven und der nicht erosiven Manifestation der gastroösophagealen Refluxerkrankung. Die Einteilung des Schweregrads der erosiven Verlaufsform sollte dabei nach der Los-

Angeles-Klassifikation vorgenommen werden und berücksichtigt die Größe und Ausprägung endoskopisch sichtbarer mukosaler Erosionen (Lundell et al. 1999).

Bei negativer Endoskopie oder PPI-refraktären Beschwerden ist zudem eine pH-Metrie angeraten (Koop et al. 2014). Diese dokumentiert nach Absetzen einer PPI-Medikation den pH-Wert innerhalb des Ösophagus, die Azidität eines möglichen Refluats und die prozentualen Säureexpositionszeiten der Speiseröhre. Unterschieden werden hierbei die konventielle, kathetergestützte Methode und eine katheterfreie Form mittels endoskopisch platzierter Kapsel. Letztere wird vom Patienten deutlich besser toleriert und erzielt durch eine längere Aufzeichnung von bis zu vier Tagen eine höhere Sensitivität und Spezifität (Kandulski et al. 2013). Kombiniert werden kann die kathetergestützte pH-Metrie mit einer Impedanzmessung zur sogenannten MII-pH. Mittels MII-pH lassen sich bis zu 95% aller Refluxepisoden detektieren (Shay et al. 2002) und das unabhängig davon, ob es sich um flüssige oder gasförmige Anteile handelt. Die pH-Elektrode auf dem MII-pH-Katheter qualifiziert die Refluxepisoden in sauer, schwach-sauer und schwach-alkalisch (Sifrim et al. 2004; Sifrim et al. 2001; Vela et al. 2003). Durch die MII-pH kann die Genauigkeit der Diagnostik gesteigert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass MII-pH sowohl mit als auch ohne laufende PPI-Medikation durchgeführt werden kann (Weigt et al. 2007). Bei pH-Metrie wie bei MII-pH sollte eine Korrelation empfundener Symptome mit den dokumentierten Refluxepisoden erfolgen. Mögliche Analysewerkzeuge sind hierbei der Symptomindex (SI) oder die Symptom Association Probability (SAP) (Bredenoord et al. 2005).

Diese Assoziation ermöglicht auch die Abgrenzung von NERD gegenüber dem hypersensitiven Ösophagus (HE) und dem funktionellen Sodbrennen (FH), welche sich ebenfalls durch eine negative Endoskopie und eine gleiche oder ähnliche Symptomatik auszeichnen. NERD weist dabei eine positive pH-Metrie oder MII-pH mit positiver Symptomassoziation auf. Demgegenüber liegt beim HE zwar ebenfalls eine positive Symptomassoziation vor, die pH-Metrie oder MII-pH ergeben jedoch Werte innerhalb der Norm. Beim FH klagen die Patienten ebenfalls über Sodbrennen, allerdings lassen sich weder ein gesteigerter Reflux noch eine Verknüpfung der Symptome mit Refluxepisoden dokumentieren (Koop et al. 2014).

1.1.4. Pathophysiologie der gastroösophagealen Refluxerkrankung und Therapieansätze

Teil der Therapie von GERD ist eine Veränderung der Lebensweise und das Meiden von Risikofaktoren. Zu diesen zählen die unveränderlichen Faktoren steigendes Lebensalter und männliches Geschlecht (Kulig et al. 2004; Lee et al. 2009). Einen Einfluss besitzt auch ein übergewichtiger oder adipöser BMI (Gunji et al. 2011; Hampel et al. 2005; Kulig et al. 2004; Lee et al. 2009; Ronkainen et al. 2005). Selbst eine Gewichtszunahme bei Normalgewichtigen kann Symptome auslösen oder verstärken (Jacobson et al. 2006). Daher wird eine Gewichtsnormalisierung bei Übergewicht angeraten (Katz et al. 2013; Koop et al. 2014). Zwar wurden verstärkter Alkohol- und Tabakkonsum als Risikofaktoren für GERD ausgemacht (Gunji et al. 2011; Kulig et al. 2004; Lee et al. 2009), für ein Meiden dieser Stoffe konnte jedoch kein positiver Effekt auf die Symptomatik nachgewiesen werden, sodass eine Abstinenz zur Behandlung typischer GERD-Symptome nicht generell empfohlen wird. Insbesondere bei nächtlichem Reflux sollte auf kalorienreiche Spätmahlzeiten verzichtet und über eine Elevation des Kopfendes des Bettes nachgedacht werden (Katz et al. 2013). Generell muss jedoch auf den begrenzten Einfluss von Lifestyleinterventionen in kontrollierten Studien hingewiesen werden (Koop et al. 2014).

Die Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung ist multifaktoriell bedingt. Der grundlegende Mechanismus, welcher dem Reflux zugrunde liegt, sind die transienten Erschlaffungen des unteren Speiseröhrenschließmuskels (transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESR), welche unabhängig von Schluckakten ausgelöst werden. Während der TLESRs kommt es zum Übertritt von Mageninhalt in die Speiseröhre (Mittal et al. 1995; Sifrim & Holloway 2001). Zurzeit wird in der Forschung großer Aufwand zur Senkung der Anzahl an TLESRs und zur Erhöhung des Verschlussdrucks des unteren Ösophagussphinkters betrieben. Aktuelle Studien medikamentöser Ansätze zur Reduktion der TLESRs scheiterten jedoch an mangelnder Wirksamkeit oder deutlichen Nebenwirkungen (Kandulski & Malfertheiner 2012).

Die chirurgische Fundoplicatio ist in der Lage, die Rate an TLESRs zu senken und zeigt auf lange Sicht eine gute Wirksamkeit (Galmiche 2011; Mittal et al. 1995). Eine operative Therapie sollte jedoch nur durchgeführt werden, falls ein langfristiger

Therapiebedarf besteht und eine Refluxgenese der Symptome zweifelsfrei belegt werden konnte (Koop et al. 2014).

Ein bedeutender Anteil der GERD-Pathogenese kommt der Ösophagusschleimhaut zu, die durch direkten Kontakt mit der Magensäure morphologische, funktionelle und molekulare Veränderungen aufweist. In verschiedenen Tiermodellen verursachte das Aussetzen gegenüber Säure eine entzündliche Reaktion der Ösophaguskosa (Goldberg et al. 1969; Souza et al. 2009). Beim Menschen ruft der Kontakt des Epithels mit sauren Flüssigkeiten GERD-abhängige Symptome und Schmerzen hervor, welche bei niedrigem pH-Wert und verlängerter Säure-Clearancezeit verstärkt sind (Bredenoord et al. 2006). Patienten mit GERD weisen dabei eine größere Sensitivität gegenüber sauren Reizen auf als gesunde Kontrollen. Bei dieser persistierenden Hypersensitivität der Schleimhaut gegenüber sauren Stimuli kann daher teils schon bei schwach-saurem pH Sodbrennen verspürt werden (Smith et al. 1989; Weijenborg et al. 2014).

Ein Grund hierfür könnte die veränderte Mikroarchitektur der Schleimhaut bei GERD sein. So finden sich in der Mukosa von Betroffenen bereits lichtmikroskopisch Veränderungen im Aufbau des mehrschichtigen Plattenepithels. Dabei macht die Basalzellschicht einen Anteil von mehr als 15% der Epitheldicke aus (Basalzellhypertrophie, BZH), die Papillen sind auf bis zu 2/3 der Dicke verlängert (Papillanelongation, PE) (Ismail-Beigi et al. 1970; Isomoto et al. 2004). Mittels Elektronenmikroskop lässt sich zudem eine Dilatation der Interzellularspalten (DIS) detektieren (Hopwood et al. 1979; Tobey et al. 1996; Vieth et al. 2004). Jene DIS ließen sich bei gesunden Probanden durch ösophageale Säureperfusion provozieren (Farre 2010).

Morphologische Veränderungen der Ösophagusschleimhaut sind sowohl elektronenmikroskopisch als auch lichtmikroskopisch nachweisbar und finden sich sowohl bei ERD wie NERD, wobei sie bei der erosiven Form häufiger und stärker ausgeprägt erscheinen (Mönkemüller et al. 2009; Wex et al. 2009). Als GERD-typische Umbildungen des Epithels stellen BZH, PE und DIS sogar Aspekte zur Abgrenzung von NERD gegenüber der Differentialdiagnose des funktionellen Sodbrennens dar (A Kandulski et al. 2013). In den aktuellen Leitlinien der DGVS wird die Entnahme von ösophagealen Biopsien und deren histopathologische Aufarbeitung jedoch nicht empfohlen (Koop et al. 2014).

Funktionell resultiert aus diesen histopathologischen Veränderungen eine Schädigung der mukosalen Barriere mit verminderter Integrität und gesteigerter Permeabilität. Untersuchungen an der Speiseröhrenschleimhaut von Kaninchen zeigten, dass ein Bedecken mit saurem Medium die elektrische Widerstandsfähigkeit der Mukosa senkt, während die transepitheliale Durchlässigkeit steigt (Farré et al. 2008; Tobey 2001). Diese Resultate konnten auch beim Menschen reproduziert werden. So fand sich bei Patienten mit GERD eine erhöhte transepitheliale Permeabilität bei verringerter Impedanz der Schleimhaut (Ates et al. 2015; Bjorkman et al. 2013).

Neben der beschriebenen persistierenden Hypersensitivität der Schleimhaut ist die Inflammation ein bedeutender Faktor der mukosalen Immunreaktion. In den letzten Jahren ist die der GERD zugrunde liegende Inflammation der Ösophagusk Mukosa zunehmend intensiv untersucht worden. In Tiermodellen und Zellversuchen konnte ebenso wie in Biopsien der Ösophagusschleimhaut bei Patienten mit GERD ein proinflammatorisches Zytokinmilieu demonstriert werden. Neben Interleukin 1 β (Isomoto et al. 2003; Hamaguchi 2003; Mönkemüller et al. 2009), Interleukin 6 (Rafiee et al. 2009; Rieder et al. 2007) und weiteren proinflammatorischen Mediatoren (Isomoto et al. 2003; Hamaguchi 2003; Altomare et al. 2012) zeigten sich insbesondere die Genexpression und Proteinlevel von Interleukin 8 erhöht (Fitzgerald et al. 2002; Kanazawa et al. 2003; Oh et al. 2007). IL-8 wird sowohl bei der erosiven wie der nicht-erosiven Refluxerkrankung verstärkt exprimiert. Dabei korrelieren die Genexpression und Proteinlevel eng mit dem endoskopischen Schweregrad (Isomoto et al. 2007; Yoshida et al. 2004). Zudem besteht eine starke Korrelation mit den zuvor genannten histopathologischen Veränderungen von GERD und der epithelialen Infiltration durch Immunzellen (Isomoto et al. 2004; Isomoto et al. 2003; Mönkemüller et al. 2009; Yoshida et al. 2004). Der Grad an infiltrierenden Immunzellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten, korreliert wiederum eng mit dem endoskopischen Bild (Yoshida et al. 2004).

Interleukin-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin und Chemokin. Es besitzt eine chemotaktische Wirkung auf Lymphozyten und vor allem auf neutrophile Granulozyten und kann letztere zur Degranulation veranlassen (Baggiolini et al. 1989; Mukaida 2003). Exprimiert und freigesetzt wird es insbesondere von den Zellen des Immunsystems, Fibroblasten aber auch epithelialen Keratinozyten

(Fitzgerald et al. 2002; Isomoto et al. 2004; Kandulski & Malfertheiner 2012; Rieder et al. 2010; Yoshida et al. 2004).

Unter Therapie mit PPI und auch nach Fundoplicatio waren verminderte IL-8-Genexpression und -Proteinlevel in ösophagealen Biopsien nachweisbar (Isomoto et al. 2004; Isomoto et al. 2003; Oh et al. 2007; Yoshida et al. 2004). Dies verdeutlicht den Einfluss von Refluxepisoden und sauren pH-Werts auf die mukosale Immunreaktion bei Patienten mit GERD.

In einem Tiermodell an Ratten untersuchten Souza et al. die zeitliche Abfolge in der Pathogenese der mukosalen Immunreaktion bei GERD. Dabei beschrieben sie als erste Reaktion der Mukosa Exposition mit gastroösophagealen Reflux die verstärkte Freisetzung von Chemokinen, gefolgt von einer Infiltration von Immunzellen. Die Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten infiltrierten von der Submukosa aus das Epithel. Es folgten in der zeitlichen Sequenz die spezifischen histopathologischen Veränderungen Basalzellhyperplasie und Papillanelongation und erst deutlich später makroskopisch sichtbare Schleimhauterosionen (Souza et al. 2009). Dies stellt einen Paradigmenwechsel im Verständnis der Pathophysiologie von GERD dar und erklärt die gastroösophageale Refluxerkrankung zu einer primär immunvermittelten Erkrankung mit Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen durch das Epithel und darauf folgenden Veränderungen wie Infiltration von Immunzellen und Schleimhautläsionen.

Protonenpumpeninhibitoren hemmen irreversibel die Säuresekretion aus den gastralen Parietalzellen und reduzieren somit die Säureexposition des distalen Ösophagus bei Patienten mit GERD (Hemmink et al. 2008; Tamhankar et al. 2004). Sie stellen nach aktueller Leitlinie der DGVS die Erstlinientherapie bei nachgewiesener Refluxerkrankung dar oder dienen der empirischen Therapie bei vorliegen typischer GERD-Symptomatik und dem Fehlen von Alarmsymptomen. Bei unzureichendem Ansprechen wird eine Steigerung der Dosis angeraten (Koop et al. 2014).

In einer Metaanalyse zum Effekt von PPI bei verschiedenen Entitäten der Refluxerkrankung konnten Kahrilas und Kollegen die besten Ergebnisse für das Abheilen erosiver Veränderungen der Ösophagasmukosa ermitteln (Boeckxstaens et al. 2014; Peter J Kahrilas et al. 2013). Nach einer vierwöchigen PPI-Therapie wiesen 88% der Patienten mit ERD bei Diagnosestellung mittels Ösophagoduodenoskopie

und pH-Metrie keine Symptome mehr auf, bei persistierenden Beschwerden konnte durch eine Verdopplung der Dosis bei weiteren 8% Symptomfreiheit erlangt werden (Arne Kandulski et al. 2013). Auch langfristig zeigen PPI eine gute Wirksamkeit. Nach fünf Jahren Therapie befanden sich in einer Studie noch 92% der Betroffenen in Remission (Galmiche 2011). Bereits für eine zweiwöchige Therapie mit Protonenpumpenhemmern ist eine Normalisierung der zuvor deutlich eingeschränkten Lebensqualität von Patienten mit GERD beobachtet worden (Kulig 2003).

Dem gegenüber stehen Veröffentlichungen, welche von einer unzureichenden Wirksamkeit der PPI zeugen. Nach vierwöchiger Säuresuppression litten 35% der Patienten unter persistierenden Symptomen (Castell et al. 2002). Eine achtwöchige Therapie ließ bei 15% der Betroffenen die Erosionen nicht abheilen, bis zu 37% hatten weiterhin Beschwerden (Katz et al. 2006). Auch bei Verdopplung der PPI-Dosis für acht Wochen litten 28% der Patienten mit GERD unter fortbestehenden Symptomen (Monaco et al. 2009). Während für Sodbrennen noch gute therapeutische Effekte gegenüber Placebo erzielt werden, ist der therapeutische Gewinn für Symptome wie Regurgitation, Brustschmerz oder chronischem Husten nur gering (Boeckxstaens et al. 2014; Hemmink et al. 2008; Kahrilas et al. 2012).

In der Literatur liegen PPI-refraktäre Beschwerden häufig bei Patienten mit nicht-erosiver Verlaufsform vor (Dean et al. 2004; Fass 2009; Miner Jr. et al. 2002). Wird NERD definiert als Fehlen von Erosionen in der ÖGD bei gleichzeitig pathologischem pH-Monitoring, so ergeben sich allerdings keine Unterschiede in der Wirksamkeit von PPI gegenüber der erosiven Verlaufsform (Arne Kandulski et al. 2013; Weijenborg et al. 2012). Andere Publikationen sehen eine falsche Diagnose, wie beispielsweise das funktionelle Sodbrennen, als häufigsten Grund von persistierenden Symptomen an (Smout 2007).

Insbesondere bei postprandialen Refluxbeschwerden scheint die sogenannte Acid Pocket eine pathophysiologische Rolle zu spielen. Sie stellt einen direkt subdiaphragmal gelegenen Bereich dar, welcher auch unter PPI-Therapie sauren Magensaft enthält. Bei Vorliegen einer Zwerchfellherniation kann die Acid Pockt auch supradiaphragmal gelegen sein. Die enthaltene Säure entgeht der Pufferung durch Nahrungsbestandteile und kann in die Speiseröhre refluiere (Fletcher et al. 2001; P J Kahrilas et al. 2013). Als neuer therapeutischer Ansatz bei PPI-refraktären Patienten wird aktuell die therapeutische Bedeutung von Alginaten untersucht. Diese

akkumulieren im Bereich der Acid Pocket, bilden ein auf dem Magensaft schwimmendes Gel aus und senken Refluxepisoden und die ösophageale Säureexposition (De Ruigh et al. 2014; Fox et al. 2011; Rohof et al. 2013).

Ein weiterer Grund für die fehlende Wirksamkeit von PPI scheint in der Zusammensetzung des Refluats zu liegen. So senkt eine Therapie mit PPI zwar den Anteil von sauren zu Gunsten von schwach-sauren oder neutralen Refluxepisoden, die Gesamtanzahl bleibt jedoch unverändert (Boeckxstaens & Smout 2010; Hemmink et al. 2008; Tamhankar et al. 2004). Mehrere Publikationen belegen, dass auch schwach-saure Refluxepisoden mit einem $\text{pH} \geq 4$ Beschwerden hervorrufen können (Bredenoord et al. 2006; Sharma et al. 2008; Sifrim et al. 2001; Vela et al. 2001; Weigt et al. 2007). Diese stellen bei bestehender PPI-Medikation die häufigste Ursache für die Wahrnehmung von refluxassoziierten Symptomen dar (Boeckxstaens & Smout 2010; Mainie et al. 2006).

Im duodeno-gastroösophagealen Refluat sind Proteasen aus dem Magen (Pepsin) und dem Dünndarm, wie Trypsin, enthalten. Sie spielen eine weitere bedeutende Rolle in der mukosalen Entzündung. In Tiermodellen verursachte die Zugabe von Pepsin zum sauren Magensaft schon bei höherem pH-Wert eine stärkere Ösophagitis und senkte den transepithelialen elektrischen Widerstand stärker als Säure allein (Goldberg et al. 1969; Tobey 2001). Bei Ratten verringerte eine Trypsinhemmung mittels Camostatmesilat das Ausmaß von Ulzerationen und senkte die Genexpression proinflammatorischer Botenstoffe (Naito et al. 2006). Im menschlichen Ösophagus korreliert die Trypsinaktivität mit dem Grad der Ösophagitis, der Genexpression proinflammatorischer Zytokine und der Infiltration von Immunzellen (Kono et al. 2006).

Durch Aktivierung von spezifischen Rezeptoren werden Protease-vermittelte Prozesse reguliert. Trypsin aktiviert dabei spezifisch den Protease-aktivierten Rezeptor 2 (PAR-2) und vermittelt proinflammatorische Prozesse bei Patienten mit GERD (Nystedt et al. 1995; Cottrell et al. 2004; Corvera et al. 1999). In Biopsien fand sich der Rezeptor unter anderem an der Oberfläche des Ösophagusepithels, wo er mit luminalen Proteasen wie Trypsin interagieren kann (Inci et al. 2009). Die Arbeitsgruppe um Kandulski beschrieb bei Patienten mit GERD eine charakteristisch verstärkte PAR-2-Expression der Mukosa und erklärte die gastroösophageale Refluxkrankheit zu einer durch gesteigerte PAR-2-Genexpression charakterisierte

Erkrankung. Sie offenbarte, dass die PAR-2-mRNA-Level bei Ösophagus-Biopsien von Patienten mit GERD 7 - 10-fach erhöht waren, unabhängig davon, ob Erosionen vorlagen und unabhängig vom Stadium der Erkrankung. Für die PAR-2-Genexpression konnte darüber hinaus eine positive Korrelation mit den GERD-typischen histopathologischen Veränderungen DIS, PE und BZH veranschaulicht werden (Kandulski et al. 2010).

Ebenso korrelierten die PAR-2-mRNA-Level mit der Genexpression des proinflammatorischen Interleukin-8. In vitro-Untersuchungen mit den ösophagealen Epithelzelllinien KYSE 150 und KYSE 450 ergaben zudem eine 1,5 - 20-fache Induktion der Genexpression des Rezeptors durch Inkubation in saurem Zellmedium. (Kandulski et al. 2010). Shan et al. beschrieben in ihren Experimenten an der primären humanen Ösophaguszelllinie HEEpiC eine PAR-2-vermittelte IL-8-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese. Zusätzlich führte eine PAR-2-Aktivierung zu einem Abfall des elektrischen Widerstands im Zellmodell (Shan et al. 2012).

1.2. Protease-aktivierter Rezeptor-2

Der Protease-aktivierte Rezeptor 2 ist Teil der Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Als metabotropes Membranprotein verfügt er über sieben Transmembrandomänen (Nystedt et al. 1994). Dabei liegt das n-terminale Ende extrazellulär, während sich der Carboxy-Terminus intrazellulär befindet.

Zur Aktivierung der Rezeptoren der PAR-Gruppe wird der extrazelluläre Amino-Terminus von Serinproteasen an spezifischen Sequenzen gespalten (Pierce & Lefkowitz 2001). Im Falle von PAR-2 sind diese aktivierenden Proteasen Trypsin (Corvera et al. 1999; Cottrell et al. 2004; Nystedt et al. 1995) oder Tryptase, welche aus Mastzellen freigesetzt wird (Cenac et al. 2002; Compton et al. 2001; Steinhoff et al. 2000). Auch die Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa, Acrosin, Granzym A (Zhao et al. 2014) und verschiedene Kallikreine wurden in Studien als Rezeptor-Agonisten identifiziert (Oikonomopoulou et al. 2006). Das durch Proteolyse so neu entstandene aminoternale Ende unterliegt einer Konformationsänderung und fungiert nun als gebundener Ligand (tethered ligand). Diese proteineigene Domäne interagiert mit der zweiten extrazellulären Domäne des Rezeptors und ist somit in der Lage zu dessen Aktivierung (Pierce & Lefkowitz 2001; Al-Ani et al. 1999).

Neben diesem kanonischen Aktivierungsweg erfolgt die Stimulation durch synthetische Aktivierungspeptide (AP) ohne proteolytische Abspaltung des N-Terminus. Diese kurzen Aminosäuresequenzen entsprechen denen des "tethered ligand" und können durch Bindung den Rezeptor direkt aktivieren. Im Falle einer Spaltung durch Trypsin entspricht dies der Aminosäureabfolge Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-NH₂ (SLIGKV) (Stalheim et al. 2005; Gardell et al. 2008), welche als AP in dieser Arbeit zur PAR-2-Aktivierung zum Einsatz kam.

Die sich an die Rezeptoraktivierung anschließende Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht die folgende Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen (Ferguson et al. 1998; Ayoub & Pin 2013). Dieses Zusammenspiel setzt nun nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. In der Kinetik der PAR-2-Aktivierung lassen sich diese Signalkaskaden jedoch nicht, wie bei anderen Rezeptoren, durch Abdiffusion des Agonisten beenden. Grund hierfür ist die irreversible Proteolyse des Rezeptors. Die Termination der Signalübertragung erfolgt bei den PAR über Endozytose, Internalisierung und intrazellulären Abbau des Rezeptors, beziehungsweise dessen Re-Synthese und Transport an die Zellmembran. Initiiert wird dies durch Phosphorylierung des PAR-2-Carboxyterminus durch G-Proteingekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) (Ferguson et al. 1998; Ricks & Trejo 2009). Dies erzeugt eine gesteigerte Affinität für die β -Arrestine 1 und 2, welche an den Rezeptor binden und dadurch dessen Interaktion mit den G-Proteinen beenden (Stalheim et al. 2005). β -Arrestin-vermittelt erfolgt nun die Endozytose und Internalisierung des PAR in Vesikel durch Bindung an Clathrin und β 2-Adaptin des Adaptorproteinkomplexes 2 (AP-2 complex) (Ferguson et al. 1998; Laporte et al. 1999; Pierce & Lefkowitz 2001). Von dort kann ein Recycling zur Zellmembran oder der intrazelluläre Transfer zum lysosomalen Abbau des Rezeptors erfolgen (Trejo 2003).

Intrazellulär wurde die Lokalisation des Rezeptors mittels Immunhistochemie untersucht. Im Ruhezustand sind die PAR zunächst zellmembranassoziiert und auf die intrazellulären Kompartimente des Golgi-Apparats verteilt auffindbar (Böhm et al. 1996; Cenac et al. 2002), während die β -Arrestine im Zytoplasma detektiert werden können. Bei Rezeptoraktivierung folgt auf eine Co-Lokalisierung dann die Internalisierung der PAR (Déry et al. 1999). So sind sie zunächst vermehrt in superfiziellen Vesikeln auffindbar. Die weiteren intrazellulären Transferwege sind abhängig vom Phosphorylierungsmuster des Carboxyterminus. Die PAR-2 können

zur Zellmembran recyceln oder über perinukleäre Vesikel in Lysosomen gelangen und dort degradiert werden (Böhm et al. 1996; Ricks & Trejo 2009).

Die Antworten und Effekte Protease-aktivierter Rezeptoren sind multipel modulierbar. So kann ein PAR durch verschiedene Proteasen an unterschiedlichen Sequenzen proteolytisch gespalten werden, was verschiedene gebundene Liganden erzeugt (biased signalling) (Zhao et al. 2014). Auch scheint sich die Aktivierung durch APs von der kanonischen Stimulation zu unterscheiden, da eine PAR-2-Aktivierung durch Trypsin eine deutlich größere Potenz zeigt als durch das korrespondierende AP SLIGKV (Hou et al. 1998; Ayoub & Pin 2013; Al-Ani et al. 2002). PAR können mit verschiedenen G-Proteinen interagieren und unterschiedliche Proteinkinasen aktivieren (Zhao et al. 2014). Neben der Aktivierung von ERK 1/2 und dem nachgeschalteten MAPK-ERK-Pathway (Yoshida et al. 2007; Søreide 2008; Jacob et al. 2005) wurde so auch eine Signaltransduktion über PI-3-K/Akt beobachtet (Tanaka et al. 2008).

Weiter ist PAR-2 fähig zur Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit PAR-1, was unterschiedliche nachfolgende Kaskaden stimuliert (Lin et al. 2013). Bedeutsamen Einfluss auf die Signalmodulierung könnten ebenfalls der jeweilige Gewebetyp und vorherrschende Entzündungsreaktionen haben (Zhao et al. 2014).

Der Protease-aktivierte Rezeptor 2 wird in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Besonders häufig ist er neben Leber-, Nieren- und Pankreasgewebe im Gastrointestinaltrakt zu finden (Nystedt et al. 1995). Dort weist das Kolonepithel eine starke PAR-2-Expression auf (Jacob et al. 2005) und auch die in dieser Studie verwendete Zelllinie HEEpiC exprimiert PAR-2 konstitutiv (Yoshida et al. 2007). In vitro und in vivo Studien zeigten, dass der Rezeptor an der Regulation vieler intestinaler Entzündungsvorgänge beteiligt ist (Ossovskaya & Bunnett 2004; Søreide 2008). Überdies ließ sich PAR-2 vermehrt mittels Immunfärbungen in Colonbiopsien bei Morbus Crohn nachweisen (Chin et al. 2008).

Neben der bereits beschriebenen Rolle in der Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung (Kandulski et al. 2010; Shan et al. 2012) wurde auch in Untersuchungen an verschiedenen gastrointestinalen Tumorzelllinien und einer immortalisierten Keratinozytenlinie eine Beteiligung von PAR-2 an der Interleukin-8-Synthese und -Sekretion ermittelt (Hou et al. 1998; Tanaka et al. 2008). Des

Weiteren konnten Experimente am Colon von Mäusen zeigen, dass eine PAR-2-Aktivierung zu vermehrten makroskopischen Mukosadefekten und Wandödemen führt. Zudem zeigte sich in den Untersuchungen eine verstärkte Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und Interleukin-1 β (Cenac et al. 2002).

Auch an der Modulation neuroinflammatorischer Prozesse und von Schmerzreizen ist eine Beteiligung von PAR-2 beschrieben (Ossovskaya & Bunnett 2004; Coelho et al. 2002). So wurde eine PAR-2-Expression in humanen Ganglienzellen der spinalen Hinterwurzel detektiert. Eine PAR-2-Aktivierung führte zur Freisetzung der proinflammatorischen Neuropeptiden Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und Substanz P (Steinhoff et al. 2000). Ebenfalls wurde die Expression des Rezeptors in Zellen des myenterischen Plexus nachgewiesen (Corvera et al. 1999). In Versuchen an Ratten bewirkte eine PAR-2-Aktivierung eine Hyperalgesie auf thermale und mechanische Reize (Vergnolle et al. 2001). Eine andere Arbeit zeigte die Co-Expression und funktionelle Interaktion von PAR-2 mit dem Schmerzrezeptor TRPV1. Die Aktivierung von PAR-2 senkte dabei die Reizschwelle des capsaicinsensiblen Nozizeptors (Dai et al. 2004).

Neben seiner Rolle als wichtiger Mediator intestinaler Entzündungsreaktionen und viszeraler Hyperalgesie, ist PAR-2 entscheidend für die funktionelle Integrität beziehungsweise Permeabilität von intestinalen Schleimhäuten (Coelho et al. 2002). Untersuchungen am Dickdarm von Mäusen ergaben, dass eine PAR-2-Aktivierung eine verstärkte Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen in mesenteriale Lymphknoten unterstützt (Cenac et al. 2002). Auch wurde eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität für Makromoleküle nach PAR-2-Aktivierung beobachtet (Jacob et al. 2005). Diese ist ebenfalls für das Colon von Ratten beschrieben (Coelho et al. 2002). Beobachtet wurde ein verstärktes Leukozyten-Rolling auf PAR-2-Aktivierung und ein Anstieg der Leukozytenmigration in die Peritonealhöhle von Ratten bei intraperitonealer Applikation von PAR-2-AP (Vergnolle 1999). Ebenso erleichtert die Rezeptorstimulation die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten, die an vielen entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Bei in-vitro-Testungen wurde zudem nach Aktivierung von PAR-2 ein erniedrigter transepithelialer Widerstand detektiert (Chin et al. 2008). Hierbei fand sich eine PAR-2-induzierte Umverteilung von Tight-Junction-Proteinen und F-Actin (Jacob et al. 2005).

Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Ödembildung und Gefäßrelaxierung (Oikonomopoulou et al. 2006) ist der Rezeptor auch an der Angiogenese beteiligt. Außerdem sind proliferative Effekte von PAR-2 auf bestimmte Colon- und Pankreas-Karzinome beschrieben (Ossovskaya et Bunnett 2004). Zudem ist PAR-2 in Tumoren der Lunge und verschiedenen gynäkologischen Tumoren exprimiert (Søreide 2008).

1.3. Fragestellung

Ziel der vorgelegten Arbeit war die Pathogenese der mukosalen Entzündungsreaktion der gastroösophagealen Refluxerkrankung in vitro differenzierter zu untersuchen. Im Speziellen sollte die Bedeutung des epithelialen Keratinozyten für die PAR-2-abhängige Initiierung der mukosalen Immunpathogenese herausgearbeitet werden.

Hierzu wurde zunächst ein in-vitro-Zellmodell mit der primären humanen ösophagealen Epithelzelllinie HEEpiC etabliert. Um die in-vivo-Situation möglichst genau darzustellen, wurde der Einfluss wiederholter Exposition gegenüber schwach-saurem Medium und PAR-2- AP untersucht.

Speziell überprüft werden sollte dabei:

- (1) Bewirkt bereits die wiederholte Exposition mit schwach-saurem Medium eine verstärkte PAR-2-Genexpression in ösophagealen Keratinozyten?
- (2) Führt eine verstärkte PAR-2-Expression nachfolgend zu einer verstärkten Genexpression, Proteinbiosynthese und Sekretion des proinflammatorischen Interleukin-8?

Geprüft werden sollte die Hypothese einer mehrstufigen Pathogenese der *PAR-2*-vermittelten epithelialen Inflammation der gastroösophagealen Refluxerkrankung:

- (1) In einem ersten Schritt führt die Exposition mit schwach-saurem Reflux zu einer verstärkten PAR-2-Expression.
- (2) Die folgende Aktivierung des Rezeptors auf epithelialen Keratinozyten durch pankreatisches Trypsin im Refluat initiiert die mukosale Inflammation durch verstärkte Expression und Sekretion von Interleukin-8.

2. Material & Methoden

2.1. Studiendesign

Das Arbeitsprogramm lässt sich grundsätzlich in zwei Versuchsabschnitte unterteilen. Im ersten Abschnitt erfolgt die wiederholte Exposition der ösophagealen Zellkultur mit schwach-saurem Medium, um die Hypothese einer Induktion des PAR-2-Rezeptors durch diese Reize zu untersuchen. Im zweiten Schritt erfolgt die Aktivierung des PAR-2-Rezeptors unter pH-neutralen Kulturbedingungen.

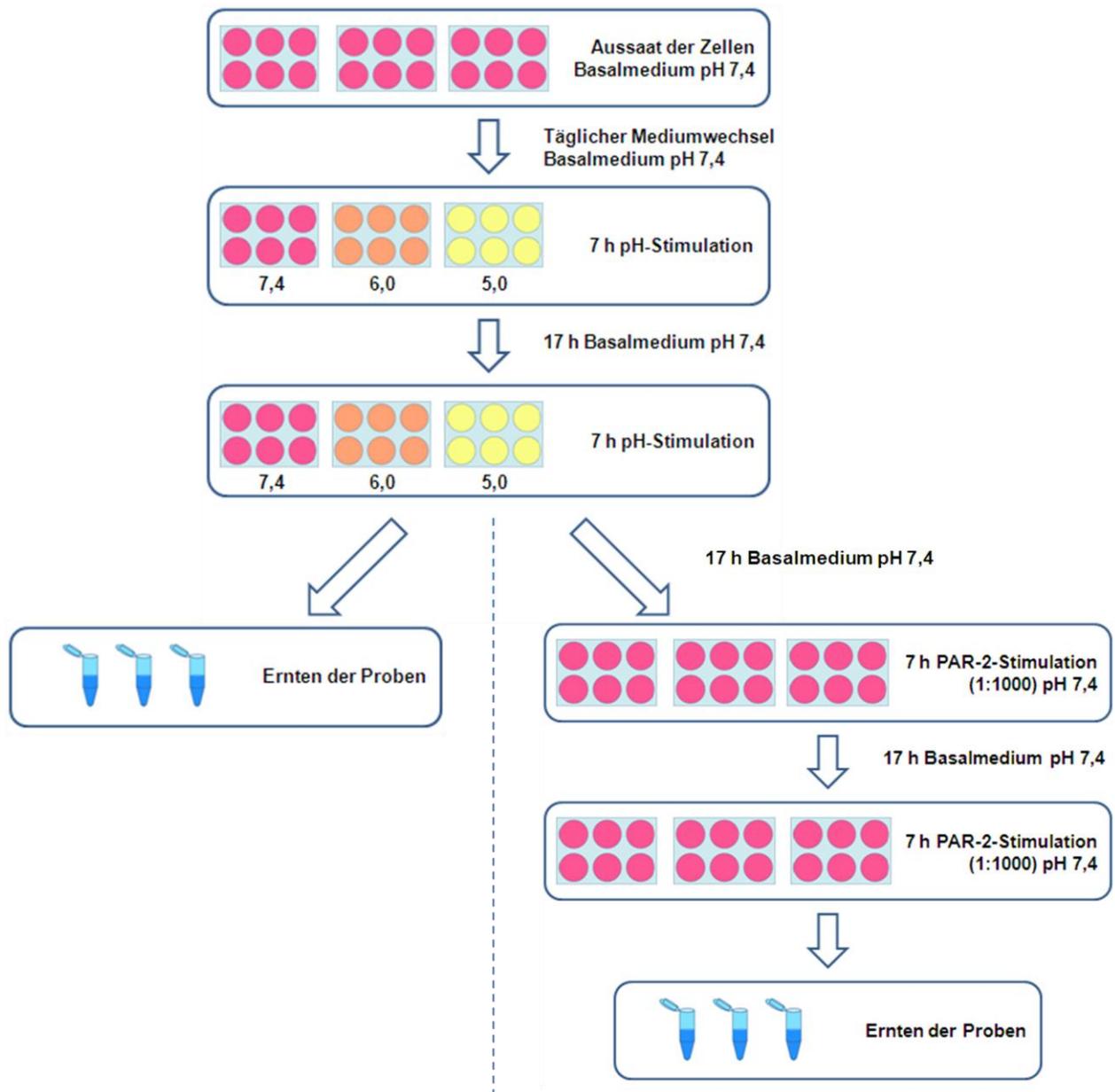


Abbildung 1: Versuchsabläufe.

Nach einem gemeinsamen Hergang über das Aussäen der Zellen und die zweitägige pH-Stimulation, werden zwei Abläufe unterschieden. Auf der linken Seite erfolgt direkt darauf die Probenahme. Rechts ist der weitere Prozess zur zusätzlichen Untersuchung der *PAR-2*-Stimulation zu erkennen.

Insgesamt erfolgten die Analysen in 161 Proben zur quantitativen Genexpression und von 157 Proben zur Proteinextraktion.

I. Untersuchungsaufbau zur Genexpressionsanalyse (IL8, PAR-2)

pH-Wert	pH-Stimulation	pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung	gesamt
7,4	24	28	52
6	29	31	60
5	21	28	49
gesamt	74	87	161

II. Untersuchungsaufbau zur Proteinextraktion und IL-8-ELISA

pH-Wert	pH-Stimulation	pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung	gesamt
7,4	12	14	26
6,0	12	14	26
5,0	13	14	27
gesamt	37	42	79

III. Untersuchungsaufbau zur Proteinanalyse im Überstand und IL-8-ELISA

pH-Wert	pH-Stimulation	pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung	gesamt
7,4	12	14	26
6,0	12	16	28
5,0	11	13	24
gesamt	35	43	78

2.2. HEEpiC – Zelllinie und Kulturmedium

Die Studie wurde unter Verwendung der humanen ösophagealen Epithelzelllinie HEEpiC (*ScienCell™ Research Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA*) durchgeführt. HEEpiC wurden aus dem menschlichen Speiseröhrenepithel isoliert und sind durch ein spezielles Immunfluoreszenzmuster charakterisiert. So lassen sie sich mit Antikörpern gegen Zytokeratin 8, 18 und 19 identifizieren. Der in dieser Arbeit untersuchte Protease-aktivierte Rezeptor-2 wird von ihnen konstitutiv exprimiert (Yoshida et al. 2007). Da es sich bei HEEpiC nicht um eine immortalisierte

Tumorzelllinie handelte, war ihre Teilungsfähigkeit mit etwa zehn Verdopplungszyklen begrenzt.

Die Kultur der epithelialen Zellen erfolgte mit einem speziellen Kulturmedium (*EpiCM-2, ScienCell™ Research Laboratories*) mit Zugabe eines Wachstumszusatzes (*EpiCGS-2,100 X, ScienCell™ Research Laboratories*) sowie einer konzentrierten Penicillin-Streptomycin-Lösung (*P/S, 100 X, ScienCell™ Research Laboratories*). Hierzu erfolgte zunächst ein Erwärmen des Kulturmediums und der konzentrierten Lösungen auf 37°C. Vor der Zugabe zum Medium sorgte leichtes Schwenken für ein komplettes Lösen der Zusätze. Das fertig gemischte Medium wurde bei 7°C dunkel gelagert.

Material: *Epithelial Cell Medium-2 EpiCM-2-Basalmedium (ScienCell™ Research Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA), EpiCGS-2 100 X (ScienCell™), P/S 100 X (ScienCell™)*

2.3. Kultivierung und Konservierung

Sämtliche Kultivierungsarbeiten fanden unter Kontaminationsschutz in der Sterilbank statt (*HERASAFE™ KS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA*).

Die Kultur der HEEpiC erfolgte in 75 cm²-großen, mit Kollagen Typ 1 beschichteten Zellkulturflaschen (*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland*). Dazu wurden etwa 500.000 Zellen in einer Flasche mit 20 ml EpiCM-2-Medium ausgesät. Leichtes Schwenken ermöglichte eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Oberfläche der Kulturflaschen. Daraufhin folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank (*Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific Inc.*).

An Tag 1 erfolgte der erste Wechsel des Mediums. Dazu wurde das alte Medium dekantiert, mittels Pasteur-Pipette entfernt und danach 20 ml frischen, auf 37°C vorgewärmten Mediums hinzugegeben. Abgestorbene oder nicht adhärente Zellen ließen sich so mit dem gewechselten Medium entfernen. Anschließend wurden die Zellen erneut wie oben aufgeführt inkubiert. Die weiteren Mediumwechsel erfolgten dann jeweils im Abstand von zwei Tagen analog zur genannten Vorgehensweise.

Gesunde Kulturen zeigten eine kopfsteinpflasterartige Morphologie, welche vor jedem Wechsel des Nährmediums lichtmikroskopisch überprüft wurde.

Nach 90%iger Konfluenz des Zellrasens in der Kulturflasche wurden die Zellen gelöst. Hierzu wurden sie zunächst mit 5 ml DPBS (*PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich*) gespült, welches verworfen wurde. Dann wurden 5 ml auf 37°C vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung (*ScienCell™ Research Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA*) in die Flasche gegeben und diese für 5 – 7 min bei 37°C inkubiert. Nach leichtem Schütteln ließen sich die gelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (*50 ml, Greiner Bio-One GmbH*) überführen. Die Flasche wurde anschließend zunächst mit 5 ml Trypsin-Neutralisations-Lösung (*ScienCell™ Research Laboratories*) und daraufhin mit 10 ml vorgewärmten Kulturmediums gespült. Beides wurde in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 215 x g, wurde der Überstand dekantiert und mittels Pasteur-Pipette entfernt. Die im Pellet verbliebenen Zellen wurden daraufhin in 25 ml Medium resuspendiert und es folgte die Vitalitätsprüfung und Zellzählung. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (*Life Technologies™, Gibco®, Carlsbad, Kalifornien, USA*) angefärbt und die Zellkonzentration in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend konnten die gelösten Zellen als neue Passage gefrierkonserviert oder als neue Subkultur ausgesät werden.

Zum Konservieren der Zellen wurden die Zentrifugenröhrchen, welche die Zellsuspensionen mit Konzentrationen von $0,5 - 10 \cdot 10^6$ Zellen/ml enthielten, für 5 min bei 1000 upm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes konnte das Zellpellet in 2 – 8°C warmem, 10% DMSO enthaltendem Einfriermedium *CryoStor® CS10 (BioLife Solutions®, Bothell, Washington, USA)* aufgenommen und resuspendiert werden. Hierfür wurde pro angelegter Konserve 1 ml des Einfriermediums zum Pellet gegeben und die Suspension daraufhin auf 2-ml-Tubes verteilt. Anschließend ließen sich die Konserven in einem auf 2 – 8°C vorgekühlten Isopropanolbehälter kontrolliert mit 1°C/min bis auf -83°C einfrieren. Am Folgetag wurden die Tubes zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

Materialien: Zellkulturflaschen (*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland CELLCOAT®, Kollagen Typ I, 75cm²*), Zentrifugenröhrchen 50 ml (*Greiner Bio-One GmbH*), *EpiCM-2 (ScienCell™ Research Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA)*, *Trypsin-EDTA-Lösung (ScienCell™)*, *Trypsin-*

Neutralisationslösung (ScienCell™), Trypanblau (Life Technologies™, Gibco®, Carlsbad, Kalifornien, USA), DPBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), CryoStor® CS10- Einfriermedium (BioLife Solutions®, Bothell, Washington, USA)

2.4. Zellversuchsaufbau

Die einzelnen Versuche wurden auf Mikrotiterplatten mit 6 Wells durchgeführt (*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland*). Zur Förderung von Zellwachstum und –Anhaftung wurden ebenfalls Kollagen Typ I beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Auf die 9,6 cm² messende Wachstumsfläche der Wells wurden jeweils 500.000 HEEpiC aufgebracht und mit 2 ml Wachstumsmedium bedeckt. Anschließend wurden die Platten analog zu den Zellkulturflaschen inkubiert. In den ersten fünf Tagen wurde das Nährmedium täglich gewechselt und das Zellwachstum und die Vitalität lichtmikroskopisch beurteilt. Nach fünf Tagen waren die Wells gleichmäßig dicht und konfluent mit einem HEEpiC-Monolayer bewachsen.

Im ersten Teil des Versuchsaufbaus erfolgte die wiederholte Exposition mit schwach-sauren Medien (pH 5, pH 6) für sieben Stunden gefolgt von 17 Stunden in normalem Kulturmedium bei pH 7,4. Am ersten Tag wurde das Basalmedium entfernt und durch Medium mit bestimmten pH-Werten ersetzt. Hierbei handelte es sich um die pH-Werte 5,0; 6,0 und 7,4. Die Herstellung der Kulturmedien mit den pH-Werten 6,0 und 5,0 erfolgte durch Titrieren mit 0,1 M HCl zum Kulturmedium unter pH-metrischer Messung. Die Kultivierung erfolgte für sieben Stunden, anschließend wurden die Zellen nach erneutem Wechsel des Mediums für 17 Stunden mit Basalmedium bedeckt. Nach weiteren sieben Stunden Kultivierung war dieser Versuch beendet und die Zellen wurden geerntet (Abbildung 2).

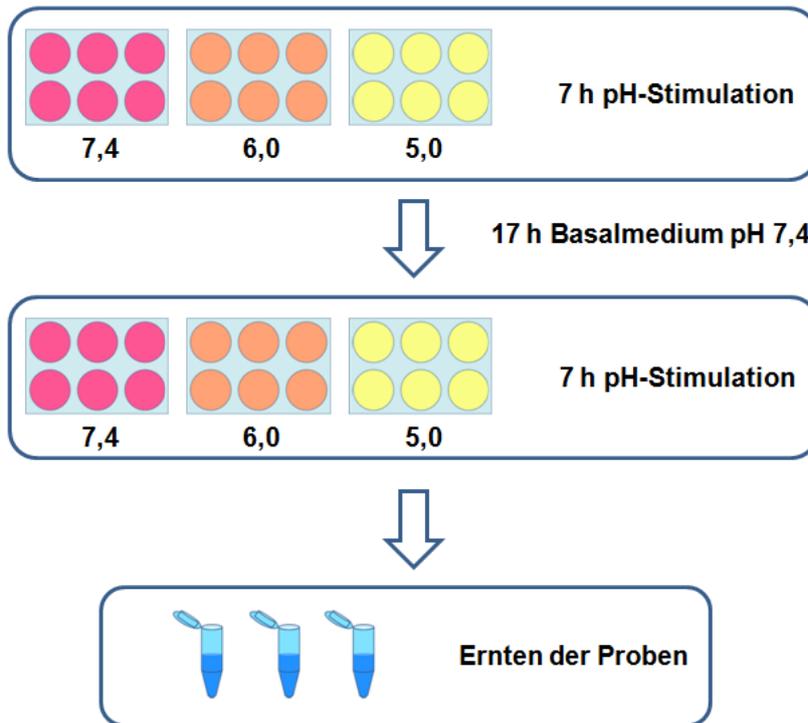


Abbildung 2:
Versuchsablauf der wiederholten Inkubation in schwach-sauren Medien.

Nach dem Aussäen der Zellen und der Wachstumsphase mit täglichem Mediumwechsel erfolgte die wiederholte Kultivierung in schwach-saurem Medium für jeweils sieben Stunden. Anschließend wurden die Proben geerntet.

Im zweiten Teil des Versuchsaufbaus erfolgte zunächst die wiederholte Exposition mit unterschiedlichen pH-Werten wie oben beschrieben. Nach der zweiten pH-Stimulation für sieben Stunden schloss sich zunächst ein Wechsel des Mediums mit Kultivierung in pH-neutralem Basalmedium für 17 Stunden an. Danach erfolgte die sequentielle Kultivierung mit dem synthetischen PAR-2-aktivierenden Peptid (PAR-2-AP) [PAR-2 (1-6) amide (human) (*H-Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-NH₂*) gelöst in Trifluoroacetate salt, Bachem AG, Bubendorf, Schweiz]. Hierzu wurde je Milliliter Basalmedium 1 µl synthetischen PAR-2-APs zugegeben und das Medium für sieben Stunden belassen. Anschließend erfolgte erneut ein Wechsel auf Normalmedium für 17 Stunden, bevor ein letztes Mal für sieben Stunden mit PAR-2-Aktivierungspeptid kultiviert wurde. Hiernach erfolgte die Ernte der Proben (Abbildung 3).

Material: EpiCM-2-Basalmedium (ScienCell™ Research Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA), EpiCGS-2 (ScienCell™), Kollagen Typ I beschichtete CELLCOAT® Six-Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), P/S (ScienCell™), PAR-2 (1-6) amide (human) (Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz), Salzsäure 0,1 M

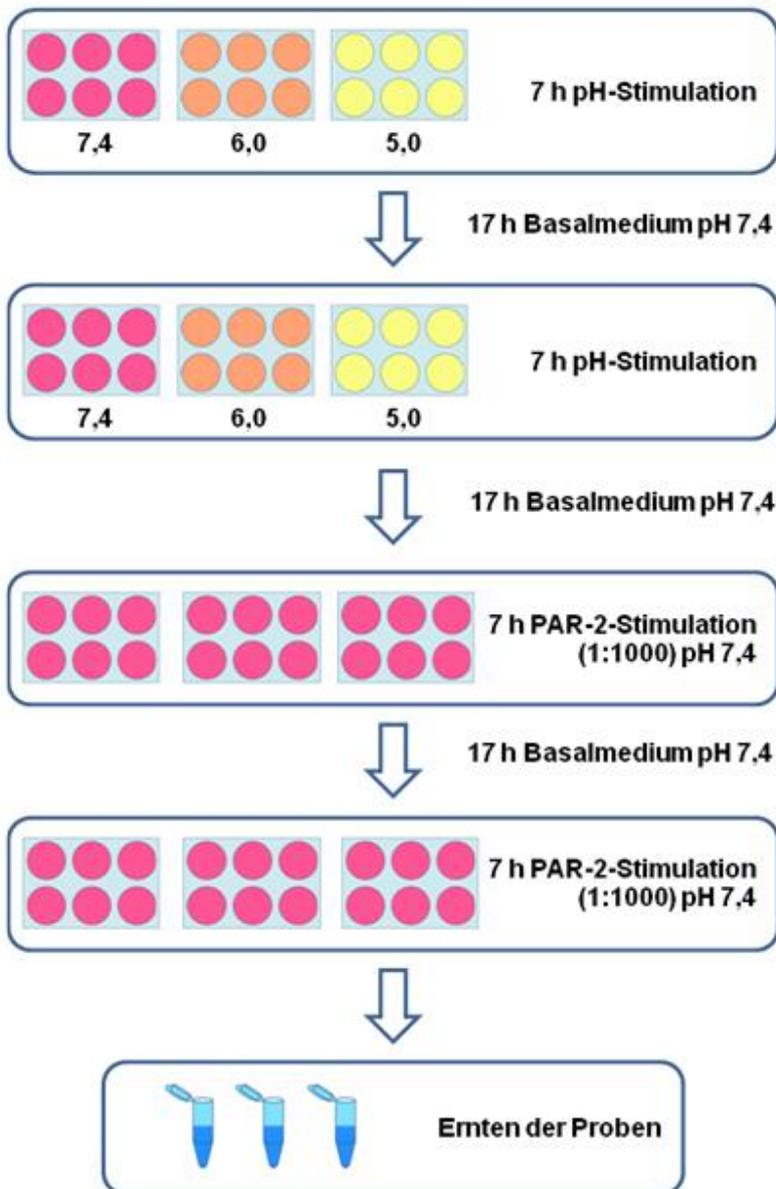


Abbildung 3: Versuchsablauf der sequenziellen Kultivierung mit PAR-2-AP nach wiederholter schwach-saurer Inkubation.

Nach sequenzieller schwach-saurer Inkubation für jeweils sieben Stunden analog zum ersten Teil des Versuchsablaufs schloss sich die wiederholte Kultivierung in pH-neutralem Medium mit Zusatz von PAR-2-AP für jeweils sieben Stunden an. Anschließend wurden die Proben geerntet.

2.5. RNA-Präparation aus Zellpellet

Die RNA-Extraktion begann direkt aus den Wells der Mikrotiterplatten. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 350 μ l β -Mercaptoethanol plus RLT-Puffer (Verhältnis 1:100) für fünf Minuten versetzt. Hierdurch kam es zur Zellyse und Denaturierung von Proteinen und Enzymen und somit zur Inaktivierung vorhandener RNAsen. Anschließend ließ sich das Lysat gut mit einer 1 μ l – Pipette ablösen und in RNase-freie Tubes (*Multi@-SafeSeal@ Tubes, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland*) überführen. Diese wurden verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert beziehungsweise bei - 83°C eingefroren.

Zur anschließenden Reinigung und Extraktion der Gesamt-RNA kam das RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) zum Einsatz. Die aufgetauten Proben wurden jeweils auf eine erste Säule (QIAGEN, QIAshredder™ Mini Spin Column) pipettiert und bei 16.000 x g (Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 2 Minuten zentrifugiert. Hierdurch wurden Zelltrümmer und größere Zellbestandteile entfernt. Nach Zentrifugation wurden je 350 µl 70%-igen absoluten Ethanol zugegeben. Nach kurzem Mischen mittels Vortexer wurden 700µl der Suspension auf eine zweite Säule (QIAGEN, RNeasy Mini Spin Column) gegeben und für 15 sek bei 9.500 x g zentrifugiert. Dieser Schritt sorgte für die Bindung der RNA über Phosphatgruppen an die silica-basierte Säulenmembran. Es schloss sich ein Waschschrift zur Reinigung der RNA an, bei welchem der Säule 350 µl RW1-Waschpuffer zugegeben und diese erneut für 15 sek bei 9.500 x g zentrifugiert wurde. Der Durchlauf wurde verworfen und es folgte ein DNase-Verdau. Dieser diente der Reinigung der Proben von ebenfalls extrahierter DNA. Dafür wurden auf jede Säulenmembran ein Mix aus 5 µl DNase und 35 µl RDD-Puffer pro Säule zugegeben und für 15 – 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer. In zwei weiteren Zyklen wurden jeweils 500 µl RPE-Puffer zugegeben. Durch Zentrifugation bei 9.500 x g für zunächst 15 sek, dann zwei Minuten ließen sich erneut Durchlaufvolumina abzentrifugieren und konnten verworfen werden. Anschließend wurden die Säulen in beschriftete RNase- und DNase-freie Mikroreaktionsgefäßen gestellt. Die Zugabe von 50µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran der Säule und ein anschließendes einminütiges Zentrifugieren bei 9.500 x g ermöglichten die Elution der RNA. Bevor die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung bei -83°C erfolgte, wurden je Probe 5 µl zur photometrischen RNA-Gehalts- und RNA-Integritätsmessung aliquotiert.

Material: RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), QIAshredder™ Mini Spin Column (Qiagen), absolutes Ethanol 70%, 14,3 M β-Mercaptoethanol, nukleasefreie Mikroreaktionsgefäße Multi®-SafeSeal® Tubes (Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Zentrifuge Heraeus Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Die Konzentration der Gesamt-RNA in den Proben wurde photometrisch mit dem GeneQuant™ RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Unter der Prämisse, dass eine

RNA-Konzentration von 40 ng/ml einer optischen Dichte von 1 entspreche, ließ sich anhand des Extinktionskoeffizienten der RNA-Gehalt für jede Probe berechnen.

Die Integrität der RNA ließ sich durch Agarose-Gelelektrophorese im 1%igen TAE-Agarosegel überprüfen. 1g Agarose (*Roti® Agarose für die DNA/RNA-Elektrophorese, Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland*) wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer (20 ml 50 x TAE mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen) gelöst und in einer Mikrowelle kurz zum Aufkochen gebracht. Das flüssige Gel konnte nun in einen 12 cm breiten Gelträger gegossen und ein 20-Well-Kamm zur Schaffung der Geltaschen angebracht werden. Nach etwa zwanzigminütigem Auskühlen des Gels, wurde es in eine horizontale Elektrophoresekammer eingebracht, welche mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war. Die Geltaschen konnten nun mit einem Gemisch aus 5 µl RNA-Aliquot und 3 µl Loading Dye Puffer befüllt werden. Es wurde eine Spannung von 120V für etwa 40 Minuten angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für etwa 30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung [300 ml 1 x TAE-Puffer, 50 µl Ethidiumbromid (*Carl Roth®, Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml)*)] inkubiert. Anschließend erfolgte auf einem Transilluminator (*EASY® Win32, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland*) eine Bestrahlung des Agarosegels mit UV-Licht. Die Strahlung regte das mit der RNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz an. Das Bild der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Banden wurde mit einer Kamera festgehalten und später analysiert. Entscheidend für eine gute RNA-Qualität war hierbei das Darstellen der zwei Banden für die ribosomalen 28S- und 18S-RNA.

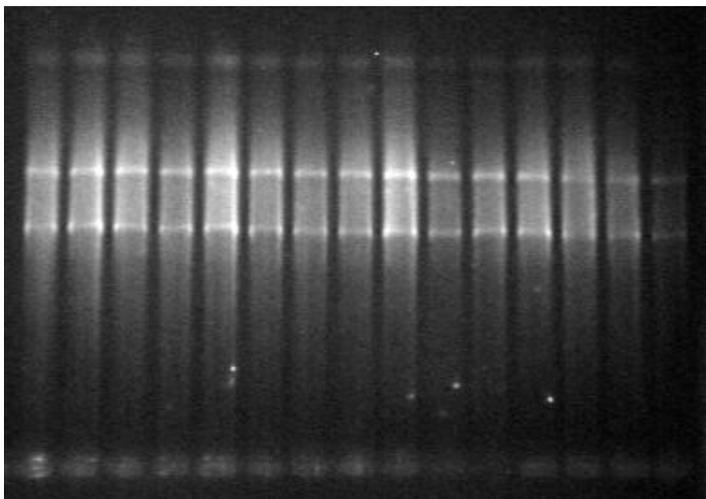


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Auftragung der Gesamt-RNA-Extrakte der Proben.

Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel nach 40 min bei einer Spannung von 120 V, Fluoreszenz von interkalierendem Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht. Darstellung zweier Banden für die ribosomale 28S- und 18 S-RNA.

Material: Agarose (Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 50 x TAE-Puffer [2,0 M Tris Base; 57,1 ml 100%ige Essigsäure; 100 ml 0,5 M Na₂-EDTA (pH 8,0); mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen], Ethidiumbromid (Carl Roth® GmbH), Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml), Loading Dye Puffer (30% Glycerol, 0,25 % Bromphonolblau, 1 x TAE)

2.6. Reverse Transkription der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte anhand eines Standardprotokolls für die AMV-Reverse-Transkriptase (AMV Reverse Transcriptase 10 U/μl, Promega, Madison, Wisconsin, USA). Als Primer dienten Random-Oligonukleotide, welche unspezifisch an die RNA binden. Die gewonnene cDNA stellte die Gesamtheit aller vorhandenen Transkripte der jeweiligen Probe dar. Grundsätzlich wurden 500 ng der Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 40 μl zur reversen Transkription eingesetzt. Abhängig von der zuvor photospektrometrisch ermittelten Konzentration wurde das Volumen mit nukleasefreiem Wasser auf 25,4 μl ergänzt. Aus einem Gemisch folgender Ingredienzien wurden jeder RNA-Probe 14,6 μl zugegeben:

8,0 μl AMV-Reverse-Transkriptase 5X Reaktionspuffer

2,0 μl AMV-Reverse-Transkriptase

1,6 μl dNTP-Mix 10 mM

2,0 μl Random Primer (0,04 A₂₆₀ U/μl)

1,0 μl Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor (40 U/μl)

Die Reverse Transkriptase wurde nach 45-minütiger Inkubation bei 42°C durch fünfminütiges Erwärmen auf 95°C inaktiviert. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 25°C gelagert.

Material: AMV Reverse Transcriptase 10 U/μl (Promega, Madison, Wisconsin, USA), AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer (Promega), dNTP mix 10 mM je Nukleotid (Promega), RNasin® Ribonuclease Inhibitor 40 U/μl (Promega), Primer Random p(dN)₆ 50 A₂₆₀ units (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland), Nukleasefreies Wasser

2.7. RT-PCR-Analyse und relative Quantifizierung der Genexpression

Die quantitative RT-PCR-Analyse wurde unter Nutzung eines iCYCLERs (*Bio-Rad, München, Deutschland*) vollzogen. Im eingesetzten Reaktionsvolumen von 30 μl waren folgende Komponenten enthalten:

15,0 μl	2x QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen)
1,2 μl	cDNA
50 μM	der genspezifischen Primer
13,4 μl	RNase-freies Wasser (ultrapure, PCR-grade)

Bei der Analyse der drei Gene wurde ein identisches PCR-Protokoll verwendet. Auf eine 15-minütige Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase bei 95°C folgten 40 Vervielfältigungszyklen. Eine Sequenz setzte sich aus 15 s „Denaturierung“ (94°C), 30 s „Annealing“ (58°C) und 30 s „Extension“ (72°C) zusammen. Um Konzentrations- und Volumenveränderungen korrigieren zu können, enthielt der PCR-Master-Mix einen passiven Referenzfarbstoff, welcher seine Konzentration und Fluoreszenz während der Analyse beibehält. Er stellte somit eine Messbasis dar, gegenüber welcher die Messergebnisse normalisiert waren. Als Schwellenzyklus C_T (Cycle of threshold) wurde jener Durchlauf bestimmt, bei welchem zum ersten Mal zu ein signifikant höheres Messergebnis detektiert wurde als bei diesem Basiswert. Nach der Delta-Delta- C_T -Methode (Livak & Schmittgen 2001) ließen sich die gemessenen Transkriptgehalte relativ quantifizieren. Da β -Actin als Housekeepinggen nicht reguliert und somit konstant exprimiert wurde, wurde es als Referenzgen verwendet. Alle Messwerte einer Probe wurden somit auf den zugehörigen Wert von β -Actin bezogen. Ermittelt wurden die Expressionsunterschiede durch Einsetzen in folgende Formeln:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$Ratio_{\text{Zielgen} / \text{Referenzgen}} = 2^{-\Delta C_t}$$

Und:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Stimulationsgruppe}} - C_{t \text{ Kontrollgruppe}}$$

$$Ratio_{\text{Stimulationsgruppe} / \text{Kontrollgruppe}} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

5 µl jedes PCR-Produkts wurden zur Amplifikationskontrolle gelelektrophoretisch untersucht.

Es kamen folgende Primer zum Einsatz (in Klammern: Länge des PCR-Produkts):

β-Actin (400 bp) forward: 5'-CAT-GCC-ATC-CTG-CGT-CTG-GAC-C-3'
reverse: 5'-ACA-TGG-TGG-TGC-CGC-CAG-ACA-3'

IL-8 (246 bp) 1: 5'-TTG-AGA-GTG-GAC-CAC-ACT-3'
2: 5'-TGG-CAA-CCC-TAC-AAC-AGA-3'

PAR-2 (196 bp) forward: 5'-CAC-CAT-CCA-AGG-AAC-CAA-TAG-3'
reverse: 5'-AAT-TGG-AAG-GAA-GAC-AGT-GGT-C-3'

Die verwendeten Primer wurden aufgrund der Annealing-Temperatur der enthaltenen Nukleotide ausgewählt. Alle Primer sind zusätzlich so gewählt, dass sie Intron-überspannend sind, was die Amplifikation genomischer DNA-Verunreinigung verhindert. Anhand ihrer Länge ließen sich die PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese den jeweiligen mRNA-Transkripten zuordnen.

Material: *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), jeweils 50 µm der genspezifischen Primer*

2.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Diese erfolgte analog zur bereits beschriebenen gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA-Proben, wurde jedoch in einem 1,8%igen Agarosegel durchgeführt. Zudem wurde zur Identifikation der Amplifikationsprodukte ein DNA-Längenmarker (*Carl Roth®, 100 Bp-DNA Leiter, äquimolar*) aufgetragen.

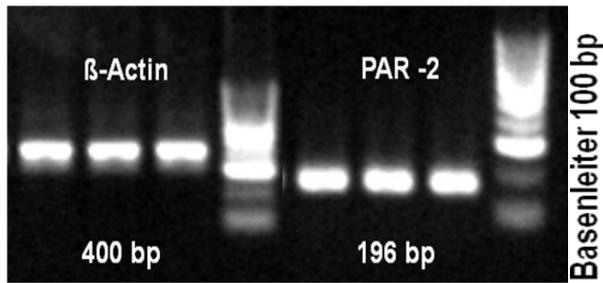


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftragung der Amplifikationsprodukte von β -Actin (400 bp) und PAR-2 (196 bp) Auftrennung in einem 1,8%igen Agarosegel nach 40 Minuten bei einer Spannung von 120 V, Fluoreszenz von interkalierendem Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht

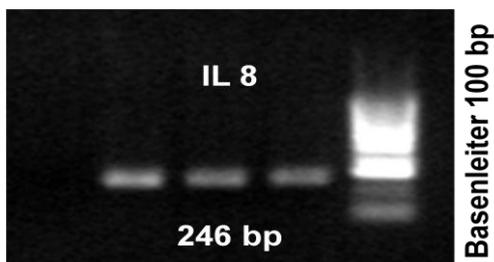


Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftragung der Amplifikationsprodukte von IL-8 (246 bp) Auftrennung in einem 1,8%igen Agarosegel nach 40 Minuten bei einer Spannung von 120 V, Fluoreszenz von interkalierendem Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht. Zur Negativ-Kontrolle wurde in die erste Tasche Aqua dest. gegeben

Material: Agarose (Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 50 x TAE-Puffer, Ethidiumbromid (Carl Roth® GmbH), Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml), Loading Dye Puffer, 100 bp DNA-Leiter, äquimolar (Carl Roth® GmbH)

2.9. Proteinextraktion aus dem Überstand

Mit einer Pipette wurden nach Beendigung der Versuchsabläufe je 500 μ l des Überstands aus den vorgesehenen Wells abgenommen und in 2 ml-Tubes überführt. Diese wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -83°C gelagert.

2.10. Proteinextraktion aus dem Zellpellet

Nachdem zuvor der gesamte Überstand aus den betreffenden Wells entfernt wurde, folgte die Proteinextraktion aus den verbliebenen Zellen. Hierzu wurde in jedes Well 500 μ l Protein-Lysispuffer pipettiert und für etwa fünf Minuten kultiviert. Dies sorgte für eine Zellyse und schützte gleichzeitig die Proteine vor der Proteolyse durch Proteasen. Anschließend konnte das gesamte Lysat durch mehrfaches Ansaugen mit einer 1 ml-Pipette gelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt werden. Nach einer 30-minütigen Lagerung auf Eis wurden die letzten verbliebenen Zellen mittels

Ultraschall (*UP200H, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland*) aufgeschlossen. Bei 16.000 x g für 15 Minuten wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mit diesem abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte eine Lagerung bei -83°C.

Materialien: *Protein-Lysispuffer [50 mM/l HEPES, 150 mM/l NaCl, 1,5 mM/l MgCl₂, 10mM/l Na₄P₂O₇ x 10 H₂O, 5 mM/l EDTA, 1,5% Triton X-100, 10% Glycerin, 4,2g/l NaF, 0,5g/l Na₃VO₄, 1 Tablette/10 ml Puffer complete Mini (Roche, Berlin, Deutschland)]*

2.11. Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde unter Verwendung des *DC™ Protein Assays (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA)* durchgeführt. Es handelte sich hierbei um eine modifizierte Form der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al. 1951). Die quantitative Konzentrationsbestimmung erfolgte nach einem Standardprotokoll für Mikroplatten. Hierzu wurde zunächst durch Zugabe von 20 µl *Reagenz S* je Milliliter *Reagenz A* ein „Arbeitsreagenz“ hergestellt. Für die Erstellung einer Eichkurve wurden fünf Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,0 µg/µl in Dreifachbestimmung gemessen. Als Standardprotein kam hierzu bovines Serumalbumin (10 mg/ml) zum Einsatz. Die Messung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Zunächst wurden je 5 µl der Probe oder des Standards in ein Well einer sauberen, trockenen Mikrotiterplatte gegeben. Auf Zugabe von 25 µl *Arbeitsreagenz* und 200 µl *Reagenz B* folgten 5-sekündiges Schütteln und eine 15-minütige Inkubation der Platte bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Proteinkonzentration durch einen Synergy HT Multidetektionsreader (*BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA*) bei einer Wellenlänge von 750 nm. Bis zum anschließenden ELISA wurden die Proben bei -83°C gelagert.

Materialien: *DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)*

2.12. IL-8-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung des Interleukin-8-Gehaltes in Zellpellet und Überstand kam das ELISA-Kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) *Quantikine® ELISA Human CXCL8/IL-8* (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) zum Einsatz. Es beruhte auf dem sogenannten Sandwich-Prinzip.

Nachdem in jedes Well 100 µl Ansatzverdünnung RD1-85 gegeben wurde, wurden je 50 µl der Leerwerte, der IL-8-Standardreihe (mit Konzentrationen von 0 – 15,6 – 31,25 – 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 – 2000 pg/ml) und der Proben aufgetragen. Auf sicheren Verschluss der Mikrotiterplatten folgte das Binden des IL-8 an die spezifischen monoklonalen Antikörper, mit welchen die Platte beschichtet war. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln folgten vier Waschschriffe mittels Waschapparat (*Hydroflex™, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz*). Pro Zyklus wurde mit je 400 µl Waschpuffer gespült, um alle ungebundenen Probenbestandteile zu entfernen. Nach Entfernen des gesamten Waschpuffers wurde 100 µl humanes IL-8-Konjugat je Well aufgetragen. Dies enthielt einen spezifischen, polyklonalen Antikörper, welcher IL-8 bindet und mit einer Peroxidase konjugiert ist. Es wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auf weitere vier Waschgänge folgte erneut das Entfernen der gesamten Waschlösung. Es wurden je 200 µl Substratlösung (Farbreagenz A und B im Verhältnis 1:1) aufgetragen. Lichtgeschützt folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die ablaufende Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄-Lösung beendet und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser (*Sunrise™, Tecan Group AG*) gemessen.

Eine höhere Genauigkeit wurde durch eine Doppelbestimmung der Standards gewonnen. Die IL-8 Konzentrationen ließen sich nach Abzug des Leerwertes mit Hilfe der Standardkurve ermitteln und wurden gegen die zuvor gemessene Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe normalisiert.

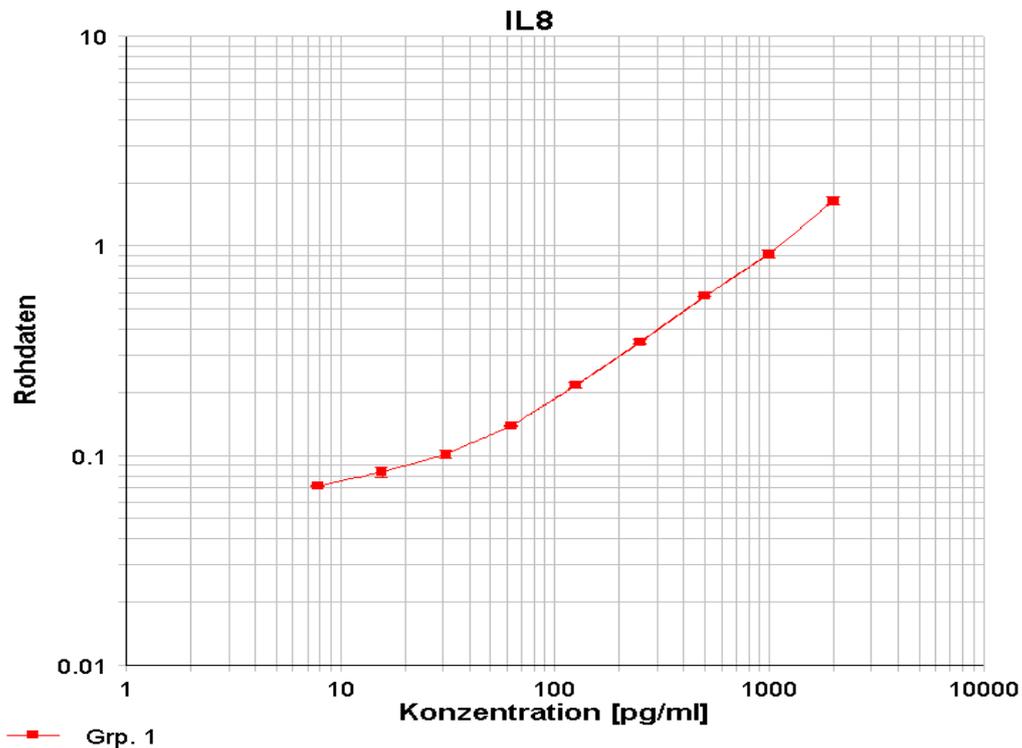


Abbildung 7: Grafische Auftragung der ELISA-Messergebnisse der IL-8-Standardreihe

Dargestellt sind die Rohdaten der ELISA-Messung für die IL-8-Standardreihe für die Konzentrationen 0; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 und 2000 pg/ml. Um eine höhere Genauigkeit zu erzielen erfolgte eine Doppelbestimmung der Standards.

Materialien: *Quantikine® ELISA Human CXCL8/IL-8 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA)*

2.13. PAR-2-Western Blot

Exemplarisch erfolgte die PAR-2-Proteinanalyse mittels Western Blot. Hierfür wurden in drei Versuchsansätzen zunächst HEEpic Zellen wie oben beschrieben ausgesät und bis zum Erreichen eines konfluierenden Zellrasens bei neutralem pH-Wert kultiviert. Nach Erreichen eines konfluierenden Zellrasens erfolgte die wiederholte, kurzzeitige Stimulation der Kulturen mit schwach-sauren Medien (pH5 und pH6) sowie als Kontrolle mit neutralem Medium (pH 7.4) wie oben beschrieben. Nach wiederholter Inkubation mit schwach-sauren Medium wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden einem RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 7,4; 1% NP-40; 0,5% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS; 150mM NaCl; 20mM EDTA) kurz vor Verwendung Phosphatase- (*PhosSTOP™*, Roche Dianostics GmbH, Mannheim, Germany) und

Protease-Inhibitoren (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche*) sowie 5 mM NaF und 2 mM Na₃VO₄ zugegeben.

Pro 10⁶ Zellen wurden nun 100µl des Puffergemisches in die Wells gegeben und das entstehende Lysat mit einer Spritze homogenisiert. Anschließend erfolgte die Lagerung auf Eis für 30 Minuten. Bei 16.000 g und 4°C wurden die gewonnenen Proben für 20 Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand in ein neues Tube überführt, während das Pellet verworfen wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Methode (Bradford 1976) und 30µg des Proteins wurden für die anschließende Elektrophorese aliquotiert.

Mittels SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung der Proteine. Hierzu wurde zunächst das 10%ige Trenngel auf Polyacrylamidbasis gefertigt. Nach Zusammenführen der Komponenten (*Tris-HCl, 1M, pH 8,8; Acryl-Bisacrylamid 40%; SDS 10%; ddH₂O*) erfolgte die Zugabe von 10%igem Ammoniumpersulfat (APS) und des Polymerisationskatalysators TEMED (Tetramethylethylendiamin). Dies wurde mittels Pipette blasenfrei in die Gelkammer übertragen und mit ddH₂O überschichtet. Anschließend polymerisierte das Trenngel.

Vor Zugabe des Sammelgels wurde die Wasserbeschichtung vom Trenngel gegossen und Reste mittels Filterpapier aufgenommen. Zur Sammelgelherstellung wurden TEMED und APS der Trenngel-Stocklösung zugeführt und die Gellösung blasenfrei mittels Pipette in die Gelkammer eingefüllt. Anschließend wurde der Probenkamm eingesetzt und das Gel wurde für die Polymerisation für 30 Minuten ruhen gelassen.

Bei der Probenvorbereitung wurde 20µg Protein Probenpuffer (*SDS 4%; Glycerol 20%; Bromphenol-Blau 0,004%; Tris-HCl, 125mM, pH6,8; β-Mercaptoethanol 10%; ddH₂O*) in einem Verhältnis von 1:3 zugegeben. Für fünf Minuten wurde das Gemisch auf 95°C erhitzt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 16.000 g für eine Minute an. Anschließend wurden die Proben mittels Zusatz von 12,5 µl LD-Puffer und 2%igem Ladepuffer auf 50 µl aufgefüllt.

Das vorbereitete Gel wurde in die Elektrophoresekammer (*TV 100, Biostep GmbH, Burkhardtendorf, Deutschland*) gestellt, die mit SDS-PAGE-Puffer (*Trisbase 25mM; Glycin 0,2 mM; SDS 0,1%; ddH₂O*) komplett befüllt wurde. Der Probenkamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt. Anschließend wurden die Proben und ein Protein-

Standard (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #26634, Thermo Scientific, Massachusetts, USA*) vorsichtig in die Taschen pipettiert.

Als Negativkontrolle fungierte der Probenpuffer ohne Proteinbeimengung. Nun erfolgte die Proteinauftrennung mittels Elektrophorese zunächst bei 80 V für 20 Minuten gefolgt von 100V bis zum Erreichen der Gelgrenze durch die Negativkontrolle.

Vor der Durchführung des Western Blots wurden die Gele für 30 Minuten in Western-Blot-Transferpuffer (*Trisbase 25mM, Glycin 0,2 mM, Methanol 20%, ddH₂O*) bei pH 8,3 inkubiert. Pro Gel wurden ein Stück PVDF-Membran (*PVDF Transfer Membrane, Number 88518, Thermo Scientific*) und vier Stücke Filterpapier zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde zunächst in 100%igem Methanol geschwenkt und dann zusammen mit den Filterpapieren und Schaumstoff für 20 Minuten in Western Blot-Transferpuffer mit 20%igem Methanol eingeweicht.

Dem Gel wurde zunächst anodenseitig die zugeschnittene PVDF-Membran aufgelegt. Eingeasst wurde dies von jeweils zwei Lagen Filterpapier sowie Schaumstoff anoden- sowie kathodenseitig. Anschließend erfolgte das Anlegen einer Spannung von 100 V für zweimal 45 Minuten. Anschließend wurde die Membran auf Eis gekühlt.

Materialien: 50 mM Tris pH 7,4; 1% NP-40; 0,5% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS; 150mM NaCl; 20mM EDTA; PhosSTOP™, Roche Dianostics GmbH, Mannheim, Deutschland; cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche; 5 mM NaF; 2 mM Na₃VO₄; Tris-HCl, 1M, pH 8,8; Acryl-Bisacrylamid 40%; SDS 10%; 10% APS; TEMED; Filterpapier; SDS 4%; Glycerol 20%; Bromphenol-Blau 0,004%; Tris-HCl, 125mM, pH6,8; β-Mercaptoethanol 10%; LD-Puffer; 2% Ladepuffer; Trisbase 25mM; Glycin 0,2 mM; Methanol 20%; PVDF Transfer Membrane, Number 88518, Thermo Scientific; Schaumstoff; Elektrophoresekammer TV 100, Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland; Proteinstandard Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #26634, Thermo Scientific, Massachusetts, USA

Für den Immunoblot schloss sich ein zehnminütiges Waschen der PVDF-Membran bei 20°C in TBST in einem Schüttler an. Es folgte die einstündige Inkubation in einem Blocking-Puffer (*TBST, ddH₂O, Milchpulver 5%*) unter Schütteln. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und die Membranen wurden über Nacht bei 4°C nach Zugabe

der primären Antikörper inkubiert. Zur Verwendung kamen hierbei ein polyklonaler Anti-PAR-2-Antikörper-Cocktail (*rabbit, polyclonal antibody; SP 4476P, Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland, Verdünnung 1:500*) sowie ein Antikörper gegen β -Aktin als Kontrolle (*mouse, monoclonal antibody clone AC-74, A5316, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, Verdünnung 1:10000*). Anschließend folgten drei Waschdurchgänge in TBST für jeweils 15 Minuten in einem Schüttler.

Nun schloss sich die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern (*Peroxidase conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Code Number: 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA, Verdünnung 1:5000*) und (*Anti-Mouse-IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit, Catalog Number A9044, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1:10000*) an, welche mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert sind. Zuletzt erfolgten sechs Waschdurchgänge in TBST von jeweils 15 Minuten.

Mittels Chemilumineszenz wurden nun die entsprechenden HRP-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurde Detektionsreagenz (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA*) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Membran wurde für eine Stunde bei 20°C in der entstandenen Arbeitslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran aus der Lösung genommen und mit ECL-Substrat gleichmäßig überzogen. Die Signaldetektion und digitale Photoerfassung erfolgte im Chemolumineszenz-Imager („*sequential integrated*“, *3 Minuten für PAR2, 30 Sekunden für β -Aktin; Calvin® S 320*). Das Signal für PAR2 wurde bei 50 kDa detektiert, β -Aktin bei 42 kDa.

Materialien: *TBST; Blocking-Puffer (TBST, ddH₂O, Milchpulver 5%); rabbit, polyclonal antibody; SP 4476P, Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland, dilution 1:500; mouse, monoclonal antibody clone AC-74, A5316, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA dilution 1:10000; Peroxidase conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Code Number: 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA, Verdünnung 1:5000) und (Anti-Mouse-IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit, Catalog Number A9044, Sigma-Aldrich, Verdünnung 1:10000; Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA;*

2.14. Auswertung und Statistik

Zur Auswertung erfolgte die Erfassung der Daten in dem Programm Excel 2007 (*Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA*). Zur weiteren Analyse und zum Erstellen der Grafiken wurde die Statistiksoftware GraphPad PRISM Version 6.01 (*GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA*) verwendet.

Als statistisch signifikant wurde für alle durchgeführten Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angesehen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte grundsätzlich zweiseitig. Die ungepaarten und nicht normalverteilten Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test sowie der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) analysiert. Die Untersuchung auf eine mögliche Korrelation der Amplifikationsprodukte von IL-8 und PAR-2 sowie der IL-8-Proteingehalte in Zellpellet und Überstand erfolgte mittels nicht-parametrischer Spearman's-Analyse.

Bei der grafischen Darstellung in *Boxplots* wurden die Kästen durch das obere und untere Quartil begrenzt und durch den Median geteilt (horizontale Linien). Die vertikalen „Whiskers“ geben das 95%-Konfidenzintervall an. Bei der Erstellung der Ablaufgrafiken kam das Programm Powerpoint 2007 (*Microsoft Corporation*) zum Einsatz, zur Verschriftlichung der Arbeit wurde Word 2007 (*Microsoft Corporation*) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des Zellmodells

Durch die zuvor beschriebene Methodik gelang die Etablierung eines epithelialen Zellmodells mit der HEEpiC-Zelllinie. An diesem ließen sich die geplanten Versuche problemlos durchführen. Nach fünf Tagen konnte auf den mit Kollagen Typ I beschichteten Mikrotiterplatten der dafür nötige gleichmäßige und konfluierende Zellrasen erzielt werden. Abbildung 8 zeigt das phasenkontrastmikroskopische Bild der Epithelzellen nach fünftägiger Kultivierung.

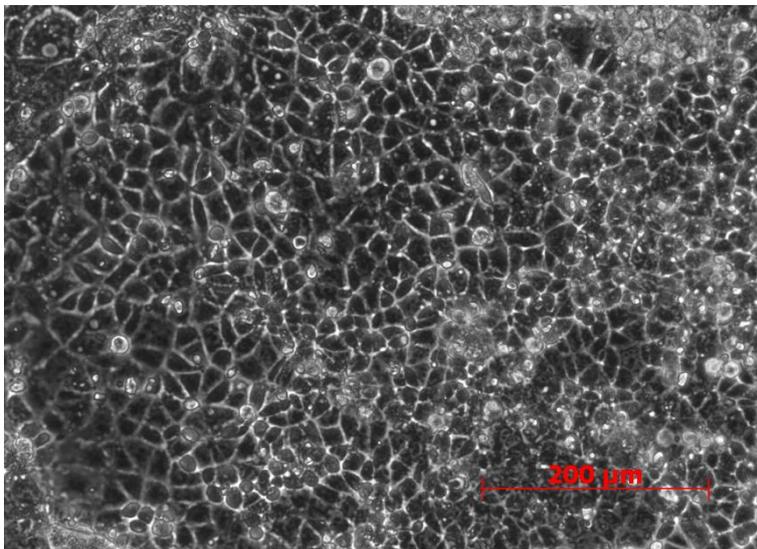


Abbildung 8: Humane ösophageale Epithelzellen HEEpiC in der Kultur.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung bei 100-facher Vergrößerung. Zu sehen ist das typische kopfsteinpflasterartige Relief der epithelialen Zellen mit engen Zellkontakten. (Mikroskop: Axiovert 200m, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)

3.2. Wiederholte Exposition der ösophagealen Epithelzellen mit schwach-saurem Medium

3.2.1. Analyse der PAR-2- und IL-8-Genexpression nach wiederholter pH-Exposition

Die PAR-2- und IL-8-Genexpressionen wurden für jede Probe einzeln bestimmt. Die ermittelten Transkriptmengen wurden dabei in Abhängigkeit des Kulturmediums (pH 5,0; 6,0 und 7,4) verglichen.

Abbildung 9 zeigt den Einfluss wiederholter Stimulation durch schwach-saure Kulturmedien auf die epitheliale PAR2-Genexpression. Die Exposition mit einem pH-Wert von 6,0 führte zu einer 3,6-fach erhöhten Genexpression ($P = 0,0011$). Für pH

5,0 ließ sich gegenüber pH 7,4 keine signifikant erhöhte Genexpression ermitteln (1,6-fach).

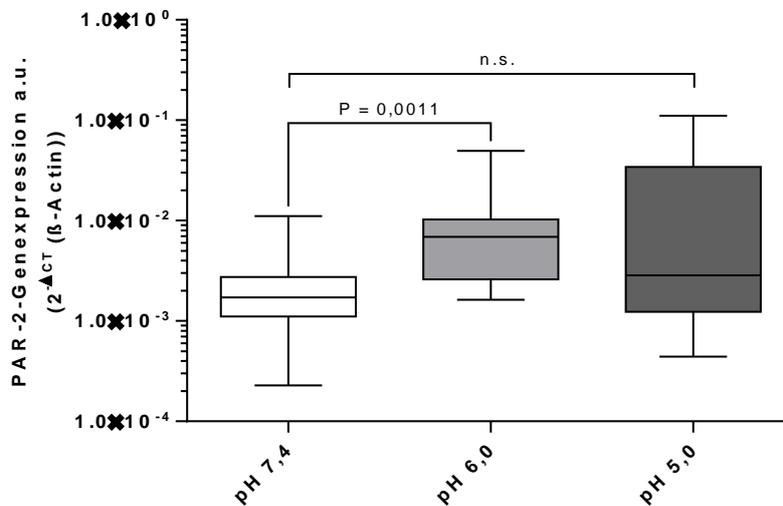


Abbildung 9: PAR-2-Genexpression nach sequentieller pH-Stimulation. Analyse der PAR-2-Genexpression in HEEpIC in Abhängigkeit vom pH-Wert des Zellmediums. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt. Die Box stellt die 25-, 50- und 75-Perzentile dar, die senkrechten Linien repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) und dem Mann-Whitney-U-Test, signifikante Unterschiede sind grafisch mittels des P-Wertes dargestellt.

Die Ergebnisse auf Genexpressionsebene konnten exemplarisch für die Proteinexpression durch Western Blot Analysen bestätigt werden. Analog zeigte sich hier eine höhere PAR-2-Immunoreaktivität nach sequentieller schwach-saurer Inkubation gegenüber pH 7,4 (Abbildung 10).

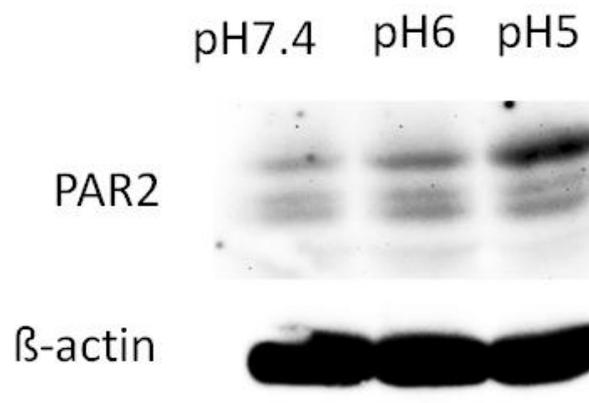


Abbildung 10: PAR-2-Proteinexpression nach sequentieller pH-Stimulation. Chemolumineszenz für PAR-2 und β-Actin nach Western Blot in Abhängigkeit vom pH-Wert des Zellmediums (PAR-2 3 Minuten, 50 kDa; , β-Aktin 30 Sekunden, 42 kDa)

Abbildung 11 dokumentiert die Interleukin-8-Transkriptmengen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums. Gegenüber pH 7,4 zeigten sich signifikant 2,0-fach erhöhte Transkriptmengen für den pH-Wert 6,0 ($P = 0,0344$), für den pH-Wert 5,0 eine 3,3-fach ($P = 0,0472$) erhöhte Genexpression. Die einfaktorielle Varianzanalyse aller Gruppen erbrachte zudem einen tendenziellen Anstieg der IL-8-Genexpression mit sinkendem pH ($P = 0,0379$).

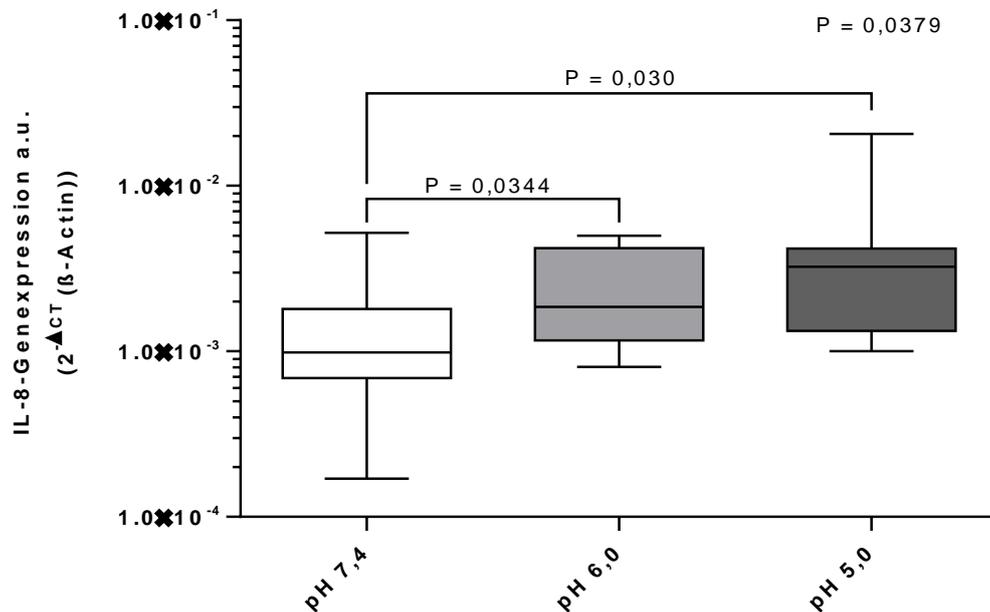


Abbildung 11: Interleukin-8-Genexpression nach sequentieller pH-Stimulation. Analyse der IL-8-Genexpression in der Zelllinie in Abhängigkeit vom pH-Wert des Zellmediums. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt. Die Box stellt die 25-, 50- und 75-Perzentile dar, die senkrechten Linien repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) und dem Mann-Whitney-U-Test, signifikante Unterschiede sind grafisch mittels des P-Wertes dargestellt.

3.2.2. Expression und Freisetzung von Interleukin 8 nach pH-Stimulation

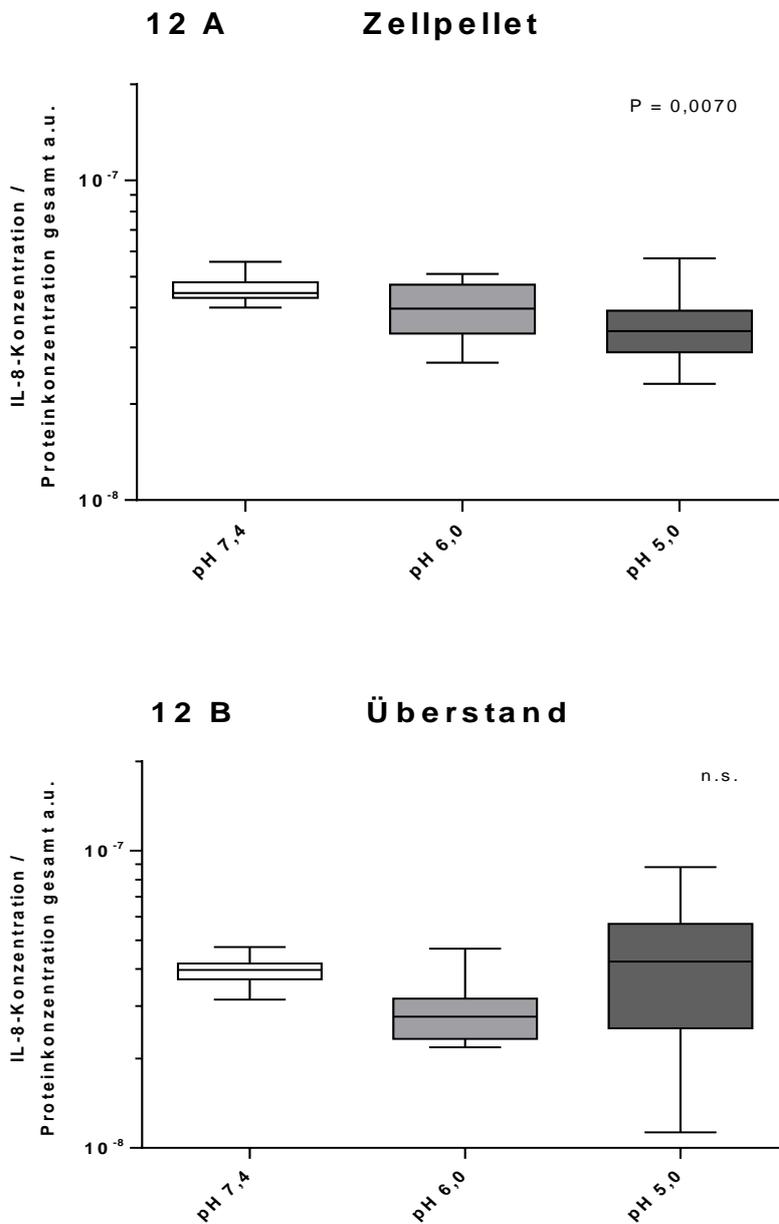


Abbildung 12: Interleukin-8-Proteinkonzentration in Zellpellet und Überstand.

Quantitative Analyse der IL-8-Proteinkonzentration im Zellpellet (12A) bzw. im Überstand (12B) in Abhängigkeit vom pH-Wert des Zellmediums. Die ermittelten Messwerte wurden durch die photometrisch bestimmte Gesamtproteinkonzentration dividiert. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt. Die Box stellt die 25-, 50- und 75-Perzentile dar, die senkrechten Linien repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (one-way ANOVA), signifikante Unterschiede sind grafisch mittels des P-Wertes dargestellt.

Zur Erfassung der Interleukin-8-Synthese wurde der Proteingehalt der Proben aus dem Zellpellet quantitativ mittels ELISA analysiert und in Abhängigkeit zur vorherigen pH-Stimulation verglichen. Um Ungenauigkeiten durch unterschiedliche Zellzahlen der Proben zu vermeiden, wurden die gemessenen Ergebnisse durch die zuvor photometrisch ermittelten Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe dividiert.

Zur Analyse der IL-8-Freisetzung der Zellen wurde analog die Zytokinkonzentration mittels ELISA im Überstand bestimmt.

Abbildung 12A veranschaulicht die Interleukin-8-Proteinkonzentration normiert auf den Gesamtproteingehalt im Zellpellet nach Exposition mit unterschiedlichen pH-Werten. Mit sinkendem pH-Wert ließen sich tendenziell geringere IL-8-Proteinmengen nachweisen.

Abbildung 12B dokumentiert die IL-8-Proteinkonzentration im Überstand. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Interleukin-8-Konzentrationen detektiert werden.

3.3. Effekte sequentieller pH- und PAR-2-Stimulation auf die ösophageale Epithelzelllinie HEEpiC

3.3.1. Biosynthese und Freisetzung von Interleukin 8 nach sequentieller pH- und PAR-2-Stimulation

Die Analyse der Interleukin-8-Proteinkonzentrationen in Zellpellet und Überstand nach pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung erfolgte mittels ELISA.

Abbildung 13 veranschaulicht die Untersuchung der IL-8-Konzentration im Zellpellet (13A) und im Überstand (13B).

Im Zellpellet konnten keine Unterschiede nach dualer Stimulation festgestellt werden.

Dem gegenüber ließ sich im Überstand mittels einfaktorieller Varianzanalyse ein signifikanter Anstieg der IL-8-Sekretion mit sinkendem pH-Wert bei darauffolgender PAR-2-Aktivierung messen.

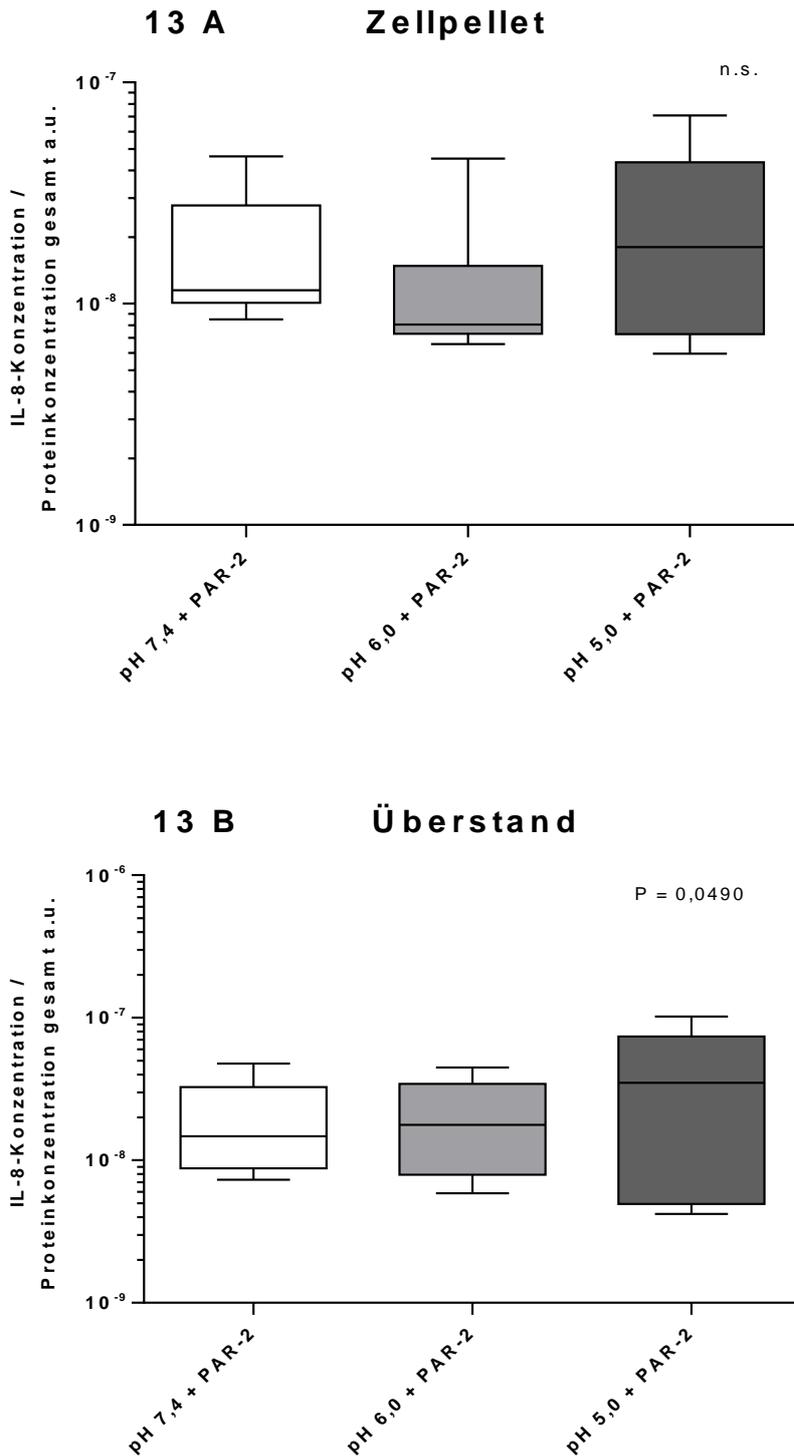


Abbildung 13: Interleukin-8-Proteinkonzentration in Zellpellet und Überstand.

Quantitative Analyse der IL-8-Proteinkonzentration im Zellpellet (13A) und im Überstand (13B) in Abhängigkeit vom pH-Wert des Zellmediums und anschließender PAR-2-Aktivierung. Die ermittelten Messwerte wurden durch die photometrisch bestimmte Gesamtproteinkonzentration dividiert. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt. Die Box stellt die 25-, 50- und 75-Perzentile dar, die senkrechten Linien repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA), signifikante Unterschiede sind grafisch mittels des P-Wertes dargestellt.

3.3.2. Analyse der IL-8-Genexpression nach sequentieller pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung

Analog zum Vorgehen bei alleiniger pH-Stimulation wurden die Genexpressionen von IL-8 und PAR-2 nach sequentieller pH-Stimulation und nachfolgender PAR-2-Aktivierung bestimmt.

Nach der Stimulation durch pH 6,0 und PAR-2-Agonist zeigte sich für IL-8 eine signifikant niedrigere Genexpression gegenüber den Vergleichsgruppen pH 7,4 und PAR-2-Stimulation ($P = 0,0002$) und pH 5,0 und PAR-2-Stimulation ($P < 0,0001$). Diese Unterschiede der IL-8-mRNA-Level sind in Abbildung 14 veranschaulicht.

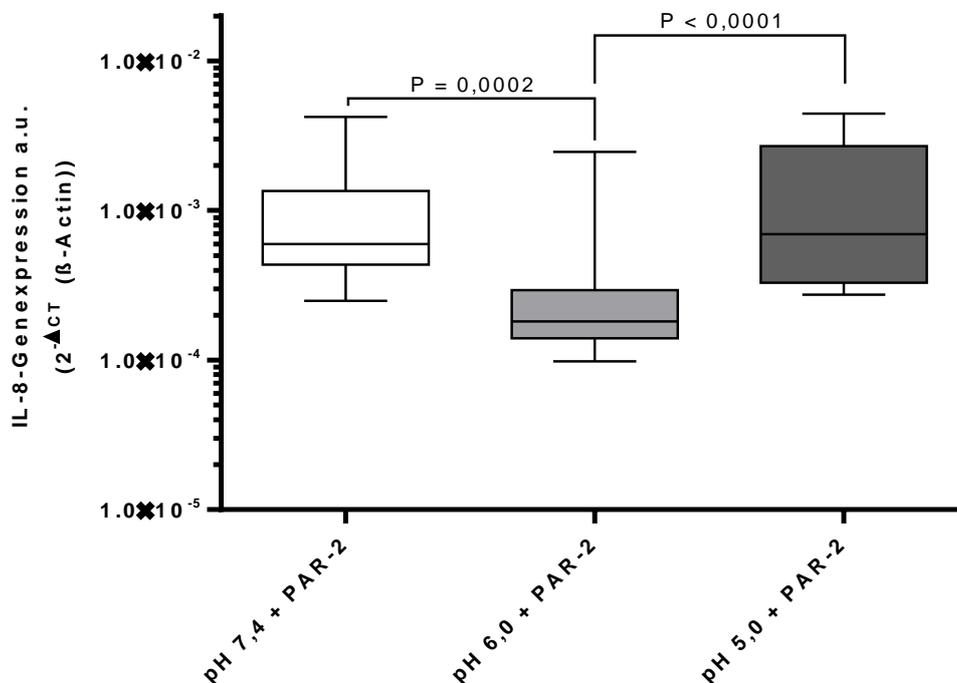


Abbildung 14: Genexpression von IL-8 nach sequentieller pH-Stimulation und PAR-2-Aktivierung. Analyse der Genexpressionen an IL-8 in der Zelllinie in Abhängigkeit vom pH-Wert des Zellmediums und PAR-2-Aktivierung. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt. Die Box stellt die 25-, 50- und 75-Perzentile dar, die senkrechten Linien repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) und dem Mann-Whitney-U-Test, signifikante Unterschiede sind grafisch mittels des P-Wertes dargestellt.

Nach sequentieller pH-Stimulation mit folgender PAR-2-Aktivierung ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der PAR-2-Genexpression zwischen den Gruppen ermitteln (Daten nicht gezeigt).

3.4. Funktionelle Assoziationen

Zur Prüfung einer Assoziation zwischen den Genexpressionen von PAR-2 und IL-8 wurden die jeweiligen Transkriptgehalte gegeneinander aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht-parametrischer Spearman's-Analyse. Es zeigte sich für die wiederholte Exposition mit schwach-saurem Medium eine signifikante Korrelation zwischen der PAR-2- und IL-8- Genexpression (Abbildung 15, $R^2 = 0,8037$, $P < 0,0001$). Auch nach dualer Stimulation durch schwach-saure Inkubation und anschließende PAR-2-Aktivierung mit synthetischem PAR-2-Agonisten fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der IL-8-Genexpression und dem Transkriptgehalt von PAR-2 ($R^2 = 0,3357$, $P < 0,0001$, Daten nicht gezeigt).

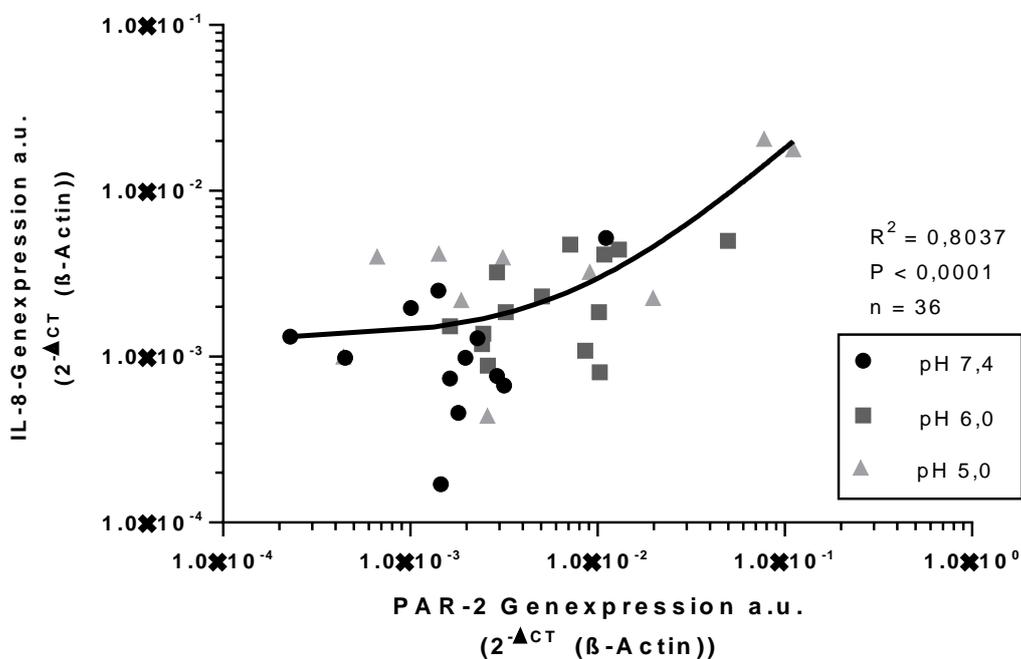


Abbildung 15: Korrelation der IL-8-Genexpression mit den Transkriptgehalten von PAR-2 nach schwach-saurer Inkubation.

Graphische Darstellung der nicht-parametrischen Spearman's-Analyse der IL-8-Genexpression in Bezug auf die Transkriptgehalte an PAR-2 nach alleiniger pH-Stimulation. Punkte stellen Werte nach pH 7,4-, Quadrate nach pH 6,0 und Dreiecke nach pH 5,0-Stimulation dar.

Die mittels ELISA bestimmten IL-8-Proteinkonzentrationen im Zelllysat und im Überstand wurden ebenfalls mittels nicht-parametrischer Spearman's-Analyse auf eine Korrelation geprüft. Dabei konnte kein Zusammenhang für die Proteinlevel im Zellpellet und Überstand nach alleiniger saurer Inkubation ermittelt werden (Abbildung 16A). Nach dualer Stimulation durch saure Medien und synthetisches AP

zeigte sich eine signifikant positive Korrelation für die IL-8-Proteinkonzentration im Zellysate und die Freisetzung des Zytokins in den Überstand (Abbildung 16B, $R^2 = 0,7334$, $P < 0,0001$).

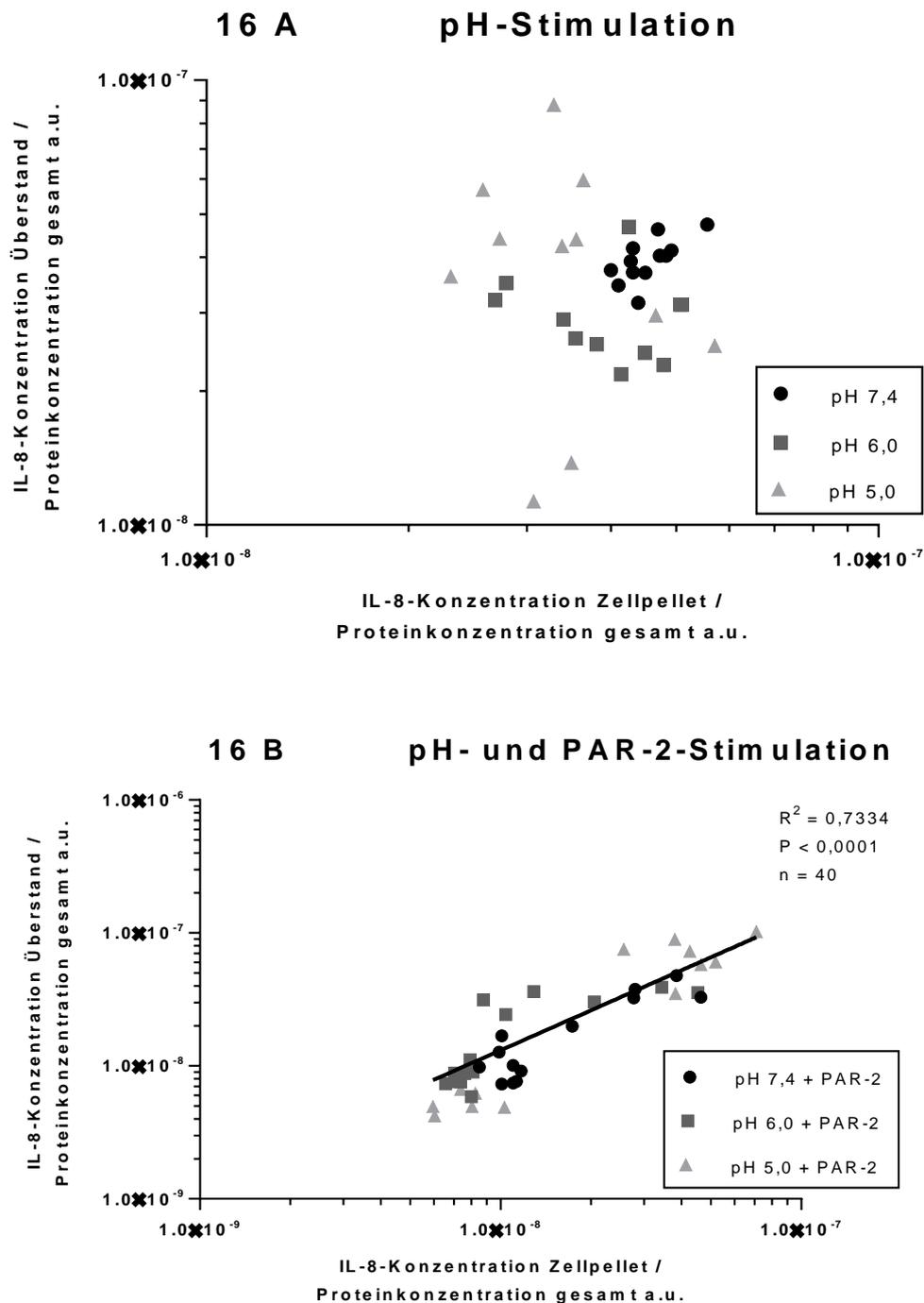


Abbildung 16: Korrelation der IL-8-Proteinkonzentrationen in Zellpellet und Überstand.

Graphische Darstellung der nicht-parametrischen Spearman's-Analyse der IL-8-Proteinkonzentration im Zellysate bezogen auf die IL-8-Freisetzung in den Überstand nach alleiniger pH-Stimulation (Abbildung 16A) bzw. nach pH-Stimulation und nachfolgender PAR-2-Aktivierung (Abbildung 16B). Punkte stellen Werte nach pH 7,4-, Quadrate nach pH 6,0 und Dreiecke nach pH 5,0-Stimulation dar.

4. Diskussion

4.1. Etablierung des Zellmodells

Als Voraussetzung der beschriebenen Experimente gelang die Etablierung eines Zellmodells der menschlichen Speiseröhrenschleimhaut mit der primären Ösophaguszelllinie HEEpiC. Die Verwendung der Epithelzelllinie HEEpiC garantierte dabei die bestmögliche Simulation der in vivo Situation. So fußten die Erkenntnisse einiger früherer Studien teilweise auf Untersuchungen an immortalisierten humanen ösophagealen Zelllinien wie EPC1-hTERT und EPC2-hTERT (Rafiee et al. 2009) oder an Zelllinien aus Barrettadenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Fitzgerald et al. 2002).

Die Kultivierung der HEEpiC erfolgte nach den Anweisungen der vertreibenden *ScienCell™ Research Laboratories* und anhand bestehender Erfahrungen aus Experimenten mit den ösophagealen Tumorzelllinien KYSE-150 und -450. Es resultierte ein Wachstum in dichtem Zellverbund und die Ausbildung eines epithelialen Monolayers. Versuche mit der Zelllinie HEEpiC wurden bereits erfolgreich durchgeführt und publiziert. Dabei wurde die Genexpression proinflammatorischer Zytokine auf saure Inkubation HEEpiC (Rafiee et al. 2009) und durch zusätzliche Zugabe von unkonjugierten Gallensäuren (Yoshida et al. 2006) sowie die Expression und Funktion des PAR-2-Rezeptors auf HEEpiC-Zellen untersucht (Yoshida et al. 2007). Shan und Kollegen veröffentlichten zuletzt ihre Untersuchungen eines air-liquid-interface-Protokolls mit den HEEpiC und somit der Etablierung eines mehrschichtigen Zellmodells der ösophagealen Schleimhaut. Dies ermöglichte die Stimulation und Aktivierung spezifischer Rezeptoren von apikal und basolateral (Shan et al. 2012). Das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell stellt somit einen naturnahen Rahmen für in-vitro-Experimente an einem epithelialen Monolayer mit apikaler Stimulation dar. Es konnte wichtige Erkenntnisse zur Klärung der epithelialen Pathophysiologie der gastroösophagealen Refluxerkrankung liefern.

PAR-2 wird von HEEpiC konstitutiv exprimiert (Yoshida et al. 2007). Unsere Ergebnisse konnten diese Daten reproduzieren. Wir konnten in allen untersuchten Proben eine Genexpression für PAR-2 nachweisen.

4.2. Studiendesign

Im Versuchsaufbau wurden zwei Abschnitte unterschieden. In einem ersten Ansatz wurde der Einfluss wiederholter Exposition mit schwach-sauren Medien auf die proinflammatorische Zytokinantwort der Epithelzellen untersucht. Die Exposition und Inkubation mit Medien bei den pH-Werten 6 und 5 simulierte dabei schwach-saure Refluxepisoden, wie sie in vivo auch unter PPI-Therapie in der Mehrzahl der Patienten auftreten (Hemmink et al. 2008). Als Kontrolle erfolgte die Inkubation unter neutralen Bedingungen bei pH 7,4.

In einem zweiten Ansatz erfolgte nach wiederholter schwach-saurer Exposition die zusätzliche Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 2 unter physiologischem pH. Als Rezeptoragonist wurde das synthetische Peptid SLIGKV-NH₂ verwendet, welches die Aminosäuresequenz des gebundenen Liganden darstellt (Nystedt et al. 1995). Dieses AP weist zwar eine geringere aktivierende Potenz als der natürliche Aktivator Trypsin auf (Al-Ani et al. 2002; Hou et al. 1998), konnte jedoch analog dazu in früheren Publikationen durch Aktivierung des PAR-2 zu einer gesteigerten IL-8-Genexpression und -Proteinproduktion führen (Kandulski et al. 2010; Shan et al. 2012; Yoshida et al. 2007). Auf die Verwendung von Trypsin wurde verzichtet, da es durch die proteolytische Aktivität die Zellen vom kollagenbeschichteten Boden der Wells löst.

Aufgrund der unterschiedlich Designs mit unterschiedlicher Dauer und unterschiedlicher Anzahl an Mediumwechseln wurden die Versuche als getrennte Experimente gewertet. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse war somit nicht möglich.

4.3. Interaktion des gastroösophagealen Refluats mit dem Epithel des Ösophagus in der Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung

Eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der GERD stellt der Kontakt der mukosalen Epithelzellen mit dem Refluat dar. In Tiermodellen konnte eine mukosale Entzündung anhand der Zytokinproduktion der Epithelzellen sowie der Migration von Immunzellen und der mikroskopischen Beurteilung mukosaler Erosionen nach Kontakt der Schleimhaut mit Säure nachgewiesen werden (Goldberg et al. 1969;

Souza et al. 2009). Ein niedriger pH senkt die Impedanz und steigert transepitheliale Flüsse (Farré et al. 2008; Tobey 2001). Diese stellt einen funktionellen Verlust der physiologischen Barriere dar. Strukturell ist dies unter Anderem in histopathologischen Veränderungen begründet. So bewirkt Säure bei gesunden Probanden die Ausbildung von DIS in der Ösophagasmukosa (Farre 2010).

Auf die Exposition mit schwach-sauren Medien wurde bei HEEpiC-Zellen in diesen Untersuchungen eine vermehrte Transkription von Interleukin-8 induziert. In der Literatur finden sich bezüglich der Induktion der IL-8-Genexpression bei Zellen des ösophagealen Epithels uneinheitliche Ergebnisse. So wurden die hier beobachteten Effekte zuvor analog bei Experimenten mit der epithelialen Zelllinie Het-1A gefunden. Schwach-saure Inkubation bei einem pH-Wert von 4,5 für zehn Minuten sorgte für eine Steigerung der IL-8-Genexpression (Rafiee et al. 2009). Kandulski fand nach Exposition der KYSE-450-Zelllinie gegenüber schwach-saurem pH keine Erhöhung der IL-8-Transkripte. Hierbei wurden die Kulturen für jeweils 24 Stunden bei pH-Werten von 5,0; 6,0 und 7,0 inkubiert (Kandulski et al. 2010). Voruntersuchungen an der hier verwendeten HEEpiC-Zelllinie konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Genexpression des proinflammatorischen IL-8 nachweisen, wenn die Zellen einen mehrschichtigen Zellverbund bildeten. Inkubation von HEEpiC-Monolayern für vier Stunden bei pH 6,0 sorgte demgegenüber für eine Steigerung der IL-8-Produktion. Als mögliche Erklärung wird durch den Autoren eine verbesserte epitheliale Barriere des Multilayers gegenüber einwirkende Stressoren diskutiert (Shan et al. 2012). Zuvor hatten bereits Rafiee und Kollegen auf Inkubation von HEEpiC-Monolayern für zehn Minuten unter schwach-sauren Bedingungen einen Anstieg der IL-8-Transkripte detektieren können (Rafiee et al. 2009). Somit decken sich die hier dokumentierten Ergebnisse mit denen bereits publizierter Arbeiten bei insgesamt heterogenen Resultaten und verdeutlichen, dass saure Einflüsse einen entscheidenden Beitrag zur Ausbildung der mukosalen Inflammation bei GERD leisten.

Betrachtet man die Proteinlevel, so fanden sich im Zellpellet signifikant geringere Konzentrationen an Interleukin-8 mit abnehmendem pH-Wert. Im Überstand konnten keine Unterschiede im IL-8-Gehalt zwischen den Inkubationen in unterschiedlich sauren Medium festgestellt werden.

Auch zur IL-8-Produktion und dessen Freisetzung aus Epithelzellen finden sich divergierende Aussagen in der Literatur. Bei Het-1A-Zellen führte die Inkubation bei

pH 4,5 sowohl zu gesteigertem IL-8-Proteinlevel im Zelllysat als auch zu einer verstärkten Freisetzung des Zytokins in den Überstand (Rafiee et al. 2009). Die IL-8-Freisetzung aus den immortalisierten, nonneoplastischen Ösophaguszelllinien NES B3T und B10T wurde durch Exposition mit sauren Medien induziert, allerdings nur bei gleichzeitiger Exposition mit Gallensalzen (Souza et al. 2009). Für die ösophageale Tumorzelllinie KYSE 450 ließ sich keine gesteigerte Konzentration auf schwach-saure Exposition für 24 Stunden im Zellpellet feststellen, die IL-8-Freisetzung war lediglich bei einer Inkubation bei pH 6 erhöht (Kandulski et al. 2010). In einer Vergleichsstudie an der hier verwendeten HEEpiC-Linie durch Shan et al. wurde lediglich der IL-8-Gehalt im Zelllysat untersucht, hierbei jedoch eine saure Reizung von apikal und basolateral unterschieden. Dabei resultierte aus einer Stimulation mit Säure von apikal kein Unterschied in den IL-8-Proteinleveln. Lediglich eine Inkubation bei pH 6 von basolateral sorgte für eine signifikante Steigerung der IL-8-Konzentration. Analog zur Genexpression wähten die Autoren die Erklärung hierfür in einer besseren Barrierefunktion des Multilayers gegen Stimuli von apikal (Shan et al. 2012).

Die in dieser Dissertation untersuchten Monolayer reagierten jedoch auf schwach-saure Reizung mit einem Abfall der IL-8-Konzentration im Zellpellet bei unveränderter Freisetzung des Zytokins. Nach schwach-saurer Exposition konnten für den ersten Schritt der IL-8-Proteinbiosynthese, die Transkription, erhöhte mRNA-Level des Zytokins mit sinkendem pH detektiert werden. Während also die IL-8-Transkription nach schwach-saurer Exposition der HEEpiC die zu erwarteten Ergebnisse lieferte, fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der IL-8-Freisetzung nach alleiniger saurer Exposition der Zellen. Die IL-8-Proteinkonzentrationen im Zellpellet sanken sogar mit sinkendem pH-Wert des Mediums. In dieser Arbeit sorgte saure Exposition somit nicht für eine verstärkte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 sondern lediglich zu einer gesteigerten Genexpression des Zytokins. Als möglichen weiteren Faktor der Immunpathogenese und Initiierung der mukosalen Immunreaktion durch Freisetzung von IL-8 untersuchten wir in der Folge den Einfluss des Protease-aktivierten Rezeptors 2.

PAR-2 wird in der Ösophaguskosa von Patienten mit GERD sowohl bei der erosiven wie der nicht-erosiven Verlaufsform verstärkt exprimiert. Dabei korreliert die PAR-2-Genexpression mit den histopathologischen Veränderungen und mukosalen

IL-8-Transkriptleveln bei Patienten mit GERD. In vitro sorgte saure Inkubation in Versuchen an den KYSE-Zelllinien 150 und 450 für einen erhöhten PAR-2-mRNA-Gehalt (Kandulski et al. 2010).

Wir konnten nach wiederholter, kurzzeitiger Exposition mit einem pH-Wert von 6,0 gegenüber der Kontrolle eine 3,6-fach gesteigerte Genexpression des Rezeptors verzeichnen. Bei Inkubation unter pH 5,0 konnte keine signifikante Steigerung (1,6-fach) der mRNA-Level gegenüber pH 7,4 detektiert werden. Diese Resultate bestätigen Ergebnisse mit anderen Zelllinien (Kandulski et al. 2010). Wir konnten unsere Ergebnisse der PAR2-Genexpression ebenfalls durch die Western Blot Analysen der PAR-2-Proteinlevel bestätigen. Nach schwach-saurer Inkubation fand sich eine höhere PAR-2-Immunreaktivität als unter neutralem pH 7,4.

4.4. Rolle des Protease-aktivierten Rezeptor 2 in der Pathophysiologie von GERD

Protonenpumpeninhibitoren werden in der Therapie der GERD empfohlen und in der klinischen Praxis verbreitet eingesetzt. Durch die Säuresuppression im Magen wird bei bestehendem gastroösophagealen Reflux auch die Säureexposition des distalen Ösophagus reduziert. Das führt zu einer Abheilung bestehender Erosionen im Ösophagus und reduziert die Beschwerden der Betroffenen (Boeckxstaens et al. 2014). Bei unzureichendem Ansprechen auf eine säuresuppressive Therapie mittels PPI in der Standarddosierung wird zunächst die Erhöhung der Dosis empfohlen (Koop et al. 2014).

Da PPI lediglich die Säuresekretion der Belegzellen im Magen, nicht jedoch die pathophysiologisch zugrundeliegenden TSLERs reduzieren, verändert sich unter einer PPI Therapie nicht die Exposition des distalen Ösophagus gegenüber Reflux-episoden und Bestandteilen des Magen und Duodenums insgesamt (Hemmink et al. 2008). Da insbesondere Patienten mit nicht-erosiver Refluxerkrankung in nicht unerheblichen Ausmaß nicht auf eine säuresuppressive Therapie ansprechen (Miner Jr. et al. 2002; Fass 2009; Dean et al. 2004), werden andere Bestandteile im Refluxat für die Pathophysiologie der Refluxerkrankung diskutiert. Proteasen als Bestandteil des Refluxates können zur mukosalen Entzündung und Symptomen bei Patienten mit GERD beitragen (Kono et al. 2006; Naito et al. 2006). Insbesondere die Rolle des

Trypsins und seines Rezeptors PAR-2 wird diskutiert und in dieser Promotionsarbeit herausgearbeitet.

Nach wiederholter Exposition der HEEpiC bei unterschiedlichem pH findet sich eine verstärkte IL-8-Genexpression in den Epithelzellen. Nach darauffolgender PAR-2-Aktivierung unter neutralem pH durch das synthetischen Aktivierungspeptid SLIGKV fand sich eine enge Korrelation zwischen erhöhten Transkriptmengen von PAR-2 und IL-8. Dies stimmt mit den Erkenntnissen überein, welche an Biopsien von GERD-Mukosa gewonnen wurden (Kandulski et al. 2010). Frühere Studien konnten belegen, dass eine Aktivierung von PAR-2 mit AP zu einer verstärkten Genexpression von Interleukin-8 führt (Kandulski et al. 2010; Shan et al. 2012).

Die wiederholte Exposition mit schwach-sauren Kulturmedien führte in dieser Studie zu einer verstärkten PAR-2-Genexpression, während die Expression von IL-8 unverändert blieb. Eine wiederholte Inkubation bei pH 5,0 zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen, die wiederholte Stimulation mit pH 6,0 sogar eine verminderte IL-8-Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bezüglich der Proteinlevel konnten wir keine signifikanten Unterschiede der IL-8-Konzentration im Zelllysat nach saurer Inkubation und nach anschließender Aktivierung von PAR-2 nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen der Studien mit KYSE-Zellkulturen, bei denen ebenfalls die IL-8-Proteinkonzentrationen im Zellpellet unverändert blieben (Kandulski et al. 2010). Shan und Kollegen stellten fest, dass eine basolaterale, nicht jedoch apikale, PAR-2-Aktivierung mittels AP zu einem PAR-2-vermittelten Anstieg der IL-8-Konzentration im Zelllysat von HEEpiC-Multilayern führt. Dies erkläre sich laut der Autoren durch die insbesondere in den basalen Schichten gelegenen Rezeptoren. So konnte basolaterale Stimulation mit dem potenteren Trypsin bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen zu einem Anstieg der Zytokinkonzentration führen als jene von apikaler Seite (Shan et al. 2012).

Als zentrales Ergebnis der vorgelegten Promotionsarbeit zeigte sich die Freisetzung von IL-8 aus den ösophagealen Epithelzellen in das Kulturmedium nach schwach-saurer Inkubation und anschließender PAR-2-Aktivierung. Die Korrelation von IL-8-Proteinkonzentration im Zelllysat und Kulturmedium macht deutlich, dass nach wiederholter Stimulation mit schwach-sauren Medien mit darauffolgender Aktivierung von PAR-2 ein signifikanter Zusammenhang besteht. Dies belegt, dass die PAR-2-

Aktivierung auf Keratinozyten zur Initiierung der mukosalen proinflammatorischen Immunantwort beiträgt. In diesen Details liegen in der internationalen Literatur bisher keine Daten vor. Die Publikationen der eigenen Arbeitsgruppe zu den Versuchen mit KYSE-Zellkulturen konnten in diesem Zusammenhang eine gesteigerte IL-8-Freisetzung nach AP-Stimulation bei neutralem pH gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen (Kandulski et al. 2010).

Die Exposition der Epithelzellen mit schwach-sauren Medien führt zu einer verstärkten PAR-2-Genexpression und -Proteinbiosynthese. Ob diese verstärkt exprimierten Rezeptoren an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wurde im Versuchsaufbau der Promotionsarbeit nicht untersucht. Hierfür wären beispielsweise nachfolgende Versuche mit immunhistologischen oder immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit Darstellung der Rezeptoren notwendig. Diese könnte das Internalisierungs- und Recyclingverhalten der Rezeptoren analysieren und eine mögliche Rolle intrazellulärer Speicher an PAR-2 wie dem Golgi-Apparat untersuchen (Böhm et al. 1996). Ein möglicher Bias der Arbeit liegt in der Verwendung des synthetischen aktivierenden Peptids im Versuchsaufbau. Anders als Trypsin aktiviert AP den Rezeptor nicht durch irreversible proteolytische Abspaltung des Aminoterminus (Nystedt et al. 1994). Nach Aktivierung durch AP müssen die Rezeptoren, daher auch nicht zwingend lysosomal degradiert beziehungsweise re-synthetisiert werden, um als Rezeptor erneut an der Zelloberfläche exprimiert zu werden (Trejo 2003; Pierce & Lefkowitz 2001). Eine Neosynthese durch Transkription und Proteinbiosynthese wäre bei einem Recycling daher nicht nötig.

4.5. Modell zweier entscheidender Schritte in der Pathogenese von GERD - einer primär immunvermittelten Erkrankung

Nachdem die gastroösophageale Refluxerkrankung lange Zeit als Schleimhautverletzung des Ösophagus durch Säure und Proteasen mit anschließender Entzündungsreaktion angesehen wurde, stellte eine Veröffentlichung von Souza et al. einen Paradigmenwechsel im Verständnis der Pathophysiologie von GERD dar. In einem Tiermodell an Ratten fanden sich als erste mukosale Reaktion auf gastroösophagealen Reflux eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, gefolgt von einer Infiltration von Immunzellen. Erst darauf folgten die

GERD-spezifischen histopathologischen Veränderungen BZH und PE und zuletzt resultierte eine Erosion der ösophagealen Schleimhaut. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellten sie die Hypothese von GERD als primär immunvermittelte Erkrankung mit nachfolgenden Veränderungen der Ösophagasmukosa auf (Souza et al. 2009). Die Epithelzellen der ösophagealen Schleimhaut stellen dabei die primäre Zelle der Immunreaktion mit Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine dar (Isomoto et al. 2004; Isomoto et al. 2003; Yoshida et al. 2007; Rieder et al. 2007; Mönkemüller et al. 2009).

In der vorliegenden Studie führte die Exposition der HEEpiC mit Säure zu einer gesteigerten IL-8-Transkription. Ebenfalls nahm die Genexpression und Protein-Immunreaktivität des Protease-aktivierten Rezeptors 2 bei niedrigerem pH zu. In einem zweiten Schritt führte die Aktivierung des verstärkt exprimierten PAR-2-Rezeptors zu einer gesteigerten IL-8-Freisetzung aus den Epithelzellen, welche eng mit den IL-8-Proteinleveln im Zelllysate korrelierte.

Wir wussten bereits zuvor, dass die Aktivierung von PAR-2 zu einer verstärkten IL-8-Produktion und -Freisetzung führt (Hou et al. 1998; Kandulski et al. 2010; Shan et al. 2012). Die Resultate dieser Dissertationsarbeit suggerieren nun ein neues Modell von zwei entscheidenden Schritten in der PAR-2-vermittelten Inflammation bei GERD. Zunächst führt die Exposition gegenüber Säuren zu einer gesteigerten Genexpression und auch Proteinbiosynthese des PAR-2. In einem zweiten Schritt bewirkt eine Aktivierung der hochregulierten Rezeptoren eine verstärkte proinflammatorische Antwort durch gesteigerte IL-8-Freisetzung (Abbildung 17).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse fügen sich gut ein in die Hypothese, dass der gastroösophagealen Refluxkrankheit eine zytokinvermittelte Entzündungsreaktion mit der Epithelzelle als primärer Zelle der Immunpathogenese zugrunde liegt: Saure und schwach-saure Refluxepisoden sorgen für eine Induktion der PAR-2-Synthese. Eine Aktivierung der Rezeptoren durch luminale Proteasen wie Trypsin induzieren dann die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-8 aus der ösophagealen Epithelzelle. Als potenter chemotaktischer Wirkstoff sorgt IL-8 für eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten und initiiert somit die Inflammation der Ösophagusschleimhaut.

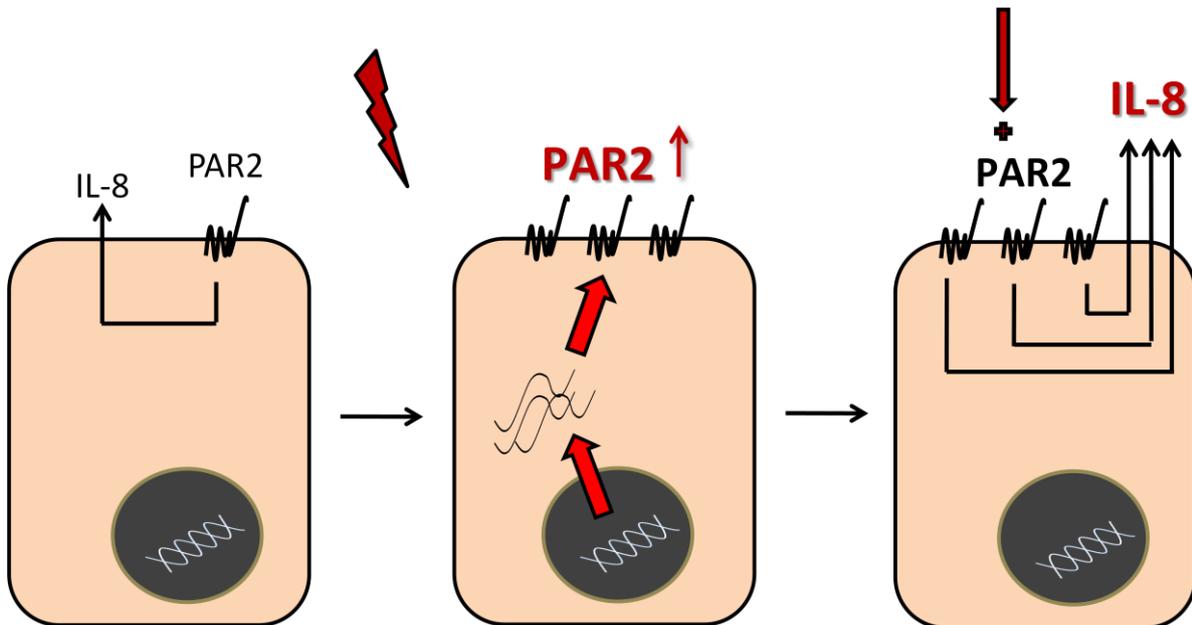


Abbildung 17: Schematischer Ablauf der PAR-2-vermittelten IL-8-Freisetzung bei GERD.

Ein Kontakt der ösophagealen Epithelzelle zu Säure sorgt in einem ersten Schritt für eine Hochregulation des Protease-aktivierten Rezeptors 2. Auf Aktivierung des PAR-2 folgt in einem zweiten Schritt eine verstärkte Freisetzung des proinflammatorischen Interleukin-8. (modifiziert nach Kandulski et al., Model of Two important Steps in GORD pathogenesis: Impact of acidic pH and Protease-activated receptor-2 (PAR2) on mucosal IL-8 Secretion. Vortrag auf der UEG Week, 18. - 22.10.2014, Wien, Österreich)

4.6. Ausblick und klinische Ansätze

Die in dieser Studie hervorgebrachten Resultate verdeutlichen die Rolle des Protease-aktivierten Rezeptors 2 in der Pathogenese von GERD. Das verwendete HEEpiC-Zellmodell stellte zudem einen guten Rahmen zur Untersuchung der pathogenetischen Vorgänge dar. Es kann daher uneingeschränkt zur Durchführung weiterer Untersuchungen empfohlen werden.

In folgenden Arbeiten sollten dabei insbesondere Versuche mit simultaner Säurereizung und PAR-2-Aktivierung durchgeführt und die Ergebnisse jenen nach sequentieller Stimulation, alleiniger saurer Inkubation und alleiniger PAR-2-Aktivierung gegenübergestellt werden. Erweitert werden sollte die Analyse dabei insbesondere um einen PAR-2-ELISA, welcher auf Proteinebene die Folgen der gesteigerten PAR-2-Genexpression und –Immunoreaktivität im Western Blot quantitativ nachvollziehen könnte. Immunhistochemisches Anfärben des Rezeptors zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuche würde weitere Aufschlüsse über das Internalisierungsverhalten von PAR-2 gewähren und könnte möglicherweise klären, warum nach saurer Inkubation Unterschiede in der Genexpression auftreten, nicht jedoch nach dualer Stimulation.

Ein Ausweiten der Analyse auf zusätzliche PAR-2-Hemmversuche würde darüber hinaus Aufschlüsse über den Beitrag des Rezeptors an der GERD-Pathogenese liefern. So konnte bereits durch Proteaseinhibitoren oder den Rezeptor blockende Antikörper der auf die Rezeptoraktivierung folgende Einstrom von Kalzium in die Zelle gehemmt werden (Yoshida et al. 2007; Jacob et al. 2005; Corvera et al. 1999).

Diese Erkenntnisse könnten als Grundlage für die spätere Entwicklung einer am Protease-aktivierten Rezeptor 2 angreifenden GERD-Medikation dienen. Solche Medikamente wären als Add-On zur Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren künftig denkbar. Hierbei käme insbesondere eine topische Anwendung im Ösophagus in Frage, da der Rezeptor in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert wird und dabei an verschiedensten Regulationsmechanismen beteiligt sein könnte (Nystedt et al. 1995; Oikonomopoulou et al. 2006). Des Weiteren sollte beachtet werden, dass eine mögliche Proteaseinhibition die intestinale Verdauung von Proteinen nicht beeinträchtigen darf.

5. Zusammenfassung

Der Protease-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) ist an der Entstehung und Aufrechterhaltung diverser Entzündungen beteiligt. Seine Aktivierung wird als ein relevanter Faktor der mutmaßlich der gastro-ösophagealen Refluxerkrankung (GERD) zugrunde liegenden Immunopathogenese erachtet. In der Speiseröhrenschleimhaut betroffener Patienten wurden sowohl eine verstärkte Genexpression von PAR-2 als auch erhöhte Transkriptgehalte und Proteinlevel des proinflammatorischen Botenstoffs Interleukin-8 (IL-8) detektiert.

Die vorliegende Dissertation beleuchtet die Rolle sauren pH-Werts und der nachfolgenden PAR-2-Aktivierung auf die Entstehung der mukosalen Inflammation bei GERD. Hierzu erfolgte die Etablierung eines in-vitro-Modells mit humanen ösophagealen Epithelzellen (HEEpiC). Die Inkubation für fünf Tage in mit Kollagen Typ I beschichteten Six-Well-Platten erzeugte einen dichten epithelialen Monolayer. In einer ersten Sequenz wurden die Zellen sequentiell für sieben Stunden bei unterschiedlichem pH (7,4; 6,0 oder 5,0) inkubiert, gefolgt von einem 17-stündigen Bedecken mit neutralem Basalmedium (pH 7,4) für eine Gesamtzeit von 31 Stunden. In einem zweiten Versuch schloss sich an die beschriebene saure Stimulation eine 17-stündige Inkubation in Basalmedium an. Anschließend folgte eine sequentielle PAR-2-Stimulation mit dem synthetischen Aktivierungspeptid SLIGKV-NH₂ bei pH 7,4 für sieben Stunden analog zur sauren Inkubation für eine Gesamtzeit von 31 Stunden. An die Probenernte schloss sich eine quantitative RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression von PAR-2 und IL-8 an. Ein IL-8-ELISA analysierte die Konzentrationen des proinflammatorischen Botenstoffs im Zelllysat und im Überstand. Mittels Western-Blot erfolgte der PAR-2-Proteinnachweis nach saurer Stimulation. Insgesamt konnten 161 PCR- und 157 ELISA-Proben gewonnen und untersucht werden

Die Untersuchungen zeigten eine gesteigerte PAR-2-Genexpression nach Stimulation mit saurem pH (pH 6,0: 3,6-fach; pH 5,0: 1,6-fach, nicht signifikant). Mittels Western-Blot gelang der Nachweis einer steigenden PAR-2-Immunoreaktivität nach saurer Stimulation. Auch die IL-8-Transkriptmengen zeigten steigende Werte mit sinkendem pH (pH 6,0: 2-fach; pH 5,0: 3,3-fach). Allerdings zeigte die quantitative IL-8-Proteinbestimmung keine gesteigerten Messwerte im Überstand und sogar eine abfallende Konzentration bei sinkenden pH-Werten im Zelllysat. Die zusätzliche

PAR-2-Stimulation nach sequentieller saurer Inkubation führte zu einer gesteigerten Interleukin-8-Freisetzung in den Überstand mit sinkendem pH, während die IL-8-Spiegel im Zellpellet sich nicht signifikant unterschieden. Hierbei fand sich eine enge Korrelation der IL-8-Proteinlevel im Überstand und Zelllysat.

Zusammenfassend legt die Dissertation die Effekte von Säure und PAR-2-Aktivierung auf die Entstehung der gastroösophagealen Refluxkrankheit dar. Der Pathogenese von GERD als primär immunvermittelte Erkrankung mit der ösophagealen Epithelzelle als primärer Zelle der Immunreaktion scheint dabei ein Zwei-Schritt-Mechanismus zugrunde zu liegen. Der Kontakt der Epithelzellen zu Säure sorgt in einem ersten Schritt für eine gesteigerte Transkription von PAR-2 und IL-8 mit erhöhter PAR-2-Protein-Anfärbbarkeit im Western-Blot. Eine anschließende Stimulation der hochregulierten PAR-2 bedingt daraufhin die Freisetzung des entzündungsfördernden Botenstoffs. Das entstehende proinflammatorische Zytokinmilieu sorgt für ein Einwandern von Immunzellen und initiiert somit die mukosale Inflammation.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Ani, B. et al., 1999. Proteinase activated receptor 2: Role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation. *British journal of pharmacology*, 128(5), pp.1105–1113.
- Al-Ani, B., Wijesuriya, S.J. & Hollenberg, M.D., 2002. Proteinase-activated receptor 2: differential activation of the receptor by tethered ligand and soluble peptide analogs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302(3), pp.1046–1054.
- Altomare, A. et al., 2012. Platelet-activating factor and distinct chemokines are elevated in mucosal biopsies of erosive compared with non-erosive reflux disease patients and controls. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(10), pp.943–e463.
- Ates, F. et al., 2015. Mucosal Impedance Discriminates GERD From Non-GERD Conditions. *Gastroenterology*, 148(2), pp.334–343.
- Ayoub, M.A. & Pin, J.-P., 2013. Interaction of Protease-Activated Receptor 2 with G Proteins and β -Arrestin 1 Studied by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Frontiers in endocrinology*, 4.
- Baggiolini, M., Walz, A. & Kunkel, S.L., 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 84(4), pp.1045–9.
- Bjorkman, E.V.C. et al., 2013. Esophageal barrier function and tight junction expression in healthy subjects and patients with gastroesophageal reflux disease: functionality of esophageal mucosa exposed to bile salt and trypsin in vitro. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 48(10), pp.1118–1126.
- Boeckxstaens, G. et al., 2014. Symptomatic reflux disease: the present, the past and the future. *Gut*, 63(7), pp.1185–93.
- Boeckxstaens, G.E. & Smout, A., 2010. Systematic review: role of acid, weakly acidic and weakly alkaline reflux in gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 32(3), pp.334–43.

- Böhm, S.K. et al., 1996. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *The Journal of biological chemistry*, 271(36), pp.22003–22016.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Bredenoord, a J., Weusten, B.L. a M. & Smout, a J.P.M., 2005. Symptom association analysis in ambulatory gastro-oesophageal reflux monitoring. *Gut*, 54(12), pp.1810–1817.
- Bredenoord, A.J. et al., 2006. Determinants of perception of heartburn and regurgitation. *Gut*, 55(3), pp.313–8.
- Castell, D.O. et al., 2002. Esomeprazole (40 mg) compared with lansoprazole (30 mg) in the treatment of erosive esophagitis. *The American journal of gastroenterology*, 97(3), pp.575–583.
- Cenac, N. et al., 2002. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *The American journal of pathology*, 161(5), pp.1903–1915.
- Chin, A.C. et al., 2008. Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(8), pp.5702–5710.
- Coelho, A.-M. et al., 2002. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*, 122(4), pp.1035–1047.
- Compton, S.J. et al., 2001. Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *British journal of pharmacology*, 134(4), pp.705–718.
- Corvera, C.U. et al., 1999. Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *The Journal of physiology*, 517 (Pt 3, pp.741–756.

- Cottrell, G.S. et al., 2004. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *The Journal of biological chemistry*, 279(14), pp.13532–13539.
- Dai, Y. et al., 2004. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(18), pp.4293–9.
- Dean, B.B. et al., 2004. Effectiveness of proton pump inhibitors in nonerosive reflux disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2(8), pp.656–64.
- Dent, J., 2010. Accuracy of the diagnosis of GORD by questionnaire, physicians and a trial of proton pump inhibitor treatment: the Diamond Study. *Gut*, 59, pp.714–721.
- Dent, J., 2008. Pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and novel options for its therapy. *Neurogastroenterology and Motility*, 20(SUPPL. 1), pp.91–102.
- Déry, O. et al., 1999. Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), pp.18524–18535.
- El-Serag, H.B. et al., 2014. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, 63(6), pp.871–80.
- Farre, R., 2010. Acid and weakly acidic solutions impair mucosal integrity of distal exposed and proximal non-exposed human oesophagus. *Gut*, 59, pp.164–169.
- Farré, R. et al., 2008. Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. *Gut*, 57(10), pp.1366–74.
- Fass, R., 2009. Proton pump inhibitor failure--what are the therapeutic options? *The American journal of gastroenterology*, 104 Suppl , pp.S33–8.

- Fass, R. et al., 2000. The omeprazole test is as sensitive as 24-h oesophageal pH monitoring in diagnosing gastro-oesophageal reflux disease in symptomatic patients with erosive oesophagitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(4), pp.389–396.
- Ferguson, S.S. et al., 1998. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life sciences*, 62(17-18), pp.1561–1565.
- Fitzgerald, R.C. et al., 2002. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut*, 50(4), pp.451–459.
- Fletcher, J. et al., 2001. Unbuffered highly acidic gastric juice exists at the gastroesophageal junction after a meal. *Gastroenterology*, 121(4), pp.775–83.
- Fox, M.R. et al., 2011. The Mechanism of Reflux Suppression by Alginates Assessed by Magnetic Resonance Imaging and Manometry. *Gastroenterology*, 140(5), p.S–576–S–577.
- Francis, D.O. et al., 2013. High economic burden of caring for patients with suspected extraesophageal reflux. *The American journal of gastroenterology*, 108(6), pp.905–11.
- Galmiche, J.P., 2011. Laparoscopic antireflux surgery vs esomeprazole treatment for chronic GERD: the LOTUS randomized clinical trial. *JAMA*, 305, pp.1969–1977.
- Gardell, L.R. et al., 2008. Identification and characterization of novel small-molecule protease-activated receptor 2 agonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 327(3), pp.799–808.
- Goldberg, H.I. et al., 1969. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*, 56(2), pp.223–30.
- Gunji, T. et al., 2011. Risk factors for erosive esophagitis: A cross-sectional study of a large number of Japanese males. *Journal of Gastroenterology*, 46(4), pp.448–455.

- Hamaguchi, M., 2003. Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion*, 68, pp.189–197.
- Hampel, H., Abraham, N.S. & El-Serag, H.B., 2005. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann. Intern. Med.*, 143(3), pp.199–211.
- Hemmink, G.J.M. et al., 2008. Esophageal pH-impedance monitoring in patients with therapy-resistant reflux symptoms: “on” or “off” proton pump inhibitor? *The American journal of gastroenterology*, 103(10), pp.2446–2453.
- Hopwood, D., Milne, G. & Logan, K.R., 1979. Electron microscopic changes in human oesophageal epithelium in oesophagitis. *J. Pathol.*, 129, pp.161–167.
- Hou, L. et al., 1998. Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology*, 94(3), pp.356–362.
- Inci, K. et al., 2009. Expression of protease-activated-receptor 2 (PAR-2) in human esophageal mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 44(6), pp.664–671.
- Ismail-Beigi, F., Horton, P.F. & Pope, C.E., 1970. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology*, 58(2), pp.163–74.
- Isomoto, H. et al., 2003. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. *The American journal of gastroenterology*, 98(3), pp.551–556.
- Isomoto, H. et al., 2004. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. *The American journal of gastroenterology*, 99(4), pp.589–97.
- Isomoto, H. et al., 2007. Immune and Inflammatory Responses in GERD and Lansoprazole. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 41(2), pp.84–91.

- Jacob, C. et al., 2005. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *The Journal of biological chemistry*, 280(36), pp.31936–31948.
- Jacobson, B.C. et al., 2006. Body-mass index and symptoms of gastroesophageal reflux in women. *N. Engl. J. Med.*, 354, pp.2340–2348.
- Kahrilas, P.J. et al., 2012. Regurgitation Is Less Responsive to Acid Suppression Than Heartburn in Patients With Gastroesophageal Reflux Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(6), pp.612–619.
- Kahrilas, P.J. et al., 2013. The acid pocket: a target for treatment in reflux disease? *Am J Gastroenterol*, 108(January), pp.1058–1064.
- Kahrilas, P.J., Boeckxstaens, G. & Smout, A.J.P.M., 2013. Management of the patient with incomplete response to PPI therapy. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 27(3), pp.401–414.
- Kanazawa, Y. et al., 2003. Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease. *World journal of gastroenterology : WJG*, 9(12), pp.2801–4.
- Kandulski, a, Malfertheiner, P. & Weigt, J., 2013. [Modern diagnostic tools for esophageal pathologies]. *Der Internist*, 54(3), pp.279–86.
- Kandulski, A. et al., 2013. GERD assessment including pH metry predicts a high response rate to PPI standard therapy. *BMC gastroenterology*, 13, p.12.
- Kandulski, A. et al., 2013. Histomorphological differentiation of non-erosive reflux disease and functional heartburn in patients with PPI-refractory heartburn. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 38(6), pp.643–51.
- Kandulski, A. et al., 2010. Proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *The American journal of gastroenterology*, 105(9), pp.1934–1943.

- Kandulski, A. & Malfertheiner, P., 2012. Gastroesophageal reflux disease--from reflux episodes to mucosal inflammation. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(1), pp.15–22.
- Katz, P.O., Gerson, L.B. & Vela, M.F., 2013. Guidelines for the Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(3), pp.308–328.
- Katz, P.O., Scheiman, J.M. & Barkun, A.N., 2006. Review article: acid-related disease--what are the unmet clinical needs? *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23 Suppl 2, pp.9–22.
- Koelz, H.R., Blum, A.L. & Modlin, I.M., 2003. Costs of gerd: facts and fiction. *Gastroenterology*, 125, pp.981–982.
- Kono, K. et al., 2006. Trypsin activity and bile acid concentrations in the esophagus after distal gastrectomy. *Digestive diseases and sciences*, 51(6), pp.1159–1164.
- Koop, H. et al., 2014. S2k-Leitlinie: Gastroösophageale Refluxkrankheit unter Federführung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 52(11), pp.1299–1346.
- Kulig, M., 2003. Quality of life in relation to symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease-- an analysis based on the ProGERD initiative. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 18, pp.767–776.
- Kulig, M. et al., 2004. Risk factors of gastroesophageal reflux disease: Methodology and first epidemiological results of the ProGERD study. *Journal of Clinical Epidemiology*, 57(6), pp.580–589.
- Labenz, J., 2006. Prospective follow-up data from the ProGERD study suggest that GERD is not a categorical disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 101, pp.2457–2462.
- Laporte, S. a et al., 1999. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), pp.3712–3717.

- Lee, Y.-C. et al., 2009. The effect of metabolic risk factors on the natural course of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut*, 58(2), pp.174–81.
- Lin, H. et al., 2013. Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews*, 65(4), pp.1198–1213.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*, 25(4), pp.402–408.
- Lowry, O.H. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–275.
- Lundell, L.R. et al., 1999. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut*, 45(2), pp.172–180.
- Mainie, I. et al., 2006. Acid and non-acid reflux in patients with persistent symptoms despite acid suppressive therapy: a multicentre study using combined ambulatory impedance-pH monitoring. *Gut*, 55(10), pp.1398–1402.
- Malferteiner, M. V et al., 2010. [Bronchopulmonary manifestations of gastroesophageal reflux disease]. *Der Internist*, 51 Suppl 1, pp.246–54.
- Malferteiner, P. et al., 2012. Evolution of gastro-oesophageal reflux disease over 5 years under routine medical care - The ProGERD study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35(1), pp.154–164.
- Miner Jr., P. et al., 2002. Rabeprazole in nonerosive gastroesophageal reflux disease: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol*, 97(6), pp.1332–1339.
- Mittal, R.K. et al., 1995. Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology*, 109(2), pp.601–10.
- Modlin, I.M. et al., 2009. Diagnosis and management of non-erosive reflux disease - The vevey NERD consensus group. *Digestion*, 80(2), pp.74–88.

- Monaco, L. et al., 2009. Prevalence of bile reflux in gastroesophageal reflux disease patients not responsive to proton pump inhibitors. *World journal of gastroenterology*, 15(3), pp.334–8.
- Mönkemüller, K. et al., 2009. Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease. *Digestion*, 79(3), pp.186–95.
- Mukaida, N., 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 284(4), pp.L566–77.
- Naito, Y. et al., 2006. Role of pancreatic trypsin in chronic esophagitis induced by gastroduodenal reflux in rats. *Journal of gastroenterology*, 41(3), pp.198–208.
- Nystedt, S. et al., 1995. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *European journal of biochemistry / FEBS*, 232(1), pp.84–89.
- Nystedt, S. et al., 1994. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, pp.9208–9212.
- Oh, D.S. et al., 2007. Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 142(6), pp.554–560.
- Oikonomopoulou, K. et al., 2006. Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biological chemistry*, 387(6), pp.817–824.
- Ossovskaya, V.S. & Bunnett, N.W., 2004. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiological reviews*, 84(2), pp.579–621.
- Peery, A.F. et al., 2012. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*, 143(5), pp.1179–1187.

- Pierce, K.L. & Lefkowitz, R.J., 2001. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(10), pp.727–733.
- Rafiee, P. et al., 2009. Effect of curcumin on acidic pH-induced expression of IL-6 and IL-8 in human esophageal epithelial cells (HET-1A): role of PKC, MAPKs, and NF-kappaB. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296(2), pp.G388–98.
- Ricks, T.K. & Trejo, J., 2009. Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), pp.34444–34457.
- Rieder, F. et al., 2007. Gastroesophageal Reflux Disease-Associated Esophagitis Induces Endogenous Cytokine Production Leading to Motor Abnormalities. *Gastroenterology*, 132(1), pp.154–165.
- Rieder, F. et al., 2010. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 298, pp.G571–G581.
- Rohof, W.O. et al., 2013. An alginate-antacid formulation localizes to the acid pocket to reduce acid reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(12), pp.1585–1591.
- Ronkainen, J. et al., 2005. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 40(3), pp.275–285.
- De Ruigh, A. et al., 2014. Gaviscon Double Action Liquid (antacid & alginate) is more effective than antacid in controlling post-prandial oesophageal acid exposure in GERD patients: a double-blind crossover study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 40(5), pp.531–7.
- Sandler, R.S. et al., 2002. The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology*, 122(5), pp.1500–1511.

- Shaheen, N.J. et al., 2006. The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. *The American journal of gastroenterology*, 101(9), pp.2128–2138.
- Shan, J. et al., 2012. Trypsin impaired epithelial barrier function and induced IL-8 secretion through basolateral PAR-2: a lesson from a stratified squamous epithelial model. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(10), pp.G1105–G1112.
- Sharma, N. et al., 2008. An analysis of persistent symptoms in acid-suppressed patients undergoing impedance-pH monitoring. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 6(5), pp.521–4.
- Sharma, P., 2006. The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria. *Gastroenterology*, 131, pp.1392–1399.
- Shay, S.S., Bomeli, S. & Richter, J., 2002. Multichannel intraluminal impedance accurately detects fasting, recumbent reflux events and their clearing. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 283(2), pp.G376–83.
- Sifrim, D. et al., 2001. Acid, nonacid, and gas reflux in patients with gastroesophageal reflux disease during ambulatory 24-hour pH-impedance recordings. *Gastroenterology*, 120(7), pp.1588–1598.
- Sifrim, D. et al., 2004. Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut*, 53(7), pp.1024–1031.
- Sifrim, D. & Holloway, R., 2001. Transient lower esophageal sphincter relaxations: how many or how harmful? *Am. J. Gastroenterol.*, 96, pp.2529–2532.
- Smith, J.L. et al., 1989. Sensitivity of the esophageal mucosa to pH in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*, 96, pp.683–689.
- Smout, a. J.P.M., 2007. The patient with GORD and chronically recurrent problems. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 21(3), pp.365–378.

- Søreide, K., 2008. Proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) in gastrointestinal and pancreatic pathophysiology, inflammation and neoplasia. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 43(8), pp.902–909.
- Souza, R.F. et al., 2009. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology*, 137(5), pp.1776–1784.
- Stalheim, L. et al., 2005. Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Molecular pharmacology*, 67(1), pp.78–87.
- Steinhoff, M. et al., 2000. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nature medicine*, 6(2), pp.151–158.
- Tamhankar, A.P. et al., 2004. Omeprazole does not reduce gastroesophageal reflux: new insights using multichannel intraluminal impedance technology. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 8(7), pp.890–7; discussion 897–8.
- Tanaka, Y. et al., 2008. PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(2), pp.622–626.
- Tobey, N. a et al., 1996. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux--damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology*, 111(5), pp.1200–5.
- Tobey, N.A., 2001. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am. J. Gastroenterol.*, 96, pp.3062–3070.
- Trejo, J., 2003. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(2), pp.437–442.
- Vakil, N. et al., 2006. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: A global evidence-based consensus. *American Journal of Gastroenterology*, 101(8), pp.1900–1920.

- Vela, M.F. et al., 2003. Baclofen decreases acid and non-acid post-prandial gastro-oesophageal reflux measured by combined multichannel intraluminal impedance and pH. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(2), pp.243–251.
- Vela, M.F. et al., 2001. Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. *Gastroenterology*, 120(7), pp.1599–606.
- Vergnolle, N. et al., 2001. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nature medicine*, 7(7), pp.821–826.
- Vergnolle, N., 1999. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(9), pp.5064–9.
- Vieth, M. et al., 2004. Radial distribution of dilated intercellular spaces of the esophageal squamous epithelium in patients with reflux disease exhibiting discrete endoscopic lesions. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 22(2), pp.208–12.
- Weigt, J. et al., 2007. Multichannel intraluminal impedance and pH-metry for investigation of symptomatic gastroesophageal reflux disease. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 25(3), pp.179–82.
- Weijenborg, P.W. et al., 2014. Hypersensitivity to acid is associated with impaired esophageal mucosal integrity in patients with gastroesophageal reflux disease with and without esophagitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 307(3), pp.G323–9.
- Weijenborg, P.W. et al., 2012. PPI therapy is equally effective in well-defined non-erosive reflux disease and in reflux esophagitis: A meta-analysis. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(November 2011), pp.747–758.
- Wex, T. et al., 2009. Gastroesophageal reflux disease does not lead to changes in the secretory leukocyte protease inhibitor expression in esophageal mucosa. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 21(2), pp.150–8.

- Wiklund, I., 2004. Review of the quality of life and burden of illness in gastroesophageal reflux disease. *Dig. Dis.*, 22, pp.108–114.
- Yoshida, N. et al., 2004. Interleukin-8 expression in the esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 39(9), pp.816–22.
- Yoshida, N. et al., 2007. Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells. *International journal of molecular medicine*, 19(2), pp.335–340.
- Yoshida, N. et al., 2006. Molecular mechanisms involved in interleukin-8 production by normal human oesophageal epithelial cells. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 24, pp.219–226.
- Yousef, F., 2008. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.*, 168, pp.237–249.
- Zhao, P., Metcalf, M. & Bunnett, N.W., 2014. Biased signaling of protease-activated receptors. *Frontiers in endocrinology*, 5, p.67.

7. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei all jenen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner für die Überlassung des Promotionsthemas und die jederzeit freundliche Unterstützung der Arbeit sowie seine umfassende Förderung in allgemeinen Studienangelegenheiten.

Meinen besonderen Dank richte ich an PD Dr. med. Arne Kandulski, der stets die Zeit fand, kritische Punkte der Dissertation und meine Fragen mit mir zu erörtern. Sehr dankbar bin ich ihm für unsere ausgesprochen konstruktiven Diskussionen und die durch ihn erlangten tiefen Einblicke in Klinik und Wissenschaft. Neben der exzellenten fachlichen Betreuung danke ich ihm insbesondere für das stets sympathische und freundschaftliche Verhältnis auch abseits der Forschung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, allen voran Frau Simone Philipsen. Sie halfen mir beim Erlernen der experimentellen und wissenschaftlichen Methoden und machten durch ihre stete Hilfsbereitschaft und ihren Rat die praktische Durchführung der Arbeit erst möglich.

Zuletzt gebührt mein herzlichster Dank meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Promotion unterstützt und diese Zeit für mich so wundervoll und unvergesslich gemacht haben. Franziska danke ich für ihre geduldige und bedingungslose Unterstützung, die ich als großes Glück empfand und die mir auch an schweren Tagen die Kraft gab, meinen Weg zu gehen.

Ihnen und Euch allen meinen herzlichen Dank!

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Protease-aktivierter Rezeptor-2-vermittelte Immunpathogenese der gastro-ösophagealen Refluxerkrankung im epithelialen Zellmodell

Untersuchung zur Initiierung der epithelialen IL-8-Sekretion durch wiederholte Säureexposition und PAR-2-Aktivierung

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner und Herrn PD Dr. med. Arne Kandulski

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Dülmen, den 14. Mai 2018

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Winkelsett
Vorname	Lukas
Geburtsdatum	13.09.1990
Geburtsort	Münster
Konfession	römisch-katholisch

Schulbildung

1997 - 2001	St. Marien Grundschule Appelhülsen
2001 - 2009	Gymnasium der Gemeinde Nottuln

Studium

10/2009	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
08 - 09/2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2015	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2016	Approbation als Arzt

Famulaturen

08/2012	Allgemeine Innere Abteilung, Clemenshospital, Münster
09/2012	Urologische Belegabteilung, Raphaelsklinik, Münster
02/2013	Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektologie, Universitätsklinikum Magdeburg
08/2013	Allgemeinmedizinische Gemeinschaftspraxis Biesel, Nottuln
09/2013	Allgemeine Innere Abteilung, Franz-Hospital, Dülmen

Praktisches Jahr

- 11/2014 - 03/2015 Urologie
Medizinische Fakultät der OvGU Magdeburg
Klinik für Urologie und Kinderurologie
- 03 - 06/2015 Innere Medizin
Christophorus-Kliniken
St.-Vincenz-Hostpital Coesfeld
- 06 - 10/2015 Chirurgie
Franz-Tappeiner Krankenhaus Meran, Italien
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

Promotion

- 06/2012 Beginn der Promotionsarbeit in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Zentrum für Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Betreuer: Prof. Dr. med. P. Malfertheiner,
PD Dr. med. A. Kandulski
- Thema: Protease-aktivierter Rezeptor-2-vermittelte Immunpathogenese der gastro-ösophagealen Refluxerkrankung im epithelialen Zellmodell
- Untersuchung zur Initiierung der epithelialen IL-8-Sekretion durch wiederholte Säureexposition und PAR-2-Aktivierung

Beruf

- seit 05/2016 Assistenzarzt der Medizinischen Kliniken 1 und 2, Christophorus-Kliniken GmbH, Südwall 22, 48653 Coesfeld

Dülmen, den 14. Mai 2018

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit sind Bestandteile der folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Abstracts und Poster

- Arne Kandulski, Lukas Winkelsett, Jochen Weigt, Doerthe Kuester, Peter Malfertheiner. Mo1921 PAR2-Mediated IL-8 Secretion by Esophageal Cells Is Dependent From Repeated Stimulation With Acidic pH. a 2-Step Model of Mucosal Immune Response in the Pathogenesis of Gastro-Esophageal Reflux Disease. Digestive Disease Week, 17. - 19.05.2015, Washington D.C., USA
- Lukas Winkelsett, Arne Kandulski, Peter Malfertheiner. Protease-aktivierter Rezeptor-2 (PAR2) in der Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung. Bedeutung von schwach-saurem Reflux und PAR2-Aktivierung für die mukosale IL-8 Sekretion im epithelialen Zellmodell. Zeitschrift für Gastroenterologie; 54(08); 08.2016

Vorträge

- Lukas Winkelsett, Arne Kandulski and Peter Malfertheiner. Model of Two important Steps in GORD pathogenesis: Impact of acidic pH and Protease-activated receptor-2 (PAR2) on mucosal IL-8 Secretion. 22nd UEG Week, 18. - 22.10.2014, Wien, Österreich
- Lukas Winkelsett, Arne Kandulski and Peter Malfertheiner. Model of Two important Steps in GORD pathogenesis: Impact of acidic pH and Protease-activated receptor-2 (PAR2) on mucosal IL-8 Secretion. European GI Bridging Meeting , 13. - 15.11.2014, Berlin
- Lukas Winkelsett, Arne Kandulski und Peter Malfertheiner. Protease-aktivierter Rezeptor-2 (PAR2) in der Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung: Bedeutung von schwach-saurem Reflux und PAR2-Aktivierung für die mukosale IL-8 Sekretion im epithelialen Zellmodell. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie, 21. – 24.09.2016, Hamburg

Preise

- Vortragspreis des europäisch GI Bridging Meeting zur Jahrestagung 2014, 13. - 15.11.2014 in Berlin.

Lukas Winkelsett, Arne Kandulski and Peter Malfertheiner. Model of Two important Steps in GORD pathogenesis: Impact of acidic pH and Protease-activated receptor-2 (PAR2) on mucosal IL-8 Secretion.

Zeitschriftenartikel

- Arne Kandulski, Lukas Winkelsett, Peter Malfertheiner. Mucosal two-step pathogenesis in gastroesophageal reflux disease (GERD): repeated weakly acidic stimulation and activation of protease-activated Receptor-2 (PAR2) on mucosal Interleukin-8 secretion (akzeptiert 12.2017; epub 04/2018)

Dülmen, den 14. Mai 2018